

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A FOSZFATIDILINOZITOL 4-KINÁZ PI4K230
IZOFORMÁJÁNAK SEJTMAGI / NUKLEOLÁRIS
LOKALIZÁCIÓJA ÉS TRANSZPORT MECHANIZMUSA

Kakuk Annamária

Témavezető: Dr. Vereb György

Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Orvosi Vegytani Intézet

Debrecen

2008

BEVEZETÉS

Bár a foszfoinozitidek csak kis részét képezik a sejtek foszfolipid tartalmának, jelentőségük mégis szerteágazó hormonok és növekedési faktorok jelátviteli folyamataiban, ion csatornák működésének szabályozásában, citoszkeleton átépülésben, vezikuláris transzportban és membrán-fúziós folyamatokban.

A foszfoinozitidek a foszfatidilinozitol (PtdIns) foszforilált származékai, amelyekben az inozitol gyűrű 3-, 4-, 5- pozíciójú –OH csoportjai az összes lehetséges kombinációban foszforilálódhatnak. Számos kinázt és foszfatázt ismerünk, amelyek a foszfoinozitidek átalakulásaiban közreműködnek.

A foszfatidilinozitol 4-kinázok (PI4K) a PtdIns foszforilálásával a PtdIns (4)P képződést katalizálják, amely az első elkötelező lépés a PtdIns (4,5)P₂ és a PtdIns (3,4,5)P₃ (a két legjobban ismert lipid regulátor molekula) képződésének irányába. A PtdIns (4,5)P₂ a foszfolipáz C (PLC) fő szubsztrátjaként szolgál, melyből az enzimreakció során két jelátvitelben fontos másodlagos hírvivő molekula, az inozitol 1,4,5-trifoszfát (IP₃) és a diacilglicerol (DAG) képződik. A PtdIns (3,4,5)P₃ hatást gyakorol az anyagcserére, a szerin/treonon kináz Akt-on keresztül antiapoptotikus funkcióval bír, szabályoz tirozin kinázokat (pl. Btk) és a kis GTP-kötő fehérje guanin nukleotid cserélő faktorait. Mindezek mellett a foszfoinozitidek képesek a membránokhoz toborozni olyan foszfolipid kötő doménnal rendelkező fehérjéket, amelyek a foszfoinozítid izomerek specifikus felismerésére képesek (PH, ENTH, FYVE, PX, PHD, DHR) és rajtuk keresztül kontrollálni jelátviteli és transzport folyamatokat.

A foszfoinozitidek bioszintézisének sebességében sok esetben a PI4-kinázok játszanak meghatározó szerepet. Emlősökben négy, szubcelluláris megjelenésükben és enzimológiai sajátosságaikban különböző PI4K izoformát klónoztak: PI4K55 α , PI4K55 β , PI4K92, PI4K230. Valamennyi izoformára jellemző az általános szöveti előfordulás, azonban a PI4K230 megjelenése a központi idegrendszer területén a legkifejezettebb. A PI4K55 α és β a citoplazmamembrán IP₃ és DAG termelő szignálútvonalának tagjai és részt vesznek a citoplazma exo- és endocitotikus folyamataiban is. A PI4K92 asszociációt mutat a Golgi vezikulumok és ciszternák külső felszínével, jelenléte nélkülözhetetlen a Golgi-működés szabályozásában. A PI4K230-at kimutatták a sejttag körül, a szinaptikus membrán közelében lévő kis vezikulumokhoz, a durva felszínű endoplazmatikus retikulum ciszternáihoz és a mitokondriumok külső membránjához asszociáltan. A szubcelluláris lokalizáció valamennyi izoforma esetében jelzi a PI4-kinázok kapcsolatát a vezikuláris transzport valamely szintjével.

A PI4-kinázok szerkezetében C-terminálisan a konzervatív katalitikus domén, míg N-terminálisan változatos, regulatórikus doménszerkezet található. Aminosav szekvencia-homológiai vizsgálatok alapján valamennyi izoforma esetében feltételezhető olyan funkcionális domének jelenléte, amelyek fehérje-fehérje vagy fehérje-lipid kölcsönhatás kialakításáért felelnek. A PI4K230 emellett több fehérje-DNS kölcsönhatás létrehozására alkalmas motívumot is hordoz, míg a többi izoformára ez kevésbé vagy nem jellemző. Nukleáris transzport minden PI4K izoforma esetében bekövetkezhet, a szerkezetükben feltételezett nukleáris lokalizációs szignál (NLS) alapján.

A számos sejtfolyamat mellett, a foszfoinozitideket és a szintézisükért felelős enzimek jelentős részét kimutatták az emlős sejtek magjában is. A foszfoinozitidek nem csupán a maghártyában fordulnak elő, de a magon belül is megtalálhatók, nem-ionos detergens rezisztens frakció formájában. A magi foszfoinozítid metabolizmus szabályozása független a citoplazma membránban lévőktől. A magi foszfoinozitidek mostanában egyre nagyobb figyelmet kapnak, mivel bizonyítottan szerepet játszanak a kromatin szerkezet, a transzkripció, a sejtosztódás és differenciálódás valamint az apoptózis szabályozásában. A PtdIns (4,5)P₂ monitorozásával kapott eredmények szerint a sejtmagban több különálló foszfoinozítid pool található, amelyek különböző szubnukleáris kompartmentekben lokalizálódnak. Bár a PtdIns (4)P termelődése meghatározó lépés számos foszfoinozítid bioszintéziséhez, a PI4-kinázok magi előfordulásáról mégis keveset tudunk. A foszfoinozitidek széleskörű megjelenésével szemben, PI4-kinázokat mostanáig csak a sejtmag kis területeire lokalizálódva mutattak ki: úgy mint PI4K92-t a nukleáris speckle-höz ill. a lamina-porus komplexekhez asszociálva, a PI4K55-öt a sejtmag aktin-filament frakciójában. Az aminosav szekvenciája alapján feltételezett NLS és DNS kötő motívumok ellenére a PI4K230-at más munkacsoportok eddig nem tudták a sejtmagban kimutatni.

Sejtmag transzport

A makromolekulák kétirányú sejtmagi transzportja a maghártyába ágyazott un. magpórus komplexeken (NPC) keresztül következik be. Ionok, metabolitok és kisebb fehérjék (<40kDa) passzív diffúzióval, a nagyobb molekulák jelentős része viszont szignál- és energia függő mechanizmussal jut át a pórus komplexeken. A legtöbb sejtmag és citoplazma közötti szignál-függő transzportot az importin β családba tartozó transzport receptorok (karioferinek) vezérlik. A fehérjék NLS-ét, ill. nukleáris export szignálját (NES) felismerő transzport receptorok közvetlenül vagy adaptor fehérjén keresztül közvetve kötik a transzferálandó molekulát. Legismertebb adaptor protein az importin α , mely importin β -val alkotott

komplexben nagy affinitással köti a fehérjék klasszikus NLS-ét (cNLS). Az importinok szubsztrát megkötését és leválását a maghártya két oldala közötti RanGTP gradiens szabályozza. A citoplazma alacsony RanGTP szintje az importin-szállítandó fehérje komplex kialakulásának, míg a sejtmag magas RanGTP koncentrációja a komplex disszociációjának kedvez. A RanGDP→RanGTP átalakulást a sejtmagi guanin nukleotid cserélő faktor (RCC1) stimulálja, a RanGTP hidrolízisét a citoplazmatikus a RanGTPáz aktivitású protein (RanGAP) a Ran-kötő fehérjékkel (RanBP 1,2).együtt végzi, míg a RanGDP-t a nukleáris transzport faktor (NTF2) szállítja vissza a sejtmagba.

A klasszikus import rendszerben a fehérje importjáért egy bázikus aminosavszakasz felelős, amely lehet mono vagy bipartit cNLS, emellett hatékony, jól kontrollált transzport un. nem-klasszikus NLS (ncNLS) jelenlétében is bekövetkezhet. A nukleoluszbá irányított transzport során jól definiálható konszenzus szekvenciát nem ismerünk, de az eddig megismert sejtmagvacskába irányító szignálok (NTS) jellemzője, hogy bázikus aminosavakban gazdagok és gyakran átfednek az NLS-sel.

CÉLKITŰZÉSEK

Bár egyre nagyobb számú bizonyíték támasztja alá a PI4K230 elengedhetetlen szerepét a sejt egészének működésében, azonban sejtmagi megjelenéséről még senki sem számolt be. A PI4K230 aminosavsorrendjében feltételezett NLS-ek, továbbá bZip bázikus leucin cipzár és hélix-hurok-hélix motívumok alapján következtethetünk sejtmagi előfordulására. Ezen motívumok felvetik annak lehetőségét, hogy a PI4K230 a sejtmagban transzkripciós faktorként funkcionál vagy génexpressziót szabályoz pl. kompetícióba lép más transzkripciós faktorokkal.

Vizsgálatainkat az indította el, hogy a PI4K230 immunfluoreszcens kimutatásakor intenzív jelet kaptunk a neuronális sejtek magvacskájában. Ez a jelenség különös figyelmet érdemel, tekintettel a magi foszfoinozitidek változatos funkciójára.

- A fent említett kísérlet a natív PI4K230 sejtmagi megjelenésének többirányú megerősítésére ösztönzött bennünket, idegszöveti metszeteken és különböző sejtvonalakon. Emellett kísérleteket terveztünk az expresszált rekombináns és deléciós mutáns formák intracelluláris lokalizációjának megismerésére. Az immunreakció specifikusságát siRNS kezeléssel kívántuk igazolni.

- Első lépésként a nukleoláris PI4K230 sejtmagi jelentőségének feltárása felé, fontosnak tartottuk meghatározni a molekuláris mechanizmust, amellyel a fehérje a sejtmagba

importálódik, illetve azokat a komponenseket, amelyek a nukleoláris PI4K230 kölcsönható partnerei.

- Mivel a PI4K230 doménszerkezetében mono- és bipartit NLS-nek vélt bázikus szakaszok tényleges közreműködése a nukleo-citoplazmatikus transzportban nem bizonyított, ezért célul tűztük ki ezen NLS-ek szerepének feltárását a PI4K230 nukleáris transzportjában.
- Az NLS-ek meghatározásához hasonlóan kísérleteket terveztünk a PI4K230-at nukleoluszból irányító NTS szekvenciák megismerésére is.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Patkány agy és gerincvelő immunhisztokémiai vizsgálata

Wistar patkányokat perfundáltunk Ringer oldattal majd 0,1 M foszfát pufferben (PBS) oldott 4%-os (m/v) depolimerizált paraformaldehid (PFA) oldattal szobahőmérsékleten 30 percig. Az agyat és gerincvelőt kireparáltuk és a kívánt részekből metszetet készítettünk.

A natív, gyorsfagyasztott metszetek készítésénél a patkányok dekapitálását követően a lehető legrövidebb idő alatt kireparáltuk az agyat és a gerincvelőt majd azonnal fagyasztottuk. A 20 µm-es gyorsfagyasztott metszeteket -20°C-os abszolút etanollal vagy 4%-os (m/v) PFA oldattal fixáltuk szobahőmérsékleten. Egyes metszeteknél a PFA fixálás előtt 10 perces, szobahőmérsékletű PBS előmosást végeztünk.

A fixált metszeteket PBS-mosás után 10% normál kecske szérumot (NGS) tartalmazó TX-TPBS oldattal (10mM Tris, 0,5% (m/v) Triton X-100 PBS-ben) blokkoltuk, majd anti-PI4K230 vagy, anti PI4K92 antitestekkel inkubáltuk, egy éjszakán át. Az immunreakciót PBS mosások után Alexa Fluor 488 fluorofórral jelölt második antitestekkel vizualizáltuk (2 óra). A kontroll metszeteken nem specifikus csirke IgY preparátumot vagy csak a 2. antitestet használtuk.

Citrát pufferes antigénfeltárás

A PFA-val fixált metszeteket 10 mM citrát pufferbe merítettük (pH: 6,0) és forrásig hevítettük. A minták hideg PBS-es mosása után az immunhisztokémiai jelölés a fentiekhez hasonlóan történt.

Sejtvonalak fenntartása és immuncitokémia

A kísérleteinkhez használt emlős sejtvonalakat: *HCN1A* (primer human cortical neuronal), *B50* (patkány neuroblastoma) *HeLa* (human cervical adenocarcinoma) *COS-7* (afrikai zöld majom vese) antibiotikummal kiegészített 10% (v/v) FCS (fetal calf serum) tartalmú DMEM-ben (Dulbecco's modified Eagle's médium) növesztettük. Immuncitokémiai vizsgálatokhoz a sejteket tripszin-EDTA-val 12 mm Ø üveg fedőlemezre passzáltuk..

Az immuncitokémiai vizsgálatok fixálás, blokkolás és immunfestés lépései közel azonosak az immunhisztokémiai vizsgálatoknál bemutatottakkal. Az első és második antitestekkel 1 óráig inkubáltuk a sejteket és hígításukhoz 5% normál szérum tartalmú TX-TPBS-t használtunk. Alkalmazott első antitestek: anti-PI4K230 873-1145 aminosavak ellen; 1201-1220 aminosavak ellen; 1361-1378 aminosavak ellen; 1566-1863 aminosavak ellen; anti-PI4K92; anti-PI4K55 α ; anti-nukleolin; anti-fibrillarin; anti-HA. A megfelelő második antitestek Alexa Fluor festékekkel jelzettek voltak. A sejtmagok helyzetének pontos meghatározásához propídium-jodidos DNS festést végeztünk 1 μ g/ml PBS koncentrációban, 5 percig.

B50 sejtek Triton X-100, dezoxiribonukleáz I és ribonukleáz A kezelése

A B50 sejteket fixálás előtt 15 percig, szobahőmérsékleten TX-TPBS-sel inkubáltuk proteáz inhibitorok jelenlétében (aprotinin, leupeptin, kimostatin, TPCK). A permeabilizálást követően dezoxiribonukleáz I (DNáz I) (17 μ g/ml Tris pufferben: 10 mM Tris-HCl pH: 7,5; 5 mM MgCl₂; 1 mM CaCl₂ és proteáz inhibitorok) vagy ribonukleáz A (RNáz A) (70 μ g/ml Tris pufferben: 50 mM Tris-HCl pH: 7,5; 5 mM EDTA és proteáz inhibitorok) kezelést alkalmaztunk, szobahőmérsékleten 20 percig. Ezt követően a sejteket mostuk PBS-sel, etanollal fixáltuk, majd immunfluoreszcensen jelöltük a fent leírt módon.

COS-7 sejtek siRNS kezelése és RT-PCR

A 30-40%-os konfluenciájú COS-7 sejteket Oligofectamine segítségével transzfektáltuk 0,2 μ M, dupla-szálú RNS-sel (Qiagen), aminek szekvenciája megfelelt a PI4K230 1072-1092 nukleotidszakaszának. 6 óra múlva a tápoldatot 10% FCS tartalmú DMEM-re cseréltük. Az siRNS transzfekciót 24 óra elteltével megismételtük, a fehérje szinten okozott változást immuncitokémiai eljárással az első transzfekciót követő harmadik napon vizsgáltuk.

Az siRNS kezelt és kontroll sejtek mRNS szintjét RT-PCR módszerrel vizsgáltuk. A transzfekció után 1 nappal totál RNS-t preparáltunk. A reverz transzkriptáz

reakcióhoz 2 µg RNS-t, 1 µg random hexamert, 0,5 mM dNTP-t, 1 U/ µl RNasin-t, 200 unit M-MLV-RT reverz transzkriptázt használtunk 1xRT pufferben. A cDNS PI4K230 tartalmának felszaporításához használt primerek : 5'-AACATGGAAGAGTCTCTCCTCTC-3' és 5'-CCATCACACTGGCTACAATG-3' Kontrollként a GAPDH-t használtuk. A PCR során felszaporított DNS szakaszok megjelenítéséhez a mintákat etídium-bromid tartalmú, 1%-os agaróz gélen futtattuk és UV-ban detektáltuk.

A PI4K230 és deléció mutáns formáinak expressziója COS-7 sejtekben

A PI4K230 tartalmú pHM6 és a deléció mutáns cDNS-eket ($\Delta 130$, $\Delta 97$, $\Delta 68$, $\Delta 56$) hordozó pEGFP emlős expressziós vektorokat prof. L.M.G. Heilmeyer kutatócsoportja készítette (Ruhr Egyetem, Bochum, Németország). A 60-70% konfluenciájú COS-7 sejteket FuGENE 6 transzfekciós reagens segítségével transzfektáltuk az expressziós plazmidokkal. A fehérjék kifejeződését egy nap (PI4K $\Delta 67$, PI4K $\Delta 56$) vagy két nap (PI4K230, PI4K $\Delta 130$, PI4K $\Delta 56$) elteltével vizsgáltuk. Etanol fixálást követően az expresszált PI4K230-at az N-terminálisan fuzionált hemagglutinin indirekt immunfluoreszcenciás jelölésével tettük láthatóvá, a deléció mutánsokat pedig a GFP fúziós partneren keresztül közvetlenül detektáltuk konfokális mikroszkóppal.

A PI4K230 klónozása és expressziója Sf9 rovar sejtekben

Az Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) sejteket monolayer kultúrában növesztettük, 27 °C-on, 10 µg/ml gentamycin tartalmú SF-900 II SFM tápoldatban.

A PI4K230 teljes kódoló régióját szubklónoztuk a pHM6-PI4K230-ból egy StuI és NotI hasított pFastBAC HTb vektor His₆ kódoló régiója mögé. Ezt a konstruktot használtuk a bakmid DNS transzpozíciójához, amelyet a gyári utasítás szerint végeztünk (Gibco). Miután az Sf9 sejteket transzfektáltuk a bakmid DNS-sel (gyári utasítás szerint) a rekombináns bakulovírusok 72 órával a transzfekció után dúsultak fel a tápoldatban. Fehérje expresszióhoz 2×10^5 sejt / cm² sűrűségű Sf9 sejtet fertőztünk MOI=5 értékkel (egy sejtre jutó víruspartikulák száma), majd a sejteket 96 óra elteltével összegyűjtöttük. Aktivitásméréshez a sejteket jéghideg lízis pufferrel vortexeltük és ultrahanggal kezeltük. (Lízis puffer: 20 mM KH₂PO₄ pH 7,0, 150 mM NaCl, 1% (v/v) TX-100, 0,5 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin). Import kísérletekhez 60 µg/ml digitonint tartalmazó import pufferrel készítettünk lizátumot.

PI4K aktivitásmérés

A reakcióközeg összetétele: 0,83 mg/ml PtdIns; 5 mM [γ - 32 P] ATP (400-800 Bq/nmol); 27 mM MgCl₂; 116 mM KCl; 116 mM Hepes / KOH; 1mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTE; 0,4% (v/v) Triton X-100 (pH 7,5). A közeg inkubálása után (25 °C, 15-30 perc), a PtdIns-ba beépülő radioaktív foszfát mennyiségét határoztuk meg, melyet kloroform-metanolos extrakcióval választottunk el a többi komponenstől.

Fehérjék bakteriális expressziója és tisztítása

A Ran-expressziós konstruktot Szabad János munkacsoportja (Szegedi Egyetem), a RanGAP, importin α 1, importin β tartalmú expressziós vektorokat Dirk Görlich (Heidelbergi Egyetem, Németország), importin α 3 és importin α 5 expressziós konstruktokat Riku Fagerlund (National Public Health Institute, Helsinki, Finnország) bocsátotta rendelkezésünkre. A vektorokra, expresszióra és tisztításra vonatkozó adatokat az alábbi táblázat tartalmazza.

Fehérje	vektor	expresszió	Tisztítás
Ran	<i>pQE-11</i>	<i>BLR</i>	<i>Ni-agaróz</i>
RanGAP	<i>pQE-60</i>	<i>M15</i>	<i>Ni-agaróz</i>
Importin α 1	<i>pQE-70</i>	<i>M15</i>	<i>Ni-agaróz</i>
Importin α 3	<i>pQE-60</i> (<i>poli-His GST-re cserélve</i>)	<i>BL21</i>	<i>GSH-sepharose</i>
Importin α 5	<i>pQE-60</i> (<i>poli-His GST-re cserélve</i>)	<i>BL21</i>	<i>GSH-sepharose</i>
Importin β	<i>pQE-60</i>	<i>M15</i>	<i>Ni-agaróz</i>

Szintetikus NLS peptidek kapcsolása fluoreszcens jelölt BSA-hoz és tripszin inhibítorhoz

A PI4K230 nukleáris és transzportjában feltételezett monopartit, bipartit és nem klasszikus NLS szekvenciák vizsgálatára ezen NLS-eknek megfelelő aminosav szekvenciájú és bázikus aminosavakban mutáns szintetikus peptideket kapcsoltunk Alexa Fluor488-al jelölt BSA-hoz, illetve tripszin-inhibítorhoz (trp.inh.).

Elnevezés	Szintetikus peptidek szekvenciája
NLS1	Cys- ⁹¹⁶ NFNHIIHKRIRRVADKYLSG ⁹³⁴
NLS1mut	Cys- ⁹¹⁶ NFNHIIHAAIAAVADKYLSG ⁹³⁴
NLS2	Cys- ¹⁴¹⁴ SKKTNRGSQLHKYYMKRRTL ¹⁴³³
NLS2mut	Cys- ¹⁴¹⁴ SAATNRGSQLHKYYMMGM ¹⁴³³ TL
NLS2/1	Cys- ¹⁴¹⁴ SKKTNRGSQLHKY ¹⁴²⁶
NLS2/2	Cys- ¹⁴²⁷ YMKRRTL ¹⁴³³
NLS-3	Cys- ⁹³⁴ GLVDKFPHELLWSGTVLK ⁹⁵⁰

Tripszin inhibítort és succinimidil-Alexa Fluor488-at reagáltattunk gyári leírás szerint, majd mostuk, Centriprep 10Y segítségével. Az Alexa488 jelölt tripszin inhibitor (Alexa488trp.inh.) átlagos festék/fehérje molaránya 3-4 mol/mol volt.

Az Alexa488trp.inh.-t és Alexa488BSA-t (Invitrogen) reagáltattunk 1 mg Sulfo-SMCC-vel 1ml (pH 7,2) szobahőmérsékleten, 1 óráig. A SulfoSMCC feleslegét négyszeri 50 mM K-foszfát pufferes (1:20) hígítással és ezt követő Centriprep 10Y-ban történő koncentrálással mostuk ki. A maleimido-fehérjét N₂ tartalmú desztillált vízzel hígítottuk, 4 °C-ra hűtöttük, majd 10-szeres moláris feleslegben adtuk hozzá a kapcsolandó peptidet és egy éjszakán át kevertettük. A szabadon maradó maleimido csoportok blokkolására 50 mM Tris-HCl-ben pH:7,2 oldott L-ciszteint adtunk a reakcióközeghez (szobahőmérséklet, 1h). A preparátum koncentrálása és import pufferes mosása az előzővel azonos módon ismételt hígításokkal és koncentrálásokkal történt. A kapcsolt peptidek ligandum/fehérje aránya SDS-PAGE segítségével a látszólagos mólsúlynövekedésből számítva 3-5 mol/mol BSA esetén 1-3 mol/mol trp. inh. esetén.

Az NLS2 klónozása, expressziója, tisztítása, jelölése

A PI4K230 cDNS 3498-5001 bp szakaszának PCR felszaporítása során az 5' végre egy EcoRI, a 3' végre egy XhoI restrikciós hasítóhelyet kapcsoltunk, a következő primerekkel: 5'-ATATGAATTCGAGCATGGCATGGAGACGG-3' és 5'-CCGAGGAACAGGCCGGGAGCTCAATT-3'. Az így kapott DNS fragmentet egy EcoRI, XhoI hasított pET-28a plazmidba ligáltuk, létrehozva a pET28-NLS2 expressziós konstruktot. A konstrukt egy 501 aminosavnyi peptidet kódol (a PI4K230 1166.-1667. aminosavnyi szakasza) mely magába foglalja a PI4K230 bipartit NLS-ét és annak környezetét.

A fehérje expresszióhoz BL21(DE3) E. coli-t használtunk, melyet 0,4 mM IPTG-vel indukáltunk (4 óra, 28 °C). A baktériumokat 3x60 mp. ultrahangos kezeléssel tártuk fel, az alkalmazott lízis puffer összetétele: 50 mM Tris / HCl (pH: 7,5) 100 mM NaCl, 5 mM Mg-acetát, 5% (v/v) glicerol, proteáz inhibitorok. Centrifugálást követően az expresszált fehérje a csapadék frakcióban volt jelen, melyből csak részlegesen, 2-7 M urea tartalmú lízis pufferrel sikerült feloldanunk. A tisztításhoz SP-sepharose kromatográfiát használtunk, az eluált fehérjét szulfhidril csoportjain keresztül jelöltük Alexa 488-maleimiddel.

Az expr.NLS2 sejtmagi transzportja szempontjából kritikus, bázikus aminosavak irányított mutagenezise

pET28-NLS2 vektor PCR-mutagenézist a QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) segítségével végeztük, a gyártó által közölt protokollnak megfelelően. A Lys1415Ala és Lys1416Ala cseréhez használt szensz primer: 5'-CCAAGAAATCAGGCATGTCTGCGGCAACCAACCG-GGGCTCCC-3' a Lys1429Met Arg1430Gly és Arg1431Met cseréhez használt szensz primer: 5'-GCACAAATACTACATGATGGGCAATGACGCTGCTGC-TGTCCC-3' szekvenciájú, az antiszensz primerek ezek komplementerei. A megváltoztatott nukleotidokat aláhúzások jelölik. A kívánt mutációk jelenlétét DNS szekvenálással ellenőriztük.

Az expresszió körülményei, a tisztítás és jelölés nagyrészt megegyezett az expr.NLS2 esetében alkalmazottal. (Elnevezése a továbbiakban: expr.NLS2mut-Alexa488.)

Sejtmagi import folyamatok in vitro vizsgálata

A PI4K230 sejtmagi transzportjában a feltételezett monopartit, bipartit és nem klasszikus NLS szekvenciák lehetséges szerepének felderítése érdekében szelektíven permeabilizált HeLa sejteken transzport kísérleteket végeztünk. A HeLa sejteket fedőlemezekre passzáltuk és a PBS majd import pufferes (20 mM HEPES / KOH (pH 7,3), 110 mM K-acetát, 5 mM Na-acetát, 2 mM Mg-acetát, 1 mM EGTA, 2 mM DTT) mosásokat követően a sejteket import pufferben oldott 60 µg/ml digitoninnal permeabilizáltuk (7 perc), amelyet intenzív mosás követett (3x import pufferrel). A sejtmagi import kísérlet során (15 perc) PI4K230 tartalmú Sf9 lizátum, expr.NLS2-Alexa488 (700 nM) ill. Alexa488BSA-hoz, illetve Alexa488trp.inh.-hoz kapcsolt NLS peptidek transzportját vizsgáltuk (valamennyi 0,1 mg/ml). Az említett ligandumokat vizsgálatuk során vagy import pufferben oldott retikulocita lizátum (150 µg/ml), ATP regeneráló rendszer (1 mM ATP, 0.5 mM GTP, 10mM kreatin-foszfát, 50 µg/ml kreatin-foszfokináz), proteáz inhibitorok (aprotinin, leupeptin, pepstatin

valamennyi 1 $\mu\text{g/ml}$) tartalmú közegben vagy import pufferben oldott ATP regeneráló rendszer, Ran mix (3 μM Ran-GDP, 150 nM RanGAP, 300 nM NTF2), importinok ($\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, β valamennyi 1 μM), proteáz inhibitorok tartalmú közegben oldottuk. Ezt követően a sejteket mostuk, fixáltuk abs. etanollal (-20°C , 10 perc), fluoreszcensen jelöltük a sejtmagot, nukleoluszt majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

A transzport folyamat guanin nukleotid-kötő fehérje függésének vizsgálatához nem hidrolizáló GTP analógot, GTP γ S-t használtunk, 0,2 mM koncentrációban. A magpórus komplexeken keresztüli specifikus transzport gátlását búzacsíra lektinnel végeztük, melyet 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban alkalmaztunk az import kísérletet megelőzően 5 percig és az import vizsgálat alatt. Negatív kontrollként Alexa488BSA-t pozitív kontrollként pedig import ligandot alkalmaztunk, mely az SV40 vírus nagy T antigénjének NLS-e rodaminnal jelölt BSA-hoz kapcsolva (mindkettőt 700 nM-os koncentrációban).

Fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata dot blot felülréteggéssel

1,5 μg Alexa488BSA-hoz kapcsolt NLS peptideket és exprNLS2-Alexa488 peptidet csöppentettünk föl nitrocellulóz membránra és 5% (m/v) BSA és 20 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin tartalmú import pufferrel blokkoltuk 4 óráig. A hibridizáció során az importinok 1 μM oldatával (1% (m/v) BSA és 20 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin tartalmú import puffer) 4°C -on, 16 óráig inkubáltuk a membránokat. Az importin α -importin β tartalmú oldatokat a dimerképződés biztosítására 15-30 percig szobahőmérsékleten előinkubáltuk 1:1 molarányban. A membránok PBS mosását követően 1% (m/v) BSA tartalmú PBS-ben oldott HRP jelzett anti-poli-His antitesttel (5 ng/ml) vagy anti-GST antitesttel (20 ng/ml) és az erre specifikus HRP jelzett második antitesttel (2 ng/ml) inkubáltuk a membránokat. Az immunreakciót ECL reagenssel röntgen filmen detektáltuk.

Western blot

A mintákat Laemmli-pufferben forraltuk 10 percig, poliakrilamid gélen elválasztottuk, majd PVDF-membránra blottoltuk. Elektrotranszfert követően a membránt 1% (v/v) normál szérum és 5% (m/v) sovány tejpor tartalmú PBST-vel (0,1 m/v % Tween-20 PBS-ben) blokkoltuk. A PI4K230 elleni első antitestek azonosak az immunhisztokémiai jelöléseknél használtakkal. Az antitestek kötődését a megfelelő peroxidáz konjugált második antitestek kemilumineszcenciája segítségével tettük láthatóvá.

Konfokális mikroszkópia

A konfokális felvételeket Zeiss LSM 510 típusú mikroszkóppal, Plan-Apochromat 63x/1,4NA immerziós objektívvel készítettük. A festékeket Ar (488 nm), HeNe I (543 nm) vagy HeNe II (633 nm) lézerekkel gerjesztettük és a megfelelő 505-550 nm, 560-615 nm vagy 585-615 nm emissziós szűrőkön ill. 650 nm LP szűrőn keresztül detektáltuk. A konfokális blende értékét az 1 µm-es rétegvastagság eléréséhez megfelelő értékre állítottuk. A képeket az alábbi beállításokkal vettük föl: 512x512 pixel, 12 bit felbontás, 6,4 µs pixel idő, 2x soronkénti átlagolás.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A PI4K230 specifikus kimutatása az etanollal fixált sejtek magvacskájában

Primer neuronális HCN1A sejtekben az anti-PI4K230 (873-1145 aminosavnyi peptidszakasz elleni, továbbiakban anti N) antitest, a citoplazmatikus jelölődés mellett nagyon intenzív immunreaktivitást mutatott az etanollal fixált sejtek magvacskájában. Ezzel szemben a nukleoláris immunreakció teljes hiányát tapasztaltuk ugyanezen sejtek PFA fixálása esetén. A PI4K230 immunfluoreszcens jelét megvizsgáltuk gyorsfagyasztásos technikával preparált, etanollal fixált, illetve PFA-val perfundált patkányok gerincvelői metszetein is. A PFA-perfundált patkányok gerincvelői motoneuronjaiban a PI4K230 immunreaktivitása kizárólag a citoplazmára korlátozódott. Ugyancsak a nukleoláris jel hiányát tapasztaltuk a gyorsfagyasztott, utólag PFA-val fixált metszetek neuronjaiban is. Ezzel szemben a gyorsfagyasztott, etanollal fixált motoneuronok PI4K230 tartalmának citoplazmatikus jelölődése mellett gyenge sejtmagi és nagyon intenzív nukleoláris festődést tapasztaltunk. Etanollal fixált kontroll metszeteken csak gyenge háttérfestődést tapasztaltunk, ha az első antitestet kihagytuk vagy nem specifikus csirke IgY antitesttel helyettesítettük. A PI4K230 festődésével szemben, a gyorsfagyasztott gerincvelői metszetek PI4K92 jelölésekor nem kaptunk nukleoláris jelet.

A PFA és etanol fixált szövetek PI4K230 tartalmának eltérő immunfestődése általános jelenségnek tekinthető, amit alátámasztanak a különböző agyrégiókon végzett vizsgálataink. A nagyagy kéreg, hippocampus és kisagykéreg területéről származó, etanol fixált metszeteken a PI4K230 domináns nukleoláris jelét találtuk, míg ugyanez hiányzott a PFA perfundált állatok hasonló metszeteiről.

A nem specifikus festődések ill. más peptid szekvenciákkal kialakított keresztreakciók kiküszöbölése végett több, a PI4K230 különböző epitópjaira specifikusak antitesttel is

vizsgálatot végeztünk. Az etanol fixált B50 sejteken kapott eredmények valamennyi PI4K230 specifikus antitest (1361-1378 as., 1201-1220 as., 1566-1863 as. elleni) és a megfelelő Alexa Fluor 488 jelölt második antitest használata esetén megegyeztek az anti N antitesttel kapott eredményekkel. (Az antitestek specifikusságát Sf9 sejtekben expresszált PI4K230 segítségével immunobloton teszteltük.) Az etanol fixált B50 sejtek intenzív PI4K230 festődésének nukleoláris voltát minden esetben bizonyította kolokalizációjuk indirekt jelölt nukleolinnal. Ugyanilyen körülmények között a PFA fixált sejtekben a nukleolin jelölődés önállóan, PI4K230 kolokalizáció nélkül jelent meg. Mivel azonban a citoplazmatikus és néhány esetben a sejtmagi PI4K230 ezekben az esetekben is detektálható maradt, így megállapíthatjuk, hogy a PFA maszkírozó hatása kizárólag a nukleoláris PI4K230-ra korlátozódik. Metanol-ecetsav vagy acetón fixált B50 sejteken kapott eredmények azonosak voltak az etanol fixált sejteknél kapottakkal, mely arra utal, hogy a PFA kémiai reakciója tehető felelőssé a nukleoláris PI4K230 immunreakció elfedéséért.

A PI4K230 sejtmagvacskán belüli pontos helyének meghatározása végett a PI4K230 megjelenését kolokalizációban vizsgáltuk nukleolin és fibrillarin nukleoláris marker fehérjékkel, etanol fixált HeLa sejteken. Kolokalizációs eredményeinken alapulva megállapítható, hogy a PI4K230 határozott megjelenést mutat a sejtmagvacska denz fibrilláris komponensében, míg a denz fibrilláris centrumokban nem fordul elő.

Ugyancsak megvizsgáltuk a PI4K92 és a PI4K55 α immunfestésének különbségét etanol és PFA fixált B50 sejteken. Ezen kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a fixálószer nem okoz észrevehető különbséget a két PI4K izoforma festődési mintázatában. A PI4K92 nagy mennyiségben jelenik meg a Golgiban és halványabb, rögös festődést mutat a citoplazma többi részén. A sejtmagban a PI4K92 csak elszórtan, pontszerű immunreakciók formájában detektálható, nukleoláris feldúsulás nélkül. A PI4K55 α gyenge, rögös citoplazmatikus immunreakciójával szemben a sejtmagban intenzív, egész magot kitöltő festődés látható, fixálószertől függetlenül, azonban szembeötlő nukleoláris jelölődést nem tapasztaltunk.

A PFA hatásának vizsgálata a PI4K230 immunreaktivitására

A PI4K230 tartalmú Sf9 sejt lizátumot növekvő koncentrációjú (0-1 %) PFA-val kezeltük 10 percig, majd SDS-PAGE után PVDF membránra blottoltuk. Az immunoblott eredménye alapján (anti N antitestet használva) megállapítható, hogy a PI4K230 a PFA kezelés ellenére is detektálható marad. PI4K230 jól kimutatható abban az esetben is, ha a fehérjét PVDF membránra blottolást követően kezeljük PFA-val. Ezen eredmények arra

utalnak, hogy a keresztkötő sajátossággal bíró formaldehid epitóp-maszkírozó hatásáért nem molekulán belüli, hanem a PI4K230 és a vele közvetlenül érintkező molekulák közötti keresztkötések felelősek.

A PFA fixált sejtek sejtmagi PI4K230 tartalmának feltárása

A jelenség, miszerint a PI4K230 nukleoláris festődése csak a nem PFA fixált sejteknél tapasztalható azzal magyarázható, hogy a PFA keresztkötő sajátosságának köszönhetően elfedi az immunreaktív epitópokat. A PFA fixált B50 sejtek nukleoláris PI4K230 tartalmát azonban a gyakorlatban elterjedten használt forró citrát pufferes antigénfeltárással sikerült megjelenítenünk. Érdekes módon a PFA maszkírozó hatása akkor is elkerülhető volt, ha a gyorsfagyasztott gerincvelői metszeteket PBS-sel mostuk a PFA fixálás előtt. A jelenség magyarázata lehet, hogy a fixálást megelőző mosási periódus elég hosszú ahhoz, hogy a kölcsönható partner lebomoljon, vagy a citoplazmába diffundáljon.

Az siRNS kezelés hatása a PI4K230 nukleoláris festődésére

A PI4K230 nukleoláris immunreaktivitásának további igazolása céljából megvizsgáltuk a PI4K230 specifikus siRNS kezelés hatását a fehérje expressziójára. COS-7 sejtek ismételt siRNS transzfekcióját követő harmadik napon az etanol- fixált sejtek PI4K230 tartalmának jelentős -nukleoláris formát is érintő- csökkenését figyeltük meg, ugyanakkor a sejtmagban gyenge, diffúz immunreaktivitást tapasztaltunk. A PI4K230 mRNS szint változását az siRNS kezelést követően 24 óra múlva vizsgáltuk, mivel a hosszabb ideig tartó kezelés toxicitása nagymértékű sejtpusztulást eredményezett. Az RNS preparálást követően elvégzett RT-PCR majd hagyományos PCR reakció eredménye már 24 órás kezelés után egyértelműen mutatta a PI4K230 mRNS szint csökkenését, ugyanakkor a kontrollként használt GAPDH mRNS szintje nem változott.

A Triton X-100 kezelés hatás a PI4K230 intracelluláris megjelenésére

Mivel már több magban található foszfoinozítid kinázról kimutatták, hogy detergenssel nem oldható proteo-lipid komplexekben található, ezért teszteltük a TX-100 kezelés hatását a PI4K230 sejten belüli eloszlására. A B50 sejteken alkalmazott, fixálást megelőző 5 perces TX-100 (0,5% TX-100 TPBS-ban) kezelés a citoplazmatikus PI4K230 jel csökkenését, a nukleáris jel kismértékű növekedését eredményezte. A párhuzamosan használt nukleolin jelölés intenzitásának jelentős csökkenése és fragmentálódása egyértelműen jelezi a TX-100 nukleoluszra gyakorolt roncsoló hatását. A különböző idejű (5-60 perc) TX-100

kezelésnek kitett B50 sejtek konfokális mikroszkópos szeletein a PI4K230 jelölés eloszlását kvantitatívan elemezve elmondható, hogy a PI4K230 egy jelentős része már 5 perces TX-100 kezeléssel kivonható a sejtéből de ez túlnyomórészt a citoplazmából származik. Ez idő alatt a sejtmagban kis mennyiségű növekedés, a magvacskában pedig csökkenés tapasztalható. Hosszabb idejű TX-100 inkubáció után a citoplazmatikus enzim eloszlása egy állandó szinten stagnál, míg a nukleoláris frakció lassú de folyamatos csökkenést mutat, bár ez a nukleoláris jel mindvégig megőrzi domináns jellegét. Ezen megfigyelések alapján megállapítható, hogy a PI4K230 a sejtmagvacska komponenseihez TX-100 rezisztens formában kötődik.

A DNáz és RNáz előkezelés hatása a PI4K230 nukleoláris lokalizációjára

A sejtmagvacskában a PI4K230 enzimmel kölcsönható komponens felderítése céljából megvizsgáltuk a DNáz I és RNáz A kezelés hatását a PI4K230 immunfestődésére. A maghártya permeabilizálására szolgáló TX-100 kezelés nem okozott feltűnő változást a PI4K230 nukleoláris festődésében, ha azonban a permeabilizált sejteket DNáz I vagy RNáz A oldatban inkubáltuk, a PI4K230 nem mutatott nukleoláris jelenlétet. A DNáz ill. RNáz mobilizálhatóság alapján feltételezhető, hogy a PI4K230 a nukleolusban nukleinsavakkal alkotott komplexekben található.

Expresszált PI4K230 és deléciós mutáns formáinak lokalizációja

A transzfektált COS-7 sejtekben a rekombináns fehérjék megjelenését 2 napos expressziót követően vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy sem a teljes sem a deléciós mutáns PI4K230 formák nem fordulnak elő a sejtmagvacskában, szemben az endogén PI4K230 nukleoláris jelenlétével. Néhány alkalommal azonban a PI4K Δ 130 nukleoláris transzlokációját figyeltük meg, illetve az expresszált PI4K230 holoenzim esetében néhányszor diffúz sejtmagi feldúsulást tapasztaltuk, amikor a Crm1 export rendszert specifikusan gátló Leptomycin B kezelést is alkalmaztunk.

Expresszált PI4K230 sejtmagi importja permeabilizált HeLa sejtekben

Kezdeti digitoninnal permeabilizált HeLa sejteken végzett kísérleteinkben az Sf9 sejtekben expresszált PI4K230 határozott sejtmagi feldúsulását tapasztaltuk „energia regeneráló rendszerrel” kiegészített retikulocita lizátum tartalmú közegben. A PI4K230 sejtmagi transzportja elmaradt, ha a közeghez a nukleáris transzlokációt gátló- búzacásra lektint adtunk. Kontroll kísérleteinkben az import ligand transzportját vizsgáltuk (SV40 vírus NLS rodaminnal jelölt BSA-hoz kapcsolva) a fent bemutatott lektin nélküli és lektin tartalmú

retikulocita lizátumos közegben. Az import ligand expresszált NLS2-val azonos megjelenése bizonyítja a kísérleti rendszer helytállóságát.

A PI4K230 monopartit NLS-e (NLS1) sejtmagba irányító információt hordoz

A PI4K230 szerkezetében szekvenciahomológiai vizsgálatok szerint két klasszikus, egy monopartit NLS (NLS1) és egy bipartit NLS (NLS2) található. Emellett a PI4K230 egy szakasza részleges szekvenciahomológiát mutat a foszfolipid szkrambláz ncNLS-ével (NLS3). Ezen régiók további vizsgálatához a három feltételezett NLS szekvenciáját magába foglaló peptidet szintetizáltattunk és a szintetikus peptideket méretnövelés céljából Alexa Fluor 488 festékkel jelölt BSA-hoz kapcsoltuk. Az így kapott NLS peptid-Alexa488BSA komplexeket retikulocita lizátumos import kísérletekben vizsgáltuk. Az aspecifikus kötődések kizárása érdekében a transzport szempontjából kritikus, bázikus aminosavakban mutáns peptideket is szintetizáltattunk (elnevezés: NLS1mut, NLS2mut).

Retikulocita lizátumos import kísérletekben vizsgálva az NLS1-Alexa488BSA transzportálódott a sejtmagba és egész magot kitöltő diffúz megjelenést mutatott, szemben az NLS2-Alexa488BSA és NLS3-Alexa488BSA peptidekkel, melyek nem dúsultak fel a sejtmagban. Az NLS1-Alexa488BSA retikulocita lizátumos rendszerben tapasztalható sejtmagi importja elmaradt a szignál-függő transzportot gátló lektin jelenlétében, vagy ha az import rendszer energiaforrásként nem hidrolizáló GTP analógot, GTP γ S-t használtunk. A kontroll NLS1mut- és NLS2mut-Alexa488BSA fehérjék esetében szintén nem volt sejtmagi transzport. Bár az NLS2-Alexa488BSA nem mutatott sejtmagi megjelenést, a fluoreszcens jel perinukleáris feldúsulása az NLS2 peptid és a transzport faktorok közötti kölcsönhatásra utalhat.

Az NLS1 sejtmagi transzportja importin α 1/ β és importin α 3/ β heterodimer transzport faktorok közreműködésével történik

További kísérleteinkben megvizsgáltunk az importinok részvételét az NLS-származékok transzportjában. Ezen vizsgálatok során (retikulocita lizátum helyett) az „ATP regeneráló rendszerrel”, Ran mix-szel és NTF2-vel kiegészített import kísérlet közegéhez kívülről biztosítottuk a rekombináns transzport faktorokat. Az NLS1-Alexa488BSA sejtmagi feldúsulása abban az esetben volt megfigyelhető, ha az import közeg importin α 1 és β vagy importin α 3 és β heterodimereket tartalmazott. Ezzel szemben importin α 5/ β dimereket vagy önálló importinokat tartalmazó közegekben a transzport elmaradt.

Az NLS-peptidek és importinok közötti in vitro kölcsönhatás összefügg transzportjuk jellegével

Az NLS-ek és az önálló importinok valamint importin α/β dimerek közötti közvetlen kölcsönhatást felülrétegzéses dot-blot kísérletek segítségével is megvizsgáltuk. Eredményeink alátámasztják korábbi megfigyeléseinket: az NLS1-Alexa488BSA erősen köti az importin $\alpha1/\beta$ és importin $\alpha3/\beta$ dimereket ugyanakkor monomer importinokkal nem asszociál, szemben az NLS1mut-Alexa488BSA fehérjével, amely egyetlen esetben sem mutat kötődést, az NLS2mut-Alexa488BSA-hoz hasonlóan. Importin $\alpha5$ -tel és importin $\alpha5/\beta$ dimerekkel az NLS1 és NLS2 származékok csak nagyon gyengén vagy egyáltalán nem asszociálnak. Az NLS3-Alexa488BSA és a kontrollként alkalmazott Alexa488BSA egyetlen monomer és dimer importinnal sem lép kölcsönhatásba. Érdekes módon az NLS2-Alexa488BSA szintén erősen köti az importin $\alpha1/\beta$ és $\alpha3/\beta$ dimereket valamint az importin β -t, ami összhangban lehet perinukleáris feldúsulásával, ugyanakkor a teljes transzport hiányának oka megválaszolatlan maradt.

Ezen megfigyelések alapján megállapítható, hogy a PI4K230 sejtmagi importja egy receptor-függő folyamat, amely a fehérje NLS1 szekvenciájával közvetlen kölcsönhatásba lépő importin $\alpha1/\beta$ és importin $\alpha3/\beta$ dimerek által vezérelt útvonalakon történhet.

Az expresszált NLS2 peptid (1166-1667 aminosavak) hatékonyan transzportálódik a magvacskába

Ahogy azt korábban bemutattuk, az NLS2-Alexa488BSA fehérje nem transzportálódott a HeLa sejtek magjába, viszont kötődött importinokkal.. Emiatt további kísérleteinkhez az általunk klónozott és expresszált NLS2-t használtuk (magába foglalja a PI4K230 1166-1667 aminosavnyi szakaszát) melynek 57 kDa-os molsúlya meghaladja a magpórus komplexek diffúziós határértékét. Az Alexa Fluor 488 festéssel jelölt expr.NLS2 nem csupán transzportálódott a sejtmagba, hanem a sejtmagvacskában akkumulálódott. Az expr.NLS2-Alexa488 importja lektin-érzékeny, energia-függő transzport, amelynek nukleoláris feldúsulását tapasztaltuk importin $\alpha1/\beta$ és $\alpha3/\beta$ dimerekkel, míg a többi kombinációban a transzport elmaradt. Ezen megfigyelések összhangban vannak a dot-blot felülrétegzéses kísérletek eredményeivel. A mutáns expr.NLS2 forma egyetlen esetben sem mutatott transzportot és közvetlenül sem kötődött importinokhoz a dot blot kísérletben.

A PI4K230 feltételezett bipartit NLS-e mégis funkcionáló NLS lehet amely valószínűleg akkor hatékony ha az NLS a megfelelő molekuláris környezetben található. Mindez a környező aminosavak szerepét hangsúlyozza, melyek befolyásolhatják a szignál

szekvencia hatását az NLS által közvetített importra. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy egy hosszabb, szintetikus NLS2 peptid azonos kísérleti körülmények között nem mutatta az exprNLS2-Alexa488-nál megfigyelhető, importin α/β specifikus transzportot.

Az NLS2 sejtmagvacskába irányító információt hordoz

További vizsgálataink annak felderítésére irányultak, hogy mely szekvenciák közreműködésével valósul meg az expr.NLS2-Alexa488 sejtmagvacska-transzportja. Bár konszenzus nukleoluszba irányító (targeting) szignál (NTS) szekvenciákról nincs tudomásunk, a megismert NTS-ek közös jellemzője a bázikus aminosav-gazdagság, hasonlóan a klasszikus NLS-ekhez. Szekvenciahomológiai vizsgálatainkkal nagyfokú hasonlóságot találtunk a humán angiogenin NTS-e és a PI4K230 bipartit NLS-ének hátulsó bázikus fele között. Az NTS-ek bázikus sajátosságát alapul véve 3 szintetizált peptid esetében is megvizsgáltuk a nukleoluszba irányító képességet: az NLS2 elülső bázikus része (NLS2/1), az NLS2 angiogenin homológ hátulsó bázikus része (NLS2/2) és a teljes hosszúságú NLS2. A szintetizált peptideket Alexa Fluor 488 festékkel jelölt tripszin inhibítorhoz (trp.inh.) kapcsoltuk. Az így kapott fehérjék mólsúlyuk alapján szabad diffúzióval mozognak a magpórus komplexen keresztül, így a kísérletek során tapasztalt nukleáris / nukleoláris akkumuláció kizárólag a sejtmag valamely komponensével való közvetlen kölcsönhatással magyarázható.

Kontroll kísérleteinkben az Alexa488trp.inh.-t használtuk, amely a permeabilizált HeLa sejtek magjában semmilyen akkumulációt nem mutatott. Az NLS1-Alexa488trp.inh. (egy halvány jeltől eltekintve) szintén nem dúsult fel a sejtmagban / nukleoluszban, ami arra utal, hogy az NLS1 peptid alapvetően nem hordoz NTS információt és nem lép kapcsolatba a sejtmag / magvacska komponenseivel. A gyenge, diffúz magplazmatikus jelölés mellett határozott nukleoláris akkumulációt tapasztaltunk az NLS2/1-Alexa488trp.inh. esetében, míg az NLS2/2-Alexa488-trp.inh jóval gyengébb nukleoláris megjelenést mutatott. A permeabilizált HeLa sejtek sejtmagvacskájában tapasztalható feldúsulás a teljes NLS2-Alexa488trp.inh. esetében volt a legkifejezettebb, szintje jóval meghaladta azt a mértéket, amit az NLS2 fragmentjei esetében tapasztaltunk. Ezen eredmények is hangsúlyozzák az NLS szekvenciák aktuális molekuláris környezetének jelentőségét.

Az előző szintetikus peptidek (NLS2/1, NLS2/2, teljes NLS2) NLS1-Alexa488BSA-hoz kapcsolva, hasonló arányú nukleoláris feldúsulást mutattak mint amelyet a Alexa488trp.inh.-hoz kapcsolt peptidek esetében tapasztaltunk. A teljes NLS2 szignál magvacskába irányító „erejét” jól szemlélteti az NLS2-NLS1-Alexa488BSA-val elvégzett

import kísérlet, melynek eredményeként az összes sejtmagba transzportálódott molekula a sejtmagvacskában akkumulálódott. Összegezve eredményeinket elmondhatjuk, hogy az NLS1 kizárólag sejtmagba irányító információt hordoz szemben az NLS2-vel, amely közreműködik mind a sejtmagi (környező szekvenciákkal együtt), mind a nukleoláris import folyamatokban.

KÖVETKEZTETÉSEK

- A PI4K230 fehérje 4 különböző epitóp-specifikus antitest felhasználásával, indirekt immunfluoreszcenciával kimutatható az etanollal fixált neuronális és nem-neuronális sejtek nukleoluszában, ahol a kolokalizációs vizsgálatok szerint elsősorban a denz fibrilláris komponensben jelenik meg.
- A PFA kezelés immunobloton és sejt lizátumban nem befolyásolja a PI4K230 immunreaktivitását, de a magvacskában feltehetően a PI4K230-al szorosan asszociáló makromolekulákkal keresztkötve reverzibilisen maszkírozza annak immunreaktív epitópjait.
- Az siRNS kezelés következtében tapasztalható endogén PI4K230-szint csökkenés elsősorban a citoplazmatikus és a nukleoláris formát érinti. A megmaradt fehérjék jelentős része a sejtmagban akkumulálódik.
- A PI4K230 detergens-rezisztens módon, valószínűleg proteo-lipid komplexekben található a sejtmagvacskában és közvetlen vagy közvetett kapcsolatban áll a nukleolusz DNS és / vagy. RNS komponenseivel.
- Bár a transzfektált COS-7 sejtek rekombináns PI4K230 fehérjéje 2 napos kifejeződést követően sem jelenik meg a sejtmagban, az Sf9 sejtekben expresszált PI4K230 retikulocita lizátumos import rendszerrel transzportálódik a digitoninnal permeabilizált HeLa sejtek magjába.
- A PI4K230 monopartit NLS-e (NLS1) által közvetített sejtmagi import lektin-érzékeny, energia-függő folyamat, amely az NLS1 szekvenciával közvetlen kölcsönhatásba lépő importin $\alpha 1/\beta$ és importin $\alpha 3/\beta$ dimer transzport faktorok által vezérelt útvonalakon történik.
- A PI4K230 bipartit NLS-ét magába foglaló expresszált peptid (506 aminosav) lektin és energia-függő módon, importin $\alpha 1/\beta$ és importin $\alpha 3/\beta$ dimer transzport faktorokkal importálódik a sejtmagba, illetve a nukleoluszba. Habár a szintetikus bipartit NLS szekvencia (NLS2) nem képes a BSA sejtmagi transzportját előidézni, azonban a kis molsúlyú tripszin inhibítorhoz kapcsolva, mely akadálytalanul halad át az NPC-n, annak nukleoláris feldúsulását okozza. Ebben a tekintetben a teljes NLS2 hatékonyabb nukleoláris akkumulációt eredményez, mint fragmentjei.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Heilmeyer L. M. G. jr., Vereb G. Jr., Vereb G., **Kakuk A.**, Szivák I. (2003): Mammalian phosphatidylinositol 4-kinases. IUBMB Life 55.: 59-65. (IF: 2,3)

Kakuk A., Friedländer E., Vereb G. Jr., Kása A., Balla A., Balla T., Heilmeyer L. M. G. Jr., Gergely P., Vereb G. (2006) Nucleolar localization of phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230 in various mammalian cells. Cytometry A 69A: 1174-1183 (IF: 3,3)

Kakuk A., Friedländer E., Vereb G. Jr., Lisboa D., Bagossi P., Tóth G., Gergely P., Vereb G. Nuclear and nucleolar localization signals and their targeting function in phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230. Experimental Cell Research (közlésre elfogadva) (IF₂₀₀₆: 3,7)

Az értekezéshez kapcsolódó előadások, poszterek

Gülkan H., Suer S., **Kakuk A.**, Szivák I. (2001): Phosphatidylinositol 4-kinases. International Symposium on Structures and Mechanisms in Biological Signal and Energy Transduction. Dabringhausen, Germany. 25.

Kakuk A., Vereb Gy., Petrasch Parwez E., Heilmeyer L. M. G., Gergely P. (2001): A foszfatidilinozitol 4-kináz PI4K230 izoformájának kimutatása neuronális sejtek nukleoluszában immunfluoreszcenciával. IX. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Debrecen. 108.

Friedlander E., **Kakuk A.** (2002): A foszfatidilinozitol 4-kináz PI4K230 izoformájának lokalizációja neuronális sejtekben. IX. Tudományos Diákköri Konferencia, Marosvásárhely, Románia. 32.

Kakuk A., Vereb Gy., Gergely P., Friedlander E., ifj. Vereb Gy. (2003): Cos-7 sejtekben expresszált foszfatidilinozitol 4-kináz „PI4K230” izoformájának és deléciós mutáns változatainak szubcelluláris lokalizációja. XI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok. 10.

Kakuk A., Vereb Gy., Gergely P., Zsebik B., ifj. Vereb Gy. (2003): A foszfatidilinozitol 4-kináz „PI4K230” izoformájának és deléciós mutáns változatainak szubcelluláris lokalizációja.

A Magyar Biokémiai Egyesület, Molekuláris Biológiai Szakosztálya 8. Munkaértekezlete, Tihany. 42.

Kakuk A., Zsebik B., ifj. Vereb Gy., Gergely P., Vereb Gy. (2003): A „PI4K230” foszfatidilinozitol 4-kináz nukleáris transzlokációjának vizsgálata. Magyar Biokémiai Egyesület, II. Jelátviteli Konferencia, Hőgyész. 41.

Kakuk A. (2003): Cos-7 sejtekben expresszált foszfatidilinozitol 4-kináz „PI4K230” izoformájának és deléciós mutáns változatainak szubcelluláris lokalizációja. PhD és TDK Tudományos Diáktalálkozója, Debrecen. 78.

Kakuk A., Zsebik B., ifj. Vereb Gy., Gergely P., Vereb Gy. (2004): A „PI4K230” foszfatidilinozitol 4 kináz nukleáris transzportjának vizsgálata. Magyar Biokémiai Egyesület, Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. Munkaértekezlete, Sopron. 138.

Kakuk A. (2004): A „PI4K230” foszfatidilinozitol 4 kináz nukleáris transzlokációjának vizsgálata. PhD és TDK Tudományos Diáktalálkozója, Debrecen. 89.

Kakuk A., Szivák I., Vereb G. jr., Heilmeyer L. M. G. jr., Vereb G. (2004): Nuclear transport of the phosphatidylinositol 4-kinase isoform PI4K230. International Meeting on the Topogenesis of Organellar Proteins, Bochum, Germany. 54.

Kakuk A., Kása A., Friedländer E., ifj. Vereb Gy., Balla A., Balla T., Vereb Gy. (2006) A „PI4K230” foszfatidilinozitol 4-kináz izoforma nukleoláris előfordulásának kísérletes vizsgálata. Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlés, Pécs 52.

Kakuk A., Friedländer E., Vereb Gy. Jr, Petrasch-Parwez E., Balla T., Heilmeyer L, Gergely P., Vereb Gy. (2006): Nucleolar localization of phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230 in various mammalian cells. 31st FEBS Congress, Istanbul, Turkey 161.

Friedländer E., **Kakuk A.,** Vereb Gy. Jr., Heilmeyer L.M.G., Gergely P., Vereb Gy. (2006): A foszfatidilinozitol 4-kináz PI4K230 izoformája számos emlős sejtben nukleoláris lokalizációt mutat. V. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest 75.