

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

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

2008

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
2. 1. FOSZFOINOZITIDEK ÉS PI4-KINÁZOK	8
2. 1. 1. A foszfoinozitidek jelentősége, a foszfatidilinozitol ciklus.....	8
2. 1. 2. A PtdIns kinázok jellemzése.....	10
2. 1. 2. 1. PI 3-kinázok	10
2. 1. 2. 2. PIP-kinázok	11
2. 1. 2. 3. PI 4-kinázok	11
2. 1. 2. 3. 1. A PtdIns 4-kináz izoformák enzimológiai jellemzése és szöveti előfordulása	11
2. 1. 2. 3. 2. A PtdIns 4-kinázok szerkezete	14
2. 1. 2. 3. 3. A PtdIns 4-kinázok intracelluláris lokalizációja és funkcióik	17
2. 2. SEJTMAGTRANSPORT.....	25
2. 2. 1. A RanGTPáz ciklus.....	26
3. METODIKÁK	31
3. 1. ALKALMAZOTT ANTITESTEK.....	31
3. 2. IMMUNHISZTOKÉMIA.....	32
3. 2. 1. Preparálási technikák.....	32
3. 2. 2. Immunfluoreszcenciás jelölés	32
3. 2. 3. Citrát pufferes antigénfeltárás.....	33
3. 3. SEJTVONALAK ÉS FENNTARTÁSUK.....	33
3. 4. IMMUNCITOKÉMIA.....	34
3. 4. 1. B50 sejtek TX-100 és nukleáz kezelése	34
3. 5. COS-7 SEJTEK siRNS KEZELÉSE	34
3. 5. 1. Az siRNS kezelés hatékonyságának vizsgálata RT-PCR technikával	35
3. 6. COS-7 SEJTEK TRANSZFEKTÁLÁSA	36
3. 7. PI4K230 EXPRESSZIÓ Sf9 SEJTEKBEN.....	37
3. 7. 1. A PI4K230 cDNS klónozása bakulovírusba	37
3. 7. 2. Vírustiter meghatározás	38
3. 7. 3. PI4K230 expresszió.....	38
3. 8. PI4K AKTIVITÁSMÉRÉS	39
3. 9. BAKTÉRIUMOK TENYÉSZTÉSE, TÁROLÁSA	40
3. 10. FEHÉRJÉK EXPRESSZÁLÁSA BAKTÉRIUMOKBAN	40
3. 10. 1. Baktériumok kompetenssé tétele.....	40
3. 10. 2. Transzformáció.....	41
3. 10. 3. Fehérjék expresszálása.....	41
3. 10. 4. Fehérjék tisztítása nikkel-agarózon.....	43
3. 10. 5. Fehérjék tisztítása GSH-sepharose-on	43
3. 11. SZINTETIKUS PEPTIDEK KAPCSOLÁSA ALEXA FLUOR 488 FLUORESZCENS FESTÉKKEL JELÖLT BSA-HOZ ÉS TRIPSZIN INHIBÍTORHOZ.....	44
3. 12. NLS2 KLÓNOZÁSA, EXPRESSZIÓJA, TISZTÍTÁSA, JELÖLÉSE	45
3. 13. AZ EXPR.NLS2 SEJTMAGI TRANSPORTJA SZEMPONTJÁBÓL KRITIKUS, BÁZIKUS AMINOSAVAK IRÁNYÍTOTT MUTAGENEZISE.....	47
3. 14. A SEJTMAGI IMPORT IN VITRO VIZSGÁLATA.....	48
3. 15. FEHÉRJE-FEHÉRJE KÖLCSONHATÁS VIZSGÁLATA DOT-BLOT FELÜLRÉTEGZÉSSSEL	50
3. 16. NUKLEINSAV ÉS FEHÉRJE KONCENTRÁCIÓMÉRÉS.....	50
3. 17. SDS-POLIAKRILAMID GÉELEKTROFORÉZIS (SDS-PAGE) ÉS IMMUNOBLOT	50
3. 18. KONFOKÁLIS MIKROSKÓPIA	51
3. 19. DIGITÁLIS KÉPELEMZÉS	51
3. 20. MOLEKULAMODELLEZÉS	52

4. EREDMÉNYEK	53
4. 1. A PI4K230 DETEKTÁLÁSA AZ ETANOLLAL FIXÁLT SEJTEK MAGVACSKÁJÁBAN	53
4. 2. A PFA HATÁSA A PI4K230 IMMUNREAKTIVITÁSÁRA	59
4. 3. IMMUNREAKTIV EPITOPOK FELTÁRÁSA PFA-FIXÁLT SEJTEK NUKLEOLUSZÁBAN	59
4. 4. A PI4K230 SEJTEN BELÜLI LOKALIZÁCIÓJÁNAK VÁLTOZÁSA siRNS-SEL KEZELT COS-7 SEJTEKBEN	60
4. 5. A TX-100 KEZELÉS HATÁSA A PI4K230 LOKALIZÁCIÓJÁRA	62
4. 6. DNÁZ ÉS RNÁZ ELŐKEZELÉS HATÁSA A PI4K230 NUKLEOLÁRIS LOKALIZÁCIÓJÁRA	62
4. 7. COS-7 SEJTEKBEN EXPRESSZÁLT PI4K230 HOLOENZIM ÉS DELÉCIÓS MUTÁNS FORMÁINAK VIZSGÁLATA	64
4. 8. A PI4K230 SEJTMAGI IMPORTJÁNAK VIZSGÁLATA	67
4. 8. 1. Sf9 sejtekben expresszált PI4K230 sejtmagi importja permeabilizált HeLa sejtekben	67
4. 8. 2. A PI4K230 monopartit NLS-e (NLS1) sejtmagba irányító információt hordoz	68
4. 8. 3. Az NLS1 sejtmagi transzportja importin $\alpha 1/\beta$ és importin $\alpha 3/\beta$ heterodimer transzport faktorok közreműködésével történik	72
4. 8. 4. Az expresszált NLS2 peptid (1166-1667 aminosavak) hatékonyan transzportálódik a magvacskába	75
4. 8. 5. Az NLS2, mint sejtmagvacskába irányító szignál	78
5. MEGBESZÉLÉS	82
6. ÖSSZEFOGLALÁS	92
SUMMARY	93
7. IRODALOMJEGYZÉK	94
8. TÁRGYSZAVAK	108
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	109

Rövidítések jegyzéke:

Arf:	ADP-ribosilációs faktor
BSA:	Szarvasmarha szérum albumin
cNLS:	Klasszikus nukleáris lokalizációs szignál
DAG:	1,2-diacylglicerol
DTE:	Ditio-eritritol
EDTA:	Etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA:	Etilénglikol-bisz (β-aminoetil-éter)
ER:	Endoplazmatikus retikulum
GAPDH:	Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GFP:	Zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
GST:	Glutation S-transzferáz
HA:	Hemagglutinin
HEPES:	N (2-hidroxietil)-piperazin-N'-(2-etánszulfonsav)
HRP:	Torma peroxidáz (horse-radish peroxidase)
IP₃:	Inozitol- 1,4,5-triszfoszfát
IPTG:	Izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid
LKU:	Lipid kináz specifikus domén (lipid kinase unique)
MVB:	Multivezikuláris testek (multivesicular body)
ncNLS:	Nem klasszikus nukleáris lokalizációs szignál
NGF:	Idegi növekedési faktor (nerve growth factor)
NLS:	Nukleáris lokalizációs szignál
NPC:	Magpórus komplex (nuclear pore complex)
NS:	Normál szérum
NTF:	Nukleáris transzport faktor
NTS:	Sejtmagvacskába irányító szignál (nucleolar targeting signal)
PAO:	Fenilarzin oxid
PBS:	Foszfát puffer, sóval pH 7,4 (Phosphate-buffered saline)
PBST:	0,1% Tween-20 / PBS
PFA:	Depolimerizált paraformaldehid
PH domén:	Pleckstrin homológia domén
Pi:	Anorganikus ortofoszfát
PJ:	Propídium-jodid
PI3K:	Foszfatidilinozitol 3-kináz (PtdIns 3-kináz)
PI4K:	Foszfatidilinozitol 4-kináz (PtdIns 4-kináz)
PIPK:	Foszfatidilinozitol 3 vagy 4-foszfát 5-kináz

PI3P:	Foszfatidilinozitol transzfer protein
PKA:	cAMP-függő protein kináz
PKC:	Protein kináz C
PKG:	cGMP-függő protein kináz
PLC:	Fosfolipáz C
PtdIns:	1-(3-sn-foszfatidil)-D-mio-inozitol
PtdIns (4)P:	1-(3-sn-foszfatidil)-D-mio-inozitol 4-foszfát
PtdIns (4,5)P₂:	1-(3-sn-foszfatidil)-D-mio-inozitol 4,5 biszfoszfát
RanBP:	Ran kötő fehérje (Ran binding protein)
RanGAP:	RanGTPáz aktiváló fehérje
RanGEF:	Ran guanin nukleotid cserélő faktor
SDS-PAGE:	Nátrium-dodecil-szulfát- poliakrilamid gélelektroforézis
SH2 domén:	SRC homológia domén-2
SH3 domén:	SRC homológia domén-3
TGN	Transz-Golgi hálózat (trans-Golgi network)
Tris:	Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán
TX-TPBS:	0,5% Triton X-100 / 10 mM Tris / PBS
WT:	Wortmannin

1. Bevezetés

A foszfoinozitidek a foszfatidilinozitol (PtdIns) foszforilált származékai, és bár kis hányadát teszik ki a sejtek membránjait alkotó lipideknek, mégis kulcsszerepet játszanak szinte minden sejtfunkció szabályozásában.

A foszfoinozitidek foszforilációja, defoszforilációja vagy hidrolízise számos jelátviteli folyamat része. A foszfatidilinozitol (PtdIns) inozitol gyűrűjét a lipid kinázok D3, D4 ill. D5 helyzetben foszforilálhatják amelynek során hét különböző termék jöhet létre. A D4 helyzetben (is) foszforilált foszfoinozitidek [PtdIns (4)P, PtdIns (4,5)P₂, PtdIns (3,4)P₂, PtdIns (3,4,5)P₃] bioszintézisében többnyire a foszfatidilinozitol 4-kinázok (PI4K) katalizálják az első lépést, emiatt jelentőségük kiemelkedő. Emlős sejtekben a PI4-kinázoknak 4 izoformája létezik: PI4K55 α , PI4K55 β , PI4K92, PI4K230 (alternatív jelölésük PI4KII α , PI4KII β , PI4KIII β , PI4KIII α). Ezek eltérő enzimológiai viselkedése, lokalizációja és doménszerkezete eltérő intracelluláris feladatra és szabályozásra utal.

A D4-helyzetben foszforilált foszfolipidek legrégebben ismert funkciója hogy - a klasszikus szignálútvonalban - másodlagos hírvivő molekulák (inozitol- 1,4,5-triszfoszfát (IP₃) és diacilglicerol (DAG)) előanyagai, amelyeket a foszfolipáz C (PLC) extracelluláris stimulus hatására hoz létre a PtdIns(4,5)P₂ hasításával. A klasszikus jelpálya mellett a PtdIns(4)P szerepét számos más sejtműködésben is bizonyították. Ma már tudjuk, hogy a PtdIns (4)P és származékai saját maguk is szabályozó molekulának tekinthetők. Ezt alátámasztja, hogy a polifoszfoinozitidek képesek szabályozó hatást kifejteni a foszfolipid kötő doménnal rendelkező fehérjékre. Emellett a foszfoinozitidek lokális képződése a sejt kompartmentjeiben jelátviteli mikrodomének szerveződéséhez vezet a velük asszociálódó fehérjemolekulák reverzibilis egybegyűjtésével. Az elmúlt években nagy számban találtak olyan kinázokat és foszfatázokat is, amelyek inozitidekhez kapcsolódva működnek (Fruman és mtsai., 1998; Mayerus és mtsai., 1999). Mindezek alapján ártértekelődik a foszfoinozitidek és az őket szintetizáló enzimek sejtben betöltött funkciója.

Az elmúlt időszak fontos felismerése volt az is, hogy a foszfoinozítid ciklus intermedierei jelen vannak a sejtmagban is a maghártyától független proteolipid komplexek formájában. Részvételük nélkülözhetetlen a sejtosztódásban, differenciálódásban, sejtciklus szabályozásában, transzkripcióban, kromatin szerkezet és génexpresszió szabályozásában. A sejtmagi foszfoinozitidek szintézisében is kiemelkedő jelentőségű a ciklus kezdeti lépését katalizáló PI4-kinázok szerepe. A PI4K55 és PI4K92 izoformák doménszerkezetében

nukleáris lokalizációs szignált valószínűsítettek és ezzel összhangban jelenlétüket kimutatták a sejtmagban. Rajtuk kívül a PI4K230 is több feltételezett NLS-t (nukleáris lokalizációs szignált) és DNS kötésre szolgáló motívumot tartalmaz, így potenciálisan alkalmas sejtmagi funkció betöltésére. Emellett gazdag doménszerkezete számos fehérje-fehérje és fehérje-lipid kölcsönhatást is lehetővé tesz. Mindennek ellenére a PI4K230 lokalizációjával foglalkozó korábbi közlemények sejtmagi előfordulásáról nem számoltak be.

Munkánk kezdetén célul tűztük ki a PI4K230 intracelluláris lokalizációjának feltérképezését indirekt immunfluoreszcenciás technikával az enzimet nagy mennyiségben expresszáló neuronális szövetekben, valamint ideg és nem-idegi eredetű sejtvonalakon.

Előkísérleteink során fixálószerből függően észleltük a PI4K230 jelenlétét a sejtmagon belül a sejtmagvacskában, ami eredményünk többirányú megerősítésére ösztönzött bennünket. Mivel a formaldehid fixálás maszkírozó hatása makromolekulákkal való szoros asszociációra utalt, megvizsgáltuk, hogy van-e kölcsönhatás a sejtmagvacskában lévő PI4K230 és a nukleoláris DNS és RNS között, valamint azt, hogyan befolyásolják detergensok az enzim nukleoláris lipidekkel kialakított kapcsolatát. Vizsgálatokat terveztünk gátló RNS-sel (siRNS) transzfektált sejtekben annak felderítésére, hogy a lecsökkent transzláció milyen hatással van az endogén PI4K230 citoplazmatikus és sejtmagi előfordulására. Más kísérleteink teljes és deléciós mutáns rekombináns PI4K230 formák sejtmagi megjelenésének tanulmányozására irányultak transzfektált sejtekben.

A nukleáris/nukleoláris transzlokáció mechanizmusát vizsgálva arra kerestünk választ, hogy PI4K230-ban feltételezett NLS-ek közül melyek funkcionálnak ténylegesen és milyen import rendszeren keresztül vezérlik a fehérje magi transzportját. Ehhez digitoninnal permeabilizált HeLa sejteken végzett sejtmagi import kísérletekben vizsgáltuk fluoreszcensen jelölt BSA-hoz (szarvasmarha szérum albumin) kapcsolt szintetikus NLS peptidek továbbá egy általunk klónozott és fluoreszcens festékkel jelölt rekombináns NLS peptid sejtmagi transzportját. Az NLS szekvenciák specificitását a transzportban kritikusnak tekintett aminosavak mutációjával vizsgáltuk. Hasonló kísérleti megközelítéssel próbáltuk vizsgálni a PI4K230 feltételezett nukleoluszba irányító (NTS) szekvenciáját is, a magpórusokon szabadon diffundáló, fluoreszcensen jelölt tripszin inhibitorhoz kapcsolt szintetikus, NTS-peptidek transzportjának követésével.

2. Irodalmi áttekintés

2. 1. Foszfoinozitidek és PI4-kinázok

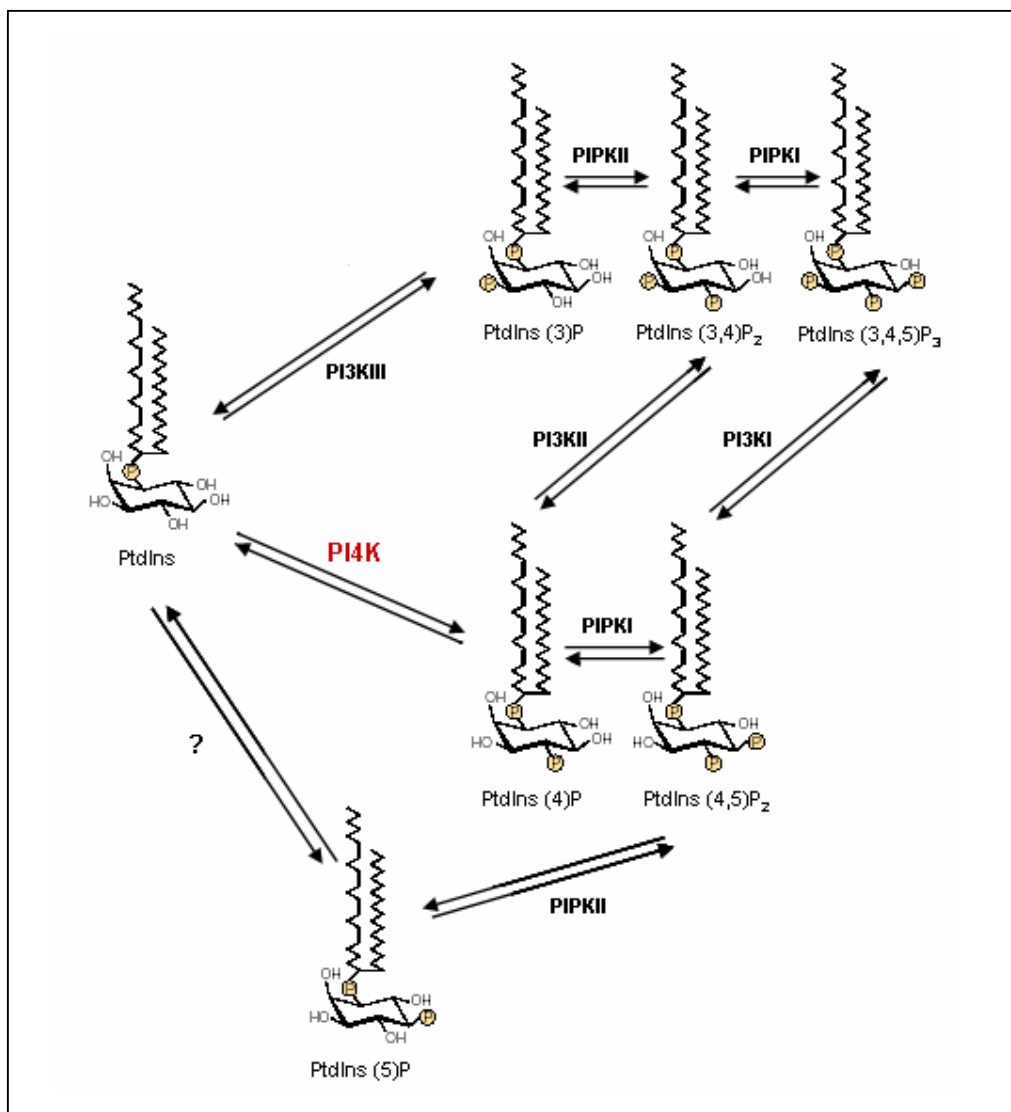
2. 1. 1. A foszfoinozitidek jelentősége, a foszfatidilinozitol ciklus

Az inozitol tartalmú foszfolipidek a sejtek foszfolipid tartalmának csupán 2-8%-át alkotják, mégis kulcsfontosságúak a sejt működésében. A foszfoinozitidek képződése és szabályozó szerepe már több mint ötven éve áll a figyelem középpontjában (Hokin és Hokin, 1953). Mai ismereteink szerint a különféle ingerekre aktiválódó lipid kinázok, foszfatázok és foszfolipázok közreműködésével folyamatosan átformálódó foszfolipid profil sokféle sejtfolyamatra gyakorol szabályozó hatást. A foszfoinozitidek szerteágazó szerepét mutatja, hogy részt vesznek a hormonok, növekedési faktorok és neurotranszmitterek jelátviteli folyamataiban, vezikuláris transzportban, ioncsatorna regulációban, citoskeleton átépülésben, membrán fúzióban, sejtosztódás és transzkripció szabályozásában (Balla, 2001; De Matteis és mtsai., 2005; Fruman és mtsai., 1998; Hinchliffe és mtsai. 1998; Martin 1998; Irvine 2003). Másodlagos hírvivő funkciójukon kívül szabályozó szerepet játszhatnak közvetlen fizikai kontaktus révén is olyan proteinekkel, melyek foszfolipid kötő doménnel rendelkeznek. Ilyen domének: a PH (Pleckstrin homology) (Dowler és mtsai., 2000), PX (Phox homology) (Xu és mtsai., 2001), FYVE (Gaulier és mtsai., 1998), ENTH (De Camilli és mtsai., 2002), PHD (plant homeodomain) (Gozani és mtsai., 2003) és DHR (DOCK homology region) (Cote és mtsai., 2005).

A foszfoinozitidek alapvegyülete a foszfatidilinozitol (PtdIns), melyben az inozitol öt szabad hidroxil csoportjának bármelyike foszforilálódhat (1. ábra). Az érdeklődésünk középpontjában álló foszfatidilinozitol 4 kináz (PI4K) a PtdIns inozitolgyűrűjének D4 helyzetű foszforilálását végzi ATP γ -foszfátjával. Az így keletkezett PtdIns (4)P foszforilációja PtdIns 4-foszfát 5-kinázzal (PIPKI) PtdIns 4,5-biszfoszfátot [PtdIns (4,5)P₂] eredményez. A foszfatidilinozitol 3 kináz (PI3K) az inozitolgyűrű D3 helyzetű foszforilálásával további hatékony foszfoinozitideket (PtdIns (3)P, PtdIns (3,4)P₂ és PtdIns (3,4,5)P₃) hoz létre.

A foszfoinozitidek a plazmamembrán (Michell, 1975) mellett kimutathatók a Golgi apparátusban (Jergil és Sundler, 1983), endoplazmatikus retikulumban (ER) (Cockroft és mtsai., 1985), szarkoplazmatikus retikulumban (Varsányi és mtsai., 1989), lizoszómákban

(Collins és Wells, 1983), különféle vezikulumok (Rouser és mtsai., 1972), maghártyában (Smith és Wells, 1983) és a sejtmagban is (Divecha és mtsai., 1991).



1. ábra: A foszfoinozítid ciklus (forrás: Irvine, 2003; módosította: Kakuk)

A membránok PtdIns (4)P és PtdIns (4,5)P₂ szintje kontrollált módon változik, és bár különböző szignálokra arányuk jelentősen eltolódhat, ez gyorsan visszaáll az eredeti szintre. A ciklus szabályozása összetett, csak részben feltárt folyamat, mely a PI4K és a PI(4P) 5-kináz (PIPKI) aktivitás változásán keresztül valósul meg. Logikusnak tűnik, hogy a PtdIns (4)P keletkezése jelenti a sebességhatározó lépést a további foszfoinozítid származékok képződéséhez. Bár a foszfoinozítidek bioszintézisének fokozódása számos biológiai folyamatban bekövetkezik, a kinázokra kifejtett közvetlen szabályozó hatást eddig csak

néhány esetben sikerült kimutatni, így G-fehérje (Stephens és mtsai, 1993), Rac (Tolias és mtsai, 1995; Wei és mtsai., 2002) Rho (Chong és mtsai, 1994) és Arf (Jones és mtsai., 2000) fehérjék aktiválódása PtdIns (4)P vagy PtdIns (4,5)P₂ koncentráció-növekedést eredményez.

2. 1. 2. A PtdIns kinázok jellemzése

2. 1. 2. 1. PI 3-kinázok

A foszfoinozitidek bioszintézisében jelentős szereppel bír a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K), mely az inozitolgyűrű D3 helyzetű foszforilálásával a PtdIns (3)P, PtdIns (3,4)P₂ és PtdIns (3,4,5)P₃ képzésében vesz részt. A PI3-kinázok doménszerkezeti és enzimkinetikai sajátosságai alapján PI3KI (IA, IB), PI3KII (α , β , γ), és PI3KIII osztályokba sorolhatók (Fruman és mtsai., 1998). A PI3KI élettani körülmények között elsősorban PtdIns (3,4,5)P₃-ot termel, a PI3KII fő szubsztrátja a PtdIns és PtdIns (4)P, a PI3KIII pedig kizárólag a PtdIns-t foszforilálja (Foster és mtsai., 2003).

A PI3K termékei nem szubsztrátjai a PLC-nek de kulcsszerepet játszanak számos sejt folyamatban. A PI3K fontos tényezője az integrin-aktivációs és növekedési faktorok (EGF, PDGF) által kiváltott szignálútvonalnak (Roche és mtsai, 1994) és szerepet játszik a sejtek kitapadásában (Wennstrom és mtsai, 1994), továbbá az apoptózis kivédésében (Yao és Cooper, 1995), virális onkogének hatásának közvetítésében (Carpenter és Cantley, 1990), a szekrécióban (Yano és mtsai, 1993) és a vezikuláris transzportban (Janmey, 1995). A PI3K lipidtermékei foszfoinozitid kötő doméneken (PH, PX és FYVE) keresztül befolyásolják a fehérjék működését (pl.: protein kináz C, Akt) és így szabályozzák a vezikuláris transzportot, mitogenezist és aktin átrendeződést (Carpenter és Cantley, 1996; Fruman és mtsai., 1998; Kanai és mtsai., 2001).

A kísérletes megközelítés szempontjából fontos, hogy a Wortmannin és a nem ionos detergens, mint a TX-100 gátolják a PI3-kinázok aktivitását (Arcaro és Wymann, 1993).

2. 1. 2. 2. PIP-kinázok

A PIP-kinázok az inozitolgyűrű D4 vagy D5 helyzetű foszforilálását végzik (Loijens és mtsai., 1996). Legalább 6 humán izoformát klónoztak, amelyek szubsztrát-specifitásuk alapján két, PIPKI (α , β , γ) és PIPKII (α , β , γ) alcsaládba sorolhatók (Boronenkov és Anderson, 1995; Divecha és mtsai., 1995; Loijens és Anderson, 1996; Castellino és mtsai., 1997; Ishihara és mtsai., 1998; Itoh és mtsai., 1998) A PIPKI a PI4P 5-kináz funkció mellett a PtdIns, PtdIns (3)P és PtdIns (3,4)P₂ D5 helyzetű foszforilálására is képes (Zhang és mtsai., 1997) A PIPKII kinázok D4-kinázok, preferált szubsztrátjuk a PtdIns (5)P vagyis elsősorban PI5P4K funkcióval rendelkeznek –ezáltal egy alternatív útvonalat szolgáltatnak a PtdIns (4,5)P₂ képződés irányába- emellett kisebb affinitással foszforilálják a PtdIns (3)P-ot is (Rameh és mtsai., 1997). PIPKI jelenléte kimutatható a plazmamembránban és a sejtmagban, PIPKII pedig a citoszolban, endoplazmatikus retikulumban, aktin citoszkeletonhoz kötötten és a sejtmagban (Fruman és mtsai., 1998).

2. 1. 2. 3. PI 4-kinázok

2. 1. 2. 3. 1. A PtdIns 4-kináz izoformák enzimológiai jellemzése és szöveti előfordulása

A PtdIns 4-kinázok kimutathatók és nélkülözhetetlenek az eukarióták minden szerveződési szintjén. Legkorábban az élesztőben előforduló enzimek szerkezetét ismerték meg, ezek modellként szolgálhatnak más eukarióta enzimek a vizsgálatához. Legalaposabban az emlős PtdIns 4-kinázokat ismerjük; ezek sem molekulatömegük, sem enzimológiai sajátágaik tekintetében nem egységesek, emellett az egyes típusok eltérő szöveti lokalizációt mutatnak. A PI3-kinázoktól abban különböznek, hogy enzimaktivitásukhoz nem-ionos detergens szükséges.

Csoportosításuk és elnevezésük alapjául munkánkban a molekulatömeget használjuk (Gehrmann és Heilmeyer 1998, Heilmeyer és mtsai., 2003), így három csoport képezhető: 55 kDa-os (PI4K55 α és PI4K55 β) 92 kDa-os (PI4K92) és 230 kDa-os (PI4K230) izoformák. Ezen csoportokat gyakran PI4KII α , PI4KII β , PI4KIII β és PI4KIII α néven is említik (1. táblázat). Bár a csoportnevek konkrét molekulatömeget jelölnek, az egy csoportba tartozó enzimek tömegükben különbözhetnek. Jelen ismereteink alapján az egyes típusok eltérő molekulatömegű formái ugyanazon génről átíródó splice-variánsok, amire a szekvencia

homológia és a jól jellemzett enzimológiai sajátosságok alapján következtethetünk (Carpenter és Cantley, 1990; Balla, 1998; Gehrmann és Heilmeyer, 1998).

55 kDa-os PtdIns 4-kinázok:

PI4K55 α (PI4KII α). gélelektroforézissel meghatározott molekulatömege 45-55 kDa körüli (Porter és mtsai., 1988; Walker és mtsai., 1988). Számos szövetből sikerrel tisztították: fibroblasztból (Whitman és mtsai., 1987), szarvasmarha méhizomból (Porter és mtsai., 1988), birka agyból (Scholz és mtsai., 1991), humán vörösvértestekből (Wetzker és mtsai., 1991; Graziani és mtsai., 1992) és kromaffin sejtekből (Husebye és mtsai., 1990). Klónozása viszonylag későn, szekretorikus, kromaffin granulumokból (Barylko és mtsai. 2001), illetve non-caveolar membrán raftokból sikerült (Minogue és mtsai. 2001).

A **PI4K55 β (PI4KII β)** enzimet Balla és mtsai. (2002) klónozták először, a PI4K55 α -val való szekvencia homológia alapján. A cDNS-e egy 54 kDa-os fehérjét kódol, mely a C-terminális katalitikus régióban nagyfokú homológiát mutat a PI4K55 α -val, az N terminális rész azonban egyedi.

Mindkét típusra jellemző, hogy valószínűleg minden sejtben és szövettípusban expresszálandó enzimek, Northern blottal vizsgálva azonban kimutatható, hogy a PI4K55 α az agy és a perifériás fehérvérsejtek, a PI4K55 β pedig a máj területén dominál a másik izoformával szemben (Balla és mtsai., 2002).

Enzimológiai jellemzőik nagyon hasonlóak: A PI4K55 α ATP iránti affinitása nagy ($K_m=30-100\mu M$), a PI4K55 β alapaktivitása azonban csak kb. 30%-a a PI4K55 α -nak. Mindkét izoforma érzékeny adenzin gátlásra ($K_i=20-100\mu M$), a wortmannin (WT) viszont egyiket sem gátolja. Működésükhöz Mn^{2+} vagy Mg^{2+} szükséges, míg a Ca^{2+} csökkenti az aktivitásukat (Wetzker és mtsai. 1991).

A **PI4K92 (PI4KIII β)** csoport elnevezését arról a Nakagawa és mtsai. (1996a) által patkányból klónozott enzimről kapta, amelynek molekulatömegét c DNS alapján 92 kDa-nak számították. A mellékvesekéregből tisztított PI4K92 moltömegét SDS-PAGE segítségével 110 kDa-nak határozták meg (Balla és mtsai., 1997). Hasonló eredmény született humán klónok vizsgálatával is (Meyers és Cantley, 1997). A PI4K92-nek több splice variánsa létezik (Suzuki és mtsai., 1997), ezek valószínűleg a szövetspecifitásban különböznek. A fehérje kimutatható perifériás szövetekben és a központi idegrendszerben is ahol a fehérállományban és a plexus chorioideus területén önállóan, PI4K230 nélkül fordul elő (Zólyomi és mtsai., 2000).

A PI4K92 ATP iránti affinitása jóval kisebb, mint a PI4K55-é ($K_m=410\mu\text{M}$), adenozin gátlásra kis mértékben érzékeny ($K_i=852\mu\text{M}$), a WT pedig már szubmikromoláris koncentrációban is gátolja ($IC_{50}=50\text{ nM}$). Mg^{2+} és Mn^{2+} az aktivitást növeli, de a Ca^{2+} , ellentétben a PI4K55 izoformával, nem gátolja (Nakanishi és mtsai., 1995).

	PI4K55α	PI4K55β	PI4K92	PI4K230
Egyéb elnevezés	PI4K II α	PI4K II β	PI4K III β	PI4K III α
Moltömeg SDS-PAGE-val	55-56 kDa	55-56 kDa	110 kDa	210 kDa
K_m (ATP- Mg^{2+})	10-50 μM	10-50 μM	410 μM	150-750 μM
Adenozin gátlás (K_i)	10-70 μM	10-50 μM	852 μM	1520 μM
Wortmannin érzékenység (IC_{50})	Nem érzékeny	Nem érzékeny	50-300 nM	50-300 nM
PAO gátlás (IC_{50})	>100 μM	>100 μM	1-5 μM	30 μM
Élesztő homológ	LSB6	LSB6	STT4	PIK1
forrás	Minogue és mtsai., 2000	Balla és mtsai., 2002	Nakanishi és mtsai., 1995	Gehrmann és mtsai., 1999

1. táblázat: A PI4K izoformák jellemzése

A **PI4K230**-at (**PI4KIII α**) elsőként Endemann és mtsai. (1987) mutatták ki szarvasmarha agykivonatból, ennek molekulatömege szacharóz gradiens centrifugálással 230 kDa-nak adódott. Hasonlóan 230 kDa-os formát klónoztak Nakagawa és mtsai. (1996b) patkányagyból. Az enzim szekvenciáját szarvasmarha agyból Gehrmann és mtsai. határozták meg 1996-ban, a molekulatömegét SDS-PAGE segítségével 200 kDa-nak mérték. Az enzimet sikerrel tisztították szarvasmarha méhizomzatból (Li és mtsai., 1989) és mellékvesekéreg homogenizátumból is (Balla és mtsai., 1997) de jelenléte a központi idegrendszer területén dominál (Carpenter és Cantley 1990; Gehrmann és mtsai., 1999), ahol az összehasonlító vizsgálatok szerint mennyisége jelentősen több mint a neurálisan szintén előforduló PI4K92 izoformáé (Zólyomi és mtsai., 2000). A PI4K230 szöveti expresszióját Northern blotlal számos kutatócsoport vizsgálta (Nakagawa és mtsai., 1996; Balla és mtsai., 1997; Gehrmann és mtsai., 1999; Zólyomi és mtsai., 2000). Eredmények szerint a PI4K230 mRNS-e (a PI4K92-höz hasonlóan) kimutatható számos perifériás szövetben: szívizomban, vázizomban,

vesében, lépben, petefészekben, herében. A nagyagy in-situ hibridizációs analízisével intenzív jelet tapasztaltak a cortex, lobus olfactorius, hypothalamus, hippocampus, amygdala és a limbikus rendszer területén, valamint a kisagyi Purkinje sejtekben (Zólyomi és mtsai., 2000). A korábban külön típusként kezelt 97 kDa-os PI4K a PI4K230 splice-variánsának vagy klónozási műterméknek tekinthető, mivel aminosavsorrendje 99%-ban megegyezik a 230kDa-os forma megfelelő szakaszával (Nakagawa és mtsai., 1996b; Wong és mtsai., 1994). A PI4K230 valószínűleg fontos szerepet játszik az embriogenezis során az agy fejlődésében, mert patkány embriók agyában nagyobb mennyiségben van jelen, mint a kifejlett állatokéban (Nakagawa és mtsai., 1996b; Zólyomi és mtsai., 2000).

Enzimológiai vizsgálatok szerint a PI4K230-as csoportba tartozó enzimek ATP iránti affinitása változó ($K_m=150-750\mu M$) (Carpenter és Cantley, 1990) de jóval kisebb, mint a PI4K55 esetében. Az enzim gátlása a PI4K92-re jellemzőnél magasabb adenzin ($K_i=1520\mu M$) és WT ($IC_{50}=100-200nM$) (Nakagawa és mtsai., 1996) koncentrációnál következik be. A Mn^{2+} és Mg^{2+} aktivitást növelő hatása ennél az izoformánál is érvényesül (Gehrmann és mtsai., 1996). Az egyes típusok főbb jellemzőit az 1. táblázat mutatja.

Élesztő PI4-kinázok

A foszfoinozítid anyagcsere élesztőben előforduló enzimei modellként szolgálhatnak más eukarióta sejtek enzimeinek a vizsgálatához. Ezért az emlősök mellett alaposan vizsgálták a *Saccharomyces cerevisiae*-t is, amelyben 3 különböző PI4K izoformát találtak. A PIK1 gén által kódolt 120 kDa-os enzim (Flanagan, 1993) az emlős PI4K92-höz hasonlít (Kapp-Barnea és mtsai., 2003) Egy másik élesztő PI4K az STT gén által kódolt 215 kDa-os izoforma (Yoshida és mtsai., 1994), melyet az emlős PI4K230 homológjának tartanak. A *Saccharomyces cerevisiae* harmadik PI4-kináza az Lsb6, egy 70 kDa-os membrán asszociált fehérje (Han és mtsai., 2002; Shelton és mtsai., 2003).

2. 1. 2. 3. 2. A PtdIns 4-kinázok szerkezete

Az összes eddig ismert PI4K (és PI3K) közös vonása, hogy a konzervált katalitikus domén a molekula C-terminálisán helyezkedik el, míg ettől N-terminálisan egy enzimenként eltérő doménszerkezetű polipeptid szakasz található (Gehrmann és Heilmeyer, 1998). Ebben az N-terminális regulátor szakaszban helyezkednek el azok a domének, amelyek az egyes izotípusok eltérő szubcelluláris lokalizációjáért és funkcionális sajátosságaiért felelősek

lehetnek. A PI4-kinázok szekvenciahomológiai vizsgálatok alapján feltételezett doménszerkezetét mutatja a 2. ábra.

A PI4K izoformákban előforduló domének és motívumok jellemzői:

Katalitikus domén: A PI4-kinázokban azonos módon, a molekula C-terminálisán megjelenő, konzervált szakasz. A PI4K55 α katalitikus doménje a PI4K55 β –val, míg a PI4K230 katalitikus doménje a PI4K92-vel mutat nagyobb homológiát. A lipidkinázok katalitikus doménje alapvető szerkezeti hasonlóságot mutat a cAMP-függő protein kináz (PKA) katalitikus alegységével (Gehrmann és Heilmeyer, 1998).

A PI4K-ok katalitikus doménjéből körülbelül 70 aminosavmaradékot foglal magába a PKA kis lebenyéhez hasonló régió. Elsősorban horgonyzó funkciót tulajdonítanak neki. Szerepe az ATP adenin részének és a nem transzferálódó α és β foszfátnak a rögzítésében van.

A kb. 20-70 aminosavat tartalmazó összekötő régió méretében és szekvenciájában is nagyon variábilis. Valószínűleg ez a régió végzi a szubsztrát megkötését.

A harmadik rész a PKA nagy lebenyéhez hasonló régió, mely hozzávetőleg 170 aminosavat foglal magába és elsősorban a katalitikus funkcióért felelős. Funkcionális jelentőségű szakaszok a PI4K230 ezen részén a Mg^{2+} kötéséhez szükséges DFG motívum (1917-1920) és a katalitikus funkciójú DRH motívum (1899-1901).

Lipid kináz specifikus domén (LKU): A katalitikus centrum szomszédságában elhelyezkedő, mintegy 70 aminosavból álló szakasz. Eddig csak lipidkinázokban találták meg. A lipidszubsztrát kötésében tulajdonítanak neki szerepet.

Pleckstrin homológia (PH) domén: foszfolipid-kötő funkciója van, így szerepe lehet az enzim membránasszociációs folyamataiban (kb. 100 aminosav).

Src homológia domén 3 (SH3): jelátviteli folyamatok során prolin-gazdag régiót tartalmazó fehérjékhez kötődik (kb. 50 aminosav.).

Prolin-gazdag régió: SH3 ligandként szerepel a jelátvitelben.

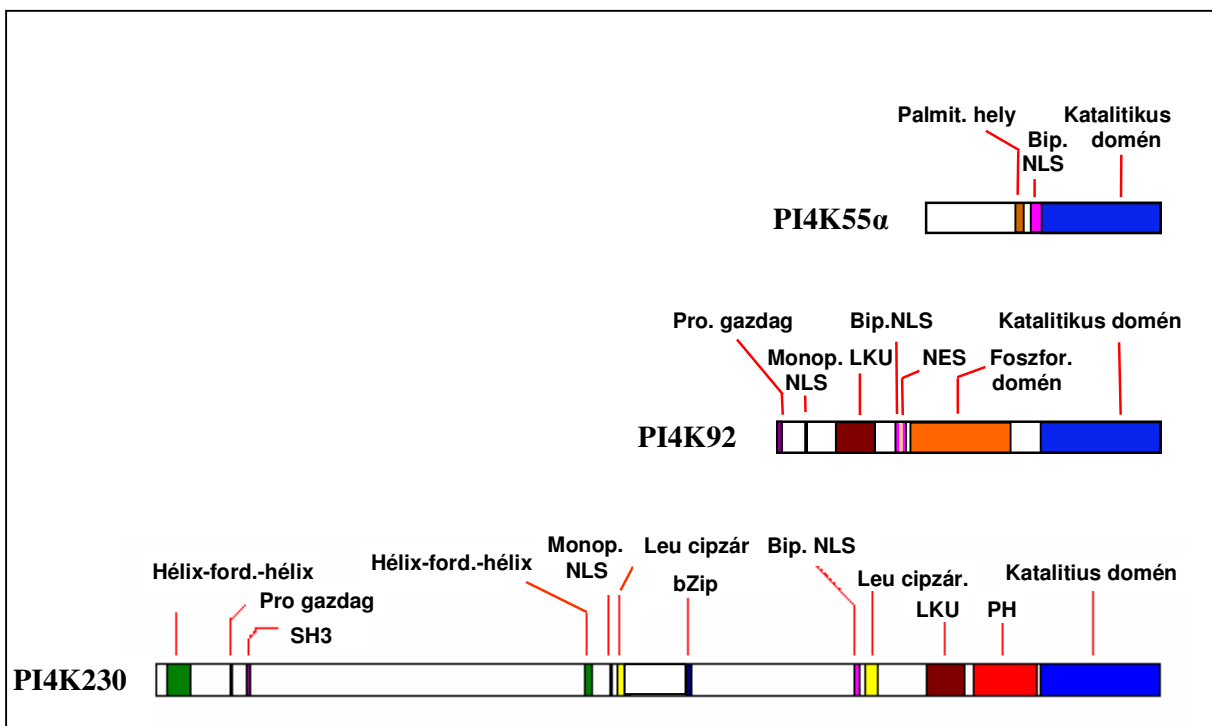
Hélix-hurok-hélix: a DNS-kötő fehérjékben (pl. transzkripciós faktorokban) található meg de a DNS kötéshez a dimerizáció mellett egy szomszédos bázikus szekvenciára is szükség van. A PI4K230 esetében a bázikus aminosavak hiánya miatt ezek a domének valószínűleg arra szolgálnak, hogy heterodimereket képezzenek más hélix-hurok-hélix tartalmú fehérjékkel, így szabályozva (csökkentve) a transzkripciós aktivitást.

Leucin cipzár és a bZip (bázikus leucin cipzár): Amíg a leucin cipzár fehérjékkel való homo- és heterodimerizációért felelős (amely két fehérje hidrofób, dimerizációra képes α -hélicei között jön létre) addig a bázikus leucin cipzár a DNS-sel lép közvetlen kapcsolatba.

Nukleáris lokalizációs szignál (NLS): A magi transzlokációért felelős, bázikus aminosavakban gazdag peptidszakasz: szerkezetüket tekintve klasszikus mono és bipartit NLS-ek. Valamennyi izoformában fellelhetők, ami sejtmagi transzportjukra utal.

Nukleáris export szignál (NES): Leucin gazdag szakasz, mely a sejtmagi exporthoz szükséges. Bár valószínűleg minden izoforma tartalmaz NES-t de jelenléte egyértelműen csak a PI4K92 esetén igazolt (De Graaf és mtsai., 2002), ugyanis a CRM1 / exportin 1 rendszert Leptomycin B-vel gátolva kiváltható a PI4K92 magi akkumulációja.

A **PI4K55 α** és **PI4K55 β** doménszerkezete szegényes, a katalitikus centrum mellett mindössze egy bipartit NLS-t és egy leucin cipzár-t tartalmaz. Fontos megemlíteni, hogy a PI4K55 α poszttranszlációsan palmitoilálódik egy, a molekula közepén található cisztein gazdag szakaszon. A palmitoiláció olyan hatékony membrán-asszociációt tesz lehetővé, amely a transzmembrán proteinekre jellemző sajátosságokat eredményez. (Barylko és mtsai. 2001). A PI4K55 β esetében a palmitoiláció nem feltétele a membránasszociációnak de szükséges a megfelelő funkcióhoz.



2. ábra: A PI4-kinázok doménszerkezete

A **PI4K92** esetében, a fent közösen jellemzett domének mellett (prolin gazdag régió, monopartit NLS, LKU, bipartit NLS, NES, katalitikus domén) (Nakagawa és mtsai., 1996a) egy foszforilációs domén is található (Suer és mtsai. 2001). Ez tartalmazza az eddig megismert 8 db. Ser, Thr foszforilációs helyet. Foszforilálásukra a cAMP-függő proteinkináz (PKA), cGMP-függő proteinkináz (PKG), ciklin-függő protein kináz 2 (cdc2) és a Ca^{2+} / kalmodulin-függő protein kináz képes, növelve az enzim lipidkináz aktivitását. Zhao és mtsai. (2000) szerint a PI4K92 autofoszforilációra is képes, mely a lipidkináz aktivitást gátolja. Mivel a PI4K92 esetében nem tudtak PH domént kimutatni, így azt feltételezik, hogy vagy a katalitikus doménen keresztül, vagy pedig fehérje-fehérje kölcsönhatás segítségével horgonyzódik ki a membránhoz.

A **PI4K230** funkciója a sejten belül még kevésbé feltárt, rendkívül gazdag doménszerkezete (hélix-hurok-hélix, prolin gazdag régió, SH3, monopartit NLS, leucin cipzár és bZip domén, bipartit NLS, LKU, PH, katalitikus domén) egyértelműen utal számos protein-protein, protein-lipid és protein-DNS kölcsönhatás lehetőségére. További szabályozási lehetőség, hogy aminosavszekvenciája alapján számos potenciális proteinkináz foszforilációs hellyel rendelkezik: 5 potenciális PKA/PKG, 31 kazein kináz II, 29 különféle protein kináz C (PKC) és 5 protein tirozin kináz foszforilációs helyet valószínűsítettek (Gehrmann és mtsai., 1996, 1999; Nakagawa és mtsai., 1996b).

2. 1. 2. 3. 3. A PtdIns 4-kinázok intracelluláris lokalizációja és funkcióik

A PI4K izoformák többé-kevésbé jellegzetes asszociációt mutatnak a sejtorganelumokkal, ami utal az egyes típusok eltérő élettani folyamatokban való részvételére.

Plazmamembrán

Az egyik legalaposabban ismert, citoplazma membránból induló szignálútvonalban a keletkező PtdIns (4,5) P_2 szubsztátjaként szolgál az extracelluláris ingerekre (G-proteinen vagy receptor tirozinkinázon keresztül) aktiválódó, foszfoinozítid-specifikus foszfolipáz C (PI-PLC) β vagy γ izoformának (Michell, 1975), mely a PtdIns (4,5) P_2 hidrolízisével két másodlagos hírvivőt hoz létre: inozitol (1,4,5)-triszfoszfátot (IP_3) és diacilglicerolt (DAG). Az IP_3 kalciumot szabadít fel az intracelluláris raktárakból (Berridge, 1984), míg a DAG a proteinkináz C (PKC) számos formáját stimulálja (Nishizuka, 1988) (3. ábra).

A plazmamembránban jelenlévő agonista-szenzitív PtdIns (4,5)P₂ pool fenntartásáért alapvetően a membránasszociált és állandóan aktív PI4K55 α felelős (Balla és mtsai., 2002). Az egyébként túlnyomórészt citoszolikus, csökkent aktivitású PI4K55 β PDGF (vérlemezke eredetű növekedési faktor) stimulációt követően Rac-GTP közvetítésével a plazmamembránhoz vándorol és aktiválódik, így kisebb mértékben ez az izoforma is részt vesz a sejtmembrán PtdIns ciklusában (Wei és mtsai., 2002).

Walker és Pike mutatta ki 1987-ben, hogy a PI4K aktivitás és a PtdIns (4,5)P₂ hidrolízis EGF (epidermális növekedési faktor) stimuláció hatására fokozódik. Az aktivált EGF receptor PtdIns transzfer proteinnel (PITP), PLC γ -val és PI4K55-tel multienzim komplexet hoz létre, ami a résztvevő tagok aktivációjához vezet (Kauffmann-Zeh és mtsai., 1995). A PIPKI receptoron keresztüli közvetlen stimulációját Xu és mtsai. (2003) szerint az bizonyítja, hogy a külső ingert követően a plazmamembrán PtdIns (4,5)P₂ szintje rendkívül gyors emelkedésre képes. Érdekes, hogy az előbb említett EGF stimulációt kivéve semmilyen eredmény nem támasztja alá a citoplazmamembránban lévő PI4K receptor-függő aktiválódását. Sőt, a hormon-érzékeny PI4-kinázok (PI4K92, PI4K230) az endoplazmatikus retikulum és Golgi membránokhoz kötötten találhatók (Nakanishi és mtsai., 1995). Kisebb mértékben ugyan, de a sejtmembrán PtdIns (4,5)P₂ pooljának fenntartásában az intracelluláris membránokban található PI4-kinázok is részt vesznek, elsősorban a PI4K230: a működésük eredményeként keletkező foszfoinozitideket - foszfoinozítid transzfer proteinhez kötötten (Thomas és mtsai., 1993) - vezikulumok juttatják el a sejtmembránhoz (Nakanishi és mtsai., 1994, 1995; Balla és mtsai., 2005).

A citoplazma- és más intracelluláris membránokban egyaránt összetett idő és térbeli szabályozási lehetőséget jelent a PtdIns (4)P és PtdIns(4,5)P₂ lokális képződése, illetve utólagos tömörülése. Ezek az ún. szignál mikrodomének helyileg képesek kikötni és aktiválni a foszfoinozítid kötő doménal rendelkező fehérjéket (Odorozzi és mtsai., 2000; Hurley és mtsai., 2001). Expresszált, PH doménal elkülönült PtdIns (4,5)P₂ poolok detektálhatók a klatrin burkú endocitózis és exocitózis helyein valamint a lamellipodiumokban (Bajno és mtsai., 2000; Cremona és DeCamilli. 2001; Watt és mtsai., 2002). A PtdIns(4,5)P₂ lokális tömörülése kiemelkedő jelentőségű a klatrin burok képződésében, ugyanis a PtdIns(4,5)P₂ kötésére képes klatrin adaptorok és összeszerelő faktorok hozzájárulnak a klatrin burkot (Itoh és mtsai., 2001; Ford és mtsai., 2002). Minogue és mtsai. (2001) a PI4K55 α -t a caveolákat nem tartalmazó raftokban mutatták ki.

A foszfoinozitidek számos citoszkeletális fehérjéhez kapcsolódnak, ezáltal befolyásolják a **citoszkeleton** organizációját (Isenberg és Goldman, 1995). A PtdIns (4)P és PtdIns (4,5)P₂ aktin kötő fehérjékhez (gelsolin, profilin, kofilin, α -aktinin, vinkulin, talin, ezerin, N-WASP) kötődve indukálja az aktin polimerizációját, ezáltal elősegítve a stresszkábelek képződését, illetve a fokális adhéziót (Hartwing és mtsai., 1995; Isenberg és Niggli, 1998).

A citoszkeleton átépülést indukáló, integrineken keresztül ható szignált a receptorról asszociálódó PI4K55 foszfolipid termékein keresztül közvetíti a citoszkeletonhoz (Berditchevski és mtsai., 1997).

A Rac fehérje közvetlenül (Tolias és mtsai., 1995), a Rho pedig Rho-asszociált kinázon (Rho-kináz) keresztül (Weernink és mtsai., 2000) lép kapcsolatba a PI4P 5-kinázzal és az így képződő PtdIns (4,5)P₂ indukálja az aktin polimerizációját.

Elektronmikroszkópos felvételeken a PI4K92 és PI4K230 a **mitokondrium** külső membránjához asszociálódva látható (Balla és mtsai., 2000).

A PtdIns 4-kinázok az **endoplazmatikus retikulumban** (ER) is megtalálhatók. A PI4K230 (Wong és mtsai., 1997; Balla és mtsai., 2000) és a PI4K92 (Balla és mtsai., 2000) esetében is sikerült kimutatni kapcsolatukat a durva felszínű endoplazmatikus retikulum ciszternáival. Waugh és mtsai. (2003) a PI4K55 α jelenlétét igazolták az ER szubkompartmentjeiben.

Már korai enzimológiai vizsgálatokkal mérték PI4K aktivitást a **Golgi-apparátushoz** kapcsoltnak (Jergil és Sundler, 1938). Az emlős sejtekben valamennyi PI4K izoformát kimutatták Golgi membránhoz asszociáltnak. Kiemelkedő szerepüket bizonyítja, hogy domináns negatív mutáns PI4K92-t vagy PI4K55 β -t tartalmazó sejtekben, illetve PI4K55 α elleni siRNS-sel kezelt sejtekben az organelleum egyaránt destrukturalódik (Godi és mtsai., 1999; Godi és mtsai., 1999; Mills és mtsai., 2003)

A PI4K55 α és PI4K55 β jelenléte a trasz-Golgi hálózatra (TGN) tehető, ahol részt vesznek a Golgi-tól a sejt felszín, illetve az endoszómák felé irányuló transzportfolyamatokban (Wei és mtsai., 2002; Balla és mtsai. 2005). A PI4K55 izoformák által szintetizált PI4P felelős ugyanis az AP-1 klatrin adaptor komplex „toborzásáért” a TGN-hez (Wang és mtsai., 2003). Legnagyobb mennyiségben a PI4K92 mutatható ki Golgi vezikulumokhoz és ciszternákhoz asszociáltnak (Wong és mtsai., 1997; Balla és mtsai., 2000) melynek szerepe alapvető a Golgi

szerkezeti integritásában (Godi és mtsai., 1999). A PI4K92 működése kapcsolatba hozható a Golgi-apparátus szerkezetét és funkcióját szabályozó ADP ribozilációs faktorról (Arf), mely a PI4K92 kihorgonyzásával stimulálja a PtdIns (4)P ill. PtdIns (4,5)P₂ szintézisét (Godi és mtsai., 1999; Balla és mtsai., 2005). Godi és mtsai. (2004) a PI4K92-ről is kimutatták, hogy részt vesz a Golgi-citoplazmamembrán irányú transzportfolyamatokban. Mindhárom PKD izoforma (PKD 1,2,3) -melyek a vezikulumok kihasadását szabályozza a transz-Golgi hálózatból (TGN)- képes foszforilálni a PI4K92-t, ezáltal fokozva annak lipidkináz aktivitását és végeredményképpen felgyorsítani a plazmamembrán felé irányuló transzportot (Hausser és mtsai., 2005). A PI4K92 emellett specifikus kölcsönhatásra képes a kis GTPáz rab11 GTP-kötött formájával és ezáltal kihorgonyozza azt a Golgihoz, ami szintén elengedhetetlen a Golgi-citoplazmamembrán irányú transzportozhoz (De Graaf és mtsai., 2004). Nakagawa és mtsai. (1996a) Golgi vezikulumokhoz és vakuolumokhoz asszociált PI4K230-at mutattak ki.

A PtdIns kinázok, termékeiken keresztül a **vezikuláris transzport** szinte minden szintjére szabályozó hatást gyakorolnak (De Camilli és mtsai., 1996), ugyanis a foszfoinozítidek közvetlen kapcsolatba léphetnek a burokképződéssel és a vezikulumok képződéséért, dokkolódásáért és fúziójáért felelős fehérje komplexekkel. (Schekman és Orci, 1996).

A PtdIns (4)P szintézis feltétele a klatrin-függő endocitózisnak, fagocitózisnak, pinocitózisnak az endoszómák vándorlásának és a szekréciónak (Wiedemann és mtsai., 1996; Godi és mtsai., 1999; De Graaf és mtsai., 2002). PtdIns (4,5)P₂ képződése is elengedhetetlen mind a klatrin burkú vezikulumok képződésében, mind a szekréciós folyamatokban (Pertile és mtsai., 1995; Owen és mtsai., 2004). A PtdIns (4,5)P₂ kötődni képes több olyan fehérjéhez, amelyek részt vesznek a vezikuláris transzportban, pl.: β arrestin, foszfolipáz D, ADP-ribozilációs faktor, szinaptotagmin (Gaidarov és mtsai., 1999; Liscovitch és mtsai., 1994; Randazzo, 1997; Schiavo és mtsai., 1996).

A vezikuláris transzport szinte minden folyamatában kiemelkedő szerep jut a PI4K55 izoformáknak. Jelenlétét kimutatták szekréciós vezikulumokban (Husebye és Flatmark, 1988), receptorok internalizálásban (Eberhard és mtsai., 1990), mellékvese kromaffin sejtjeinek exocitózisában (Wiedemann és mtsai., 1996). A PI4K55 α izoformát mellékvese kromaffin sejtjeinek szekréciós granulumaiban (Barylko és mtsai., 2001) és szinaptikus vezikulumokban (Guo és mtsai., 2003) találták meg. Salazar és mtsai. (2005) szerint a PI4K55 α fizikai és funkcionális kapcsolatban van, a vezikulumok egy adott csoportjában kulcs szerepet betöltő,

AP3 burok fehérjével. Balla és mtsai. (2001) vizsgálatai szerint a korai endoszómákban a PI4K55 α és a PI4K55 β is, a későbbi stádiumú (juxtanuclear recycling) endoszómákban csak a PI4K55 α van jelen.

Wortmannin-érzékeny (azaz PI4K92 és/vagy PI4K230) PI4-kinázok által szintetizált PtdIns (4)P és PtdIns (4,5)P₂ jelenlétét igazolták β 2-adrenerg receptorok internalizálásában (Sorensen és mtsai., 1998). A PI4K92 alapvető szerepet játszik a dense-core vezikulumok exocitózisában (Waselle és mtsai., 2005). A PI4K230 vezikuláris transzportfolyamatokban való részvételére olyan elektronmikroszkópos felvételek utalnak, amelyekben az enzim a szinaptikus rés közelében és multivezikuláris testekhez (MVB) asszociálva látható (Balla és mtsai., 2000).

A PI4K55 asszociálódik **lizoszómákkal** (Arneson és mtsai., 1999) és jelenlétét kimutatták máj **mikroszóma** frakcióban is (Olsson és mtsai., 1995).

A PI4K-ok szabályozó szerepet töltenek be az **ioncsatornák** működésében is (Zeng és mtsai., 1994). Az IP₃ Ca²⁺ mobilizáló szerepe mellett, a szarkoplazmatikus retikulumban a foszfoinozitidek a Ca²⁺-transzport ATPáz aktivátorai (Varsányi és mtsai., 1989). A PtdIns (4,5)P₂ különféle K⁺ csatornák működését is szabályozza, ide tartoznak az invar rectifying (Huang és mtsai., 1998), az M-áram (Suh és Hille, 2002), a KCNQ (Zhang és mtsai., 2003) és bizonyos Trp csatornák, mint a TrpM5,-7,-8 (Runnels és mtsai., 2002) és a vanilloid receptor (Chuang és mtsai., 2001)] működését.

Foszfoinozitidek és PI4-kinázok szerepe a sejtmagban

A foszfoinozítid jelpálya megtalálható a sejtmagban is (Irvine és Divecha, 1992; Divecha és mtsai., 1993; Maraldi és mtsai., 1994; Wirtz, 1997). Az első bizonyíték a magi útvonal létezésére a DAG és PtdIns kimutatása és a PIPK aktivitás mérése volt a maghártyában (Smith és Wells, 1983). Később a PIPK aktivitását a maghártyától detergenssekkal megfosztott sejtmagpreparátumon is kimutatták (Cocco és mtsai., 1987; Divecha és mtsai., 1991; Vann és mtsai., 1997). Később a foszfoinozítid anyagszere és jelpálya számos enzimét megtalálták a sejtmagban, ezek között szerepel a PI-PLC és inozitol-foszfát specifikus foszfatáz (Kuriki és mtsai., 1992; Martelli és mtsai., 1992; Asano és mtsai., 1994; York és mtsai., 1994; Balboa és mtsai., 1995; Liu és mtsai., 1996; Sun és mtsai., 1997), a PI3K (Lu és mtsai. 1998), a PIPK I. típusa (Audhya és mtsai., 2003; Boronenkov és mtsai.,

1998), a PIPK II. típusa (Ciruela és mtsai., 2000; Boronenkov és mtsai., 1998) és PI4K is (Vann és mtsai., 1997; Szivák és mtsai., 2006; de Graaf és mtsai., 2002)

A PI4K92 foszforiláció-függő nukleáris lokalizációját napjainkban mutatta ki Szivák és mtsai. (2006) natív és transzfektált (NIH 3T3, CHO) sejteken. Immuncitokémiai kísérleteikben a PI4K92 gyenge jelét detektálták a nukleoplazmában, a magi exportot specifikus gátlásával azonban az enzim akkumulálódott a magban. A Ser-496 és Thr-504-en foszforilált PI4K92 a nukleáris speckle-ökben található. A PI4K92 egy másik frakcióját a lamina-pórus komplexekben mutatták ki, a PI4K55-öt pedig a sejtmag aktin filamentum frakciójában írták le De Graaf és mtsai. (2002).

A foszfoinozítid jelpálya térbeli orientációja a magon belül kevésbé ismert, de az bizonyos, hogy a sejtmagban több különálló ciklus létezik, melyek lipid termékeiken keresztül más-más folyamatokra gyakorolhatnak szabályozó hatást. Erre engednek következtetni a PtdIns (4,5)P₂ monitorozásával kapott eredmények is. Antitestekkel, ill. a PLC- δ 1 PH doménjának segítségével végzett PtdIns (4,5)P₂ kimutatás a sejtmag különböző szubdoménjeiben mutatott specifikus jelölést: maghártya, interkromatin granulumok, heterokromatin, sejtmagvacskával asszociált heterokromatin, speckle-ök (Osborne és mtsai., 2001; Watt és mtsai., 2002; Boronenkov és mtsai., 1998).

Bár a sejtmag belsejében nincs lipid kettős réteg, a PtdIns-ciklus ennek ellenére is végbemegy. Ebből arra következtethetünk, hogy a foszfoinozítidek a magon belül nem membrán asszociáltak, hanem valószínűleg proteolipid komplexeket alkotnak (Cocco és mtsai., 1987; Divecha és mtsai., 1991; Martelli és mtsai., 1992). A foszfoinozítidek proteinekkel való asszociációs készsége már régóta ismert (Janmey, 1994). Valószínű, hogy a PtdIns-ciklus enzimei is a proteinekhez kötött foszfoinozítideket használják. Ezt alátámasztja az a tény, hogy a PI-PLC képes szubsztrátként használni olyan PtdIns (4,5)P₂-ot, amely a magban található PtdIns transzfer proteinhez kötött (De Vries és mtsai., 1996; Cockcroft, 1998). Ugyancsak a lipid kettős rétegtől független PtdIns ciklus tényét támasztja alá, hogy DAG-kináz, PI-kinázok, PIPK (Payrastra és mtsai., 1992), PI4K, PI-PLC β és PKC enzimek (Zini és mtsai., 1993; Maraldi és mtsai., 1994; Maraldi és mtsai., 2000) a magon belül a mátrixhoz kapcsolódva mutathatók ki. Boronenkov (1998) az I és II típusú PIP-kinázokat, illetve terméküket a PIP₂-ot a nukleáris speckle-ekben mutatta ki.

A magi PtdIns ciklus és szignálút vonal szerepéről már sok közlemény született, melyek bizonyítják, hogy a foszfoinozítidek funkciója a magban nagyon összetett, ugyanakkor az összkép még csak egyes részleteiben feltárt (Irvine, 2003; Martelli és mtsai.,

2004). Az már bizonyított, hogy a magi foszfoinozitidek szintje a plazmamembrán foszfolipidjeitől függetlenül változik (Divecha és mtsai., 1993; Maraldi és mtsai., 1999).

- IGF-I (inzulinszerű növekedési faktor) stimuláció hatására a PI-PLC β foszforilálódik az ERK / MAPK (extracelluláris szignál regulált kináz/mitogén aktivált protein kináz) útvonalon és transzlokálódik a sejtmagba (Martelli és mtsai., 2000; Xu és mtsai., 2001), ahol a PtdIns (4,5)P₂ hasításával IP₃-at és DAG-ot szintetizál. Az IP₃ Ca²⁺-ot szabadít fel a belső maghártyában lévő IP₃ receptorokon keresztül, a DAG pedig elősegíti a PKC α és PKC β importját a sejtmagba ahol ezek további sejtmagi fehérjéket foszforilálnak (Divecha és mtsai., 1991).

- A fent említett IGF-I mellett más extracelluláris szignál molekulákról is kimutatták, hogy változást okoznak a magi foszfoinozítid metabolizmusban, ilyenek pl. a citokinek (IL-1 α , IFN α) (Zini és mtsai., 1996; Divecha és mtsai., 1997) és a trombin (Leach és mtsai., 2002).

- Feltételezik, hogy a foszfoinozitidek az aktin-citoszkeletonhoz hasonló módon szabályozzák a karioszkeleton organizációját. Mindez azért is valószínű, mert az aktin a karioszkeletonnak is alkotóeleme (Rando és mtsai., 2000).

- Kiemelkedő szerepet tulajdonítanak a foszfoinozitideknek a sejtosztódásban, a sejtciklus szabályozásában és a differenciálódásban (Divecha és mtsai., 1995; Martelli és mtsai., 1999). A PtdIns ciklus sejtosztódásbeli szerepére utal, hogy a PtdIns (4,5)P₂ a sejtmagban lévő DNS-polimeráz α specifikus aktiválására képes (Sylvia és mtsai., 1988).

A sejtciklus G₁-S és G₂-M fázisátmenetei alatt emelkedik a magi PtdIns (4)P és PtdIns (4,5)P₂ mennyisége (Clarke és mtsai., 2001), ugyanakkor az S-fázis során a PtdIns (4,5)P₂ szint folyamatos csökkenését tapasztalták (York és Mayerus, 1994). A PtdIns (4)P és PtdIns (4,5)P₂ szint változása nem teljesen korrelál egymással, ami arra utal, hogy a PtdIns (4)P szerepe több mint egyszerűen egy PtdIns (4,5)P₂ prekursor. A G₁-S és G₂-M átmenet során a magi PLC aktivitás és ebből kifolyólag a DAG szint növekedését találták (Sun és mtsai., 1997). A G₂-M átmenetkor a DAG szint növekedésének hatására a magba transzlokálódó PKC β fő szubsztrátja a lamin (főleg a lamin B), aminek foszforilációja hozzájárul a maghártya széttöredezéséhez (Neri és mtsai., 1998). Bár nem ismert, hogy a sejtciklus előrehaladása hogyan befolyásolja a foszfoinozítid profilt, de egyfajta útvonalat jelenthet Divecha és mtsai. (2002) felfedezése: az RB (retinoblasztoma) fehérje (mely részt vesz a G₁-S átmenet és az S fázis történéseinek szabályozásában) fizikai kapcsolatba lép a PIPKI-gyel és ezáltal fokozza a PtdIns (4,5)P₂ szintézisét.

A differenciációt indukáló szignálok hatása is a magi foszfolipid metabolizmus változásán keresztül érvényesül. A kutatók a differenciáció során a PI-PLC β 1 aktivitás,

következésképpen a DAG szint csökkenését találták (Divecha és mtsai., 1995; Martelli és mtsai., 1995; Faenza és mtsai., 2002).

- A foszfoinozitidek szerepet játszanak a kromatinszerkezet változásában. A PtdIns (4,5)P₂ kötődésével fokozza a kromatin remodelling BAF komplex működését, ezáltal elősegítve a kondenzált kromatin eukromatinná válását (Zhao és mtsai., 1998), a mitózis során pedig szerepe van a kromatin reorganizációjában (Gonzales és Anderson, 2006).

- A foszfoinozitidek génexpresszióban játszott szerepének (Martelli és mtsai., 1999) egyik bizonyítéka, hogy a PtdIns (4,5)P₂ képes kötődni az RNS polimeráz II-höz, valamint a H1 és H3 hisztonhoz. Így a PtdIns (4,5)P₂ in vitro kísérletben transzkripciót indukál, ugyanakkor a H1 hisztonhoz kapcsolódva kivédi annak transzkripció gátló hatását (Yu és mtsai., 1998; Osborne és mtsai., 2001). A PtdIns (4,5)P₂ reguláló és/vagy szerkezetstabilizáló szereppel bír az mRNS érési folyamataiban (Osborne és mtsai., 2001). Ezt alátámasztja, hogy az I. és II. típusú PIPK-t a PI4K-t és termékeiket kimutatták a speckle-ekben, ami az mRNS érés helye (Boronenkov és mtsai., 1998; Sindic és mtsai., 2001).

- A foszfoinozítid ciklus stressz adaptációs vagy apoptotikus folyamatokban való részvételére utal Furuta és mtsai. (2003) vizsgálati eredménye, mely szerint közvetlenül ischemia-reperfúzió után a hippocampus neuronjainak PI4K230 expressziója és PtdIns (4,5)P₂ szintje drasztikusan lecsökken. A PI4K230 túltermelésével megakadályozható a hipoxia által kiváltott életképesség csökkenés, azaz a késleltetett idegsejtelhalás. Más eredmények arról számolnak be, hogy ultraibolya sugárzás, etopozidok és oxidatív károsodás hatására jelentősen megemelkedik a PtdIns (4)P és PtdIns (5)P mennyisége (Martelli és mtsai., 2003).

- Fontos megemlíteni, hogy a PI-PLC által létrehozott sejtmagi IP₃ inozitol foszfát kinázok sorozatával inozitol polifoszfátokká alakulhat (többnyire inozitol hexafoszfáttá), amelyeknek elengedhetetlen szerepük van az mRNS exportban (Wente, 1999), a transzkripció (Odom és mtsai., 2000) és a kromatin szerkezet szabályozásában (Steger és mtsai., 2003) valamint a DNS kettős-szálú törésének hibajavításában (Hanakahi és mtsai., 2000).

- A sejtmagi monofoszfoinozitidek jelentős szabályozó hatást fejthetnek ki olyan fehérjéken, amelyek a PHD ujjal rendelkeznek. A PHD ujj (plant homeodomain) egy Cys4-HisCys3 cink ujj, mely elsősorban sejtmagi proteinekben jelenik meg. Jones és Divecha (2004) kimutatták, hogy negyven PHD ujjat tartalmazó fehérjéből legalább 10 foszfoinozitideket köt, ezen belül is monofoszfoinozitideket, ami vagy esszenciális a működésükhöz vagy regulálja az aktivitásukat. Ilyen fehérje pl.: a p300 (hiszton acetiláz), az ACF (ATP-dependent kromatin-assembly factor) és ide tartozik az ING család, melynek tagjai tumor szupresszorok: p53-dependens apoptózist indukálnak és kölcsönhatásba lépnek az acetiláló és deacetiláló

proteinekkel (Jones és Divecha, 2004; Gozani és mtsai., 2003)). Jones és Divecha (2004) azt is kimutatta, hogy a két PHD ujjal rendelkező fehérjékben csak az egyik köt monofoszfoinozitideket, ami arra utal, hogy a PHD ujjak különböző funkcióval rendelkezhetnek. Ezen felül bebizonyosodott, hogy a különböző PHD doménok különböző foszfomonoinozitideket kötnek. Így várható, hogy a PtdIns (3)P, PtdIns (4)P, PtdIns (5)P képződés eltérő modulációjával a magon belül lehetőség nyílik a PHD tartalmú fehérjék differenciáltabb szabályozására. Lehetséges, hogy a foszfoinozítid kötő doméneken keresztül a fehérjékre gyakorolt reguláló szerep a magi foszfoinozítidok fő funkciója. Mindez elképzelhetőnek tűnik, ha belegondolunk, hogy az összes olyan szignál, amely proliferációt, differenciációt, stressz adaptációt vagy apoptózist indukál, a foszfoinozítid profil megváltozását eredményezi.

2. 2. Sejtmagtranszport

Az eukarióta sejtek magját maghártya borítja, amely a szabad anyagáramlást megakadályozza, ezért a sejtmag és a citoplazma között molekulatranszportra van szükség. Megdöbbenő mennyiségű molekula szállítódik a két kompartment között, a sejt energiájának jelentős részét felhasználva. A magba importálódnak a magi struktúr- és szabályozó fehérjék, polimerázok, riboszómális proteinek, szignál molekulák; onnan a citoplazmába exportálódik pl.: az mRNS, a tRNS és riboszóma alegységek.

A nukleo-citoplazmatikus transzport a maghártya kettős rétegébe ágyazott, 50-125 MDa-os magpórus komplexeken (NPC) keresztül történik, melyek mindkét irányba szállítanak (100 MDa vagy 10^3 transzport / másodperc (Ribbeck és Görlich, 2001)) és nem igénylik a molekulák letekeredését. Az ionok, metabolitok és a 40-60 kDa-nál kisebb (9 nm átmérő alatti) proteinek szabad diffúzióval, az ettől nagyobb fehérjék pedig szolubilis transzport receptorokhoz kötötten, facilitált diffúzióval haladnak át az NPC-n. Bár a csatornán való átjutás maga nem igényel energiát, de mivel koncentrációgradienssel szemben történik, energiaigényes aktív transzportként megy végbe (Görlich és Kutay, 1999).

Az NPC építőkövei a nukleoporinok (30 féle), melyek nagy számban összekapcsolódva (5-56 kópia/NPC) 8 hengerből felépülő szimmetrikus struktúrát alkotnak. A hengerek egy központi csatornát zárnak körül, melynek üregét küllő és gyűrűszerű képletek szűkítik. A hengerekből rugalmas filamentumok irányulnak a citoplazmába és a sejtmagba, ez utóbbinál egy gyűrűben végződnek ún. magi kosár struktúrát képezve (Fahrenkrog és mtsai.,

2001). A nukleoporinok jelentős részének szerkezetére jellemző a fenilalanin/glicin (FG) dipeptid ismétlődése, amelyek kapcsolódó helyként szolgálnak a transzport faktorok számára (Rout és Aitchison, 2001). Bár az NPC-n keresztüli transzport mechanizmusáról és a filamentumok szerepéről több elmélet is született de egyik sem ad magyarázatot arra, hogyan szelektál az NPC a molekulák között (pl.: üres transzport faktor és importálandó molekulát hordozó transzport faktor megkülönböztetése), és hogy milyen elv szerint jutnak keresztül a molekulák a hosszú központi csatornán (Rout és mtsai., 2000; Ribbek és Görlich, 2001).

A maghártyán keresztüli transzport folyamatok nagy része a szállítandó fehérjék, nukleinsavak felismerésére képes transzport receptorok közvetítésével valósul meg, melyek 3 családra oszthatók:

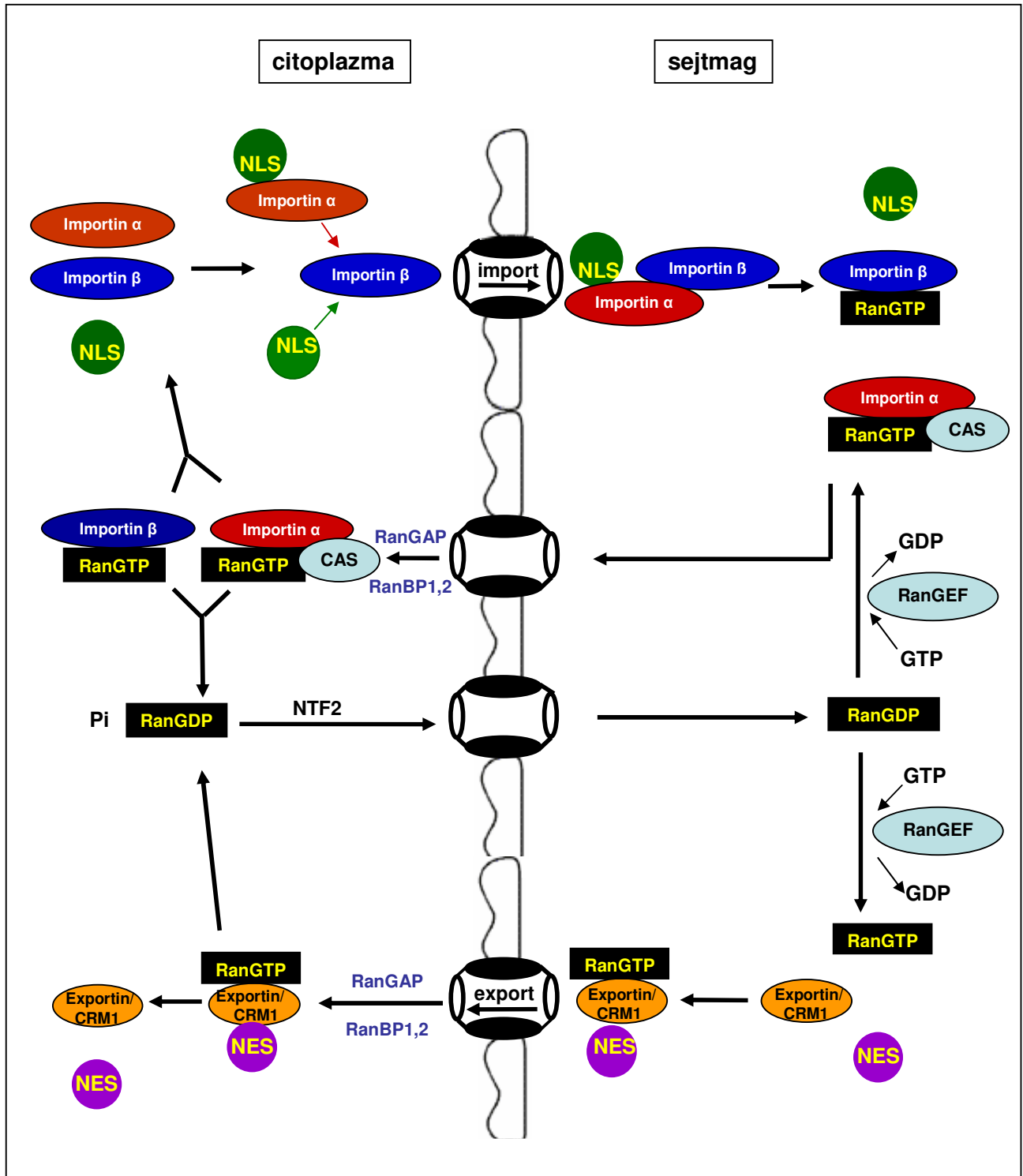
- Az importin β -szerű transzport faktorok csoportjába sorolják az összes importint és exportint, ezek fehérjék vagy RNS-ek transzportjára képesek (Weis, 2002)
- A második csoportba a kis nukleáris transzport faktor 2 (NTF2) tartozik, ez szállítja a kis GTPáz Ran-t a sejtmagba (több millió Ran/perc) (Ribbeck és mtsai., 1998).
- A harmadik transzport receptor család az mRNS-ek exportjáért felelős (Rodriguez és mtsai., 2004).

A szállítandó fehérjék és ribonukleoproteinek specifikus szignálokra keresztül kötődnek a transzport proteinekhez, ami lehet adott aminosav vagy nukleotid szekvenciájú fragment vagy a makromolekula egy nagyobb része. Miután a molekula a transzport faktorhoz kötötten átjutott az NPC-n, leválik arról, az üres transzport faktor pedig visszatér a kiindulási oldalra, hogy újabb ciklusban vegyen részt. Ezen koncentráció-gradienssel szemben bekövetkező energiaigényes transzport folyamat hajtóereje az ún. RanGTPáz ciklus.

2. 2. 1. A RanGTPáz ciklus

Az importinok és exportinok szubsztrát megkötését és leválását a Ran GTP ill. GDP kötött állapotainak asszimmetrikus eloszlása befolyásolja, vagyis a RanGTP gradiens. A citoplazmában történik a RanGTP hidolízise RanGDP-vé, a sejtmagban pedig a RanGDP nukleotid cseréje RanGTP-vé (3. ábra) (Mataj és Englmeier, 1998). A Ran különböző nukleotid tartalmú állapotainak egymásba alakulásában szabályozó fehérjék működnek közre, melyek egyenlőtlen eloszlása a maghártya két oldalán tartja fenn a RanGTP gradienst. A sejtmagban lejátszódó GDP→GTP cserét a hisztonhoz kötött Ran guanin nukleotid cserélő faktor (RanGEF/RCC1) (Nemergut és mtsai., 2001), míg a RanGTP hidrolízisét a

citoplazmában a RanGTPáz aktivitású protein (RanGAP) és ennek kofaktorai, a RanGTP kötő fehérjék (RanBP1 és RanBP2) végzik. A RanGAP és a RanBP2 jelentős része az NPC részeként, annak citoplazmatikus felszínéhez asszociálódva található (Matunis és mtsai., 1996; Mahajan és mtsai., 1997).



3. ábra: Nukleo-citoplazmatikus transzportfolyamatok sémája

A sejtmagi magas RanGTP szint eltérő hatással van az import és export folyamatokra. A RanGTP bekötődése a transzport faktorokhoz olyan konformációváltozást eredményez, amely az NPC-n keresztül a magba érkező import komplexek szétszerelődést (azaz az importált molekulák szabadabbá válását) (Lee és mtsai., 2000), az export komplexek esetében pedig az összeszerelődést (az exportálandó molekulák megkötését) indukálja (Matsuura és Stewart, 2004). A transzport faktorok RanGTP kötött állapotban exportálódnak a sejtmagból. Az NPC citoplazmatikus oldalán a RanGTP-t - RanBP-hez kötötten - a RanGAP hidrolizálja. A keletkezett RanGDP-t a transzport faktorok kis affinitással kötik, így mind a transzport faktorok, mind az exportált molekulák szabadabbá válnak. Az alacsony RanGTP szint az importálandó molekulák megkötésének és az import komplexek összeszerelődésének kedvez (Weis, 2002). A RanGDP-t az NTF2 szállítja vissza a magba, ahol a RanGEF újra GTP kötött formává alakítja (Ribbeck és mtsai., 1998) (3. ábra).

2. 2. 2. Importinok, exportinok, szignál szekvenciák

Az importin β -szerű transzport faktorok (karioferinek) családjába tartozó több mint 20 importin és exportin felelős a maghátyán keresztül szállítódó molekulák jelentős részének transzportjáért (Ström és Weis, 2001). A család exportot végző tagjai: Crm1; CAS; exportin-t; exportin 4, 5; importin 13 (ez utóbbi mindkét irányba szállít), míg önálló receptorként importot végző tagjai: importin β ; transzportin 1, 2; transzportin SR 1, 2; importin 4a, 4b, 5, 7, 8, 9a, 9b, 11, 13. Vannak olyan importinok is, amelyek importin β -val dimert alkotva működnek, pl.: importin α 1, α 3- α 7, importin 7, importin 8, xrip α , snurportin.

Különös jelentőséggel bírnak az importin α/β dimerek, ezek végzik ugyanis a klasszikus NLS (cNLS) tartalmú fehérjék importját: Az önálló transzportra képtelen importin α NLS kötőhelyén [un. Armadillo (ARM) ismétlődések] keresztül köti a szállítandó fehérje cNLS-ét, miközben N-terminális importin β kötő doménjén keresztül (IBB) dimerizálódik az importin β -val. Az importin β az NPC-vel kölcsönhatásba lépve vezérli a komplex bejutását a magba (Görlich és Mattaj, 1996) (4. ábra). A sejtmagi magas RanGTP szint hatására a komplex disszociál, és az importin β -RanGTP komplex önállóan, az importin α -RanGTP pedig CAS exportinhoz kötötten jut vissza a citoplazmába (Kutay és mtsai., 1997) (3. ábra).

Természetesen egy adott importin ill. exportin sokféle molekula szállítására képes, de a rendszert tovább bonyolítja, hogy adott molekula transzportjához többféle karioferint is

használhat (pl. a hisztonokat 5 különböző importin is szállítja (Muhlhauser és mtsai., 2001)).

Bár a transzportálandó molekulák nagy számához képest létező viszonylag kis számú karioferin arra enged következtetni, hogy a szubsztrátok megszabott szignál szekvenciákon keresztül kapcsolódnak a transzport faktorokhoz, ennek ellenére eddig csak néhány konszenzus szekvenciát ismerünk, és ezek is nagyon variábilisak:

Nukleáris export szignál (NES): leucin gazdag szakasz, melyet először a HIV Rev proteinjében írtak le: **LQLPPLERLTLD**, a CRM1 ismeri fel (Fischer és mtsai., 1995).

A nukleáris lokalizációs szignálok (NLS) lizin és arginin gazdag szekvenciák.

A klasszikus NLS-eket (cNLS) tartalmazó fehérjéket importin α - importin β dimerek szállítják. NLS-eiket szerkezetük alapján két csoportba soroljuk:

- Monopartit NLS-ek: 5-7 aminosavból állnak, tipikus példája az SV40 T antigénjében: **PKKKRKV** (Lanford és Butel, 1984)

- Bipartit NLS-ek: a bázikus aminosavak között egy 10-11 aminosavnyi összekötő szakasz található, pl. a nukleoplazminban: **KRPAATKKAGQAKKKK** (Dingwall és mtsai., 1982)

A nem klasszikus NLS-ekhez (ncNLS) nem rendelhető konkrét szekvencia, gyakran még bázikusabbak és összetettebbek, mint a klasszikus NLS-ek (pl. riboszómális proteinek (Jakel és Görlich, 1998)). Importjukban mind importin α/β dimerek (STAT esetén), mind önálló importinok (CREB, Fos, Jun esetén) részt vesznek (Forwood és mtsai., 2001).

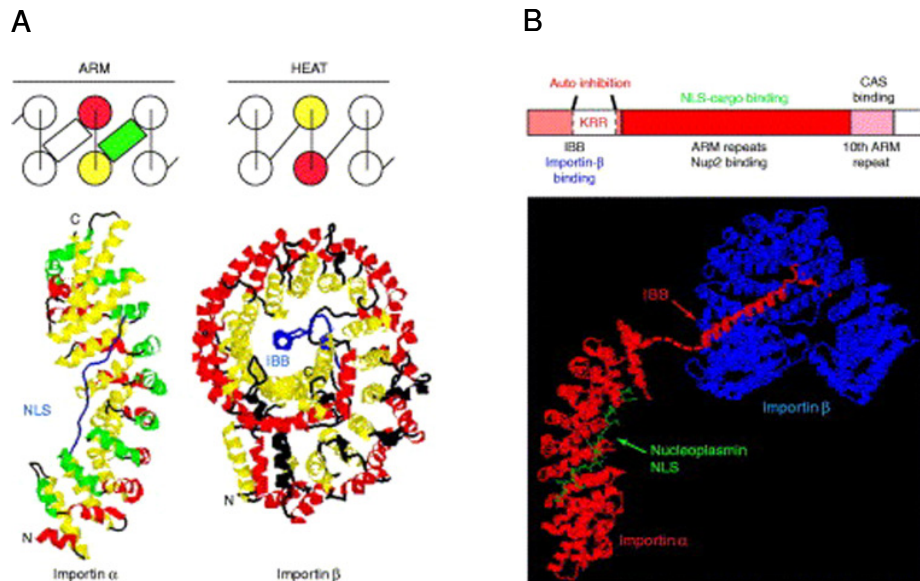
Mivel rohamosan nő azoknak a megismert fehérjéknek a száma, amelyek transzportjukhoz ncNLS-t használnak, így egyre bizonytalanabb módon lehet csupán szekvencia alapján egy fehérje sejtmagi transzportjára következtetni.

Az NLS-ekhez képest a sejtmagvacskába irányító (targeting) szignálok (NTS) még kevésbé jellemezhetők. Konszenzus NTS szekvenciát eddig nem írtak le, de mivel gyakran alkotják ezeket is bázikus aminosavak, így átfedhetnek az NLS-sel (Das és mtsai., 1998) de megjelenhetnek attól elkülönülve is (Creancier és mtsai., 1993).

A fehérjék sejtmagi transzportjának szabályozásában kiemelkedő szereppel bír a foszforiláció (Kaffman és O'Shea, 1999) melynek import folyamatokra gyakorolt hatása eltérő:

Az cNLS-en belül, vagy annak közvetlen szomszédságában bekövetkező foszforiláció csökkenti a cNLS-importin α elektrosztatikus kölcsönhatását, ami az importra nézve kedvezőtlen hatású (Harreman és mtsai., 2004).

A fehérje más részein, vagy egy inhibitor fehérjén bekövetkező foszforiláció elősegítheti az importot, ami konformáció változás (pl.: STAT (Bromberg, 2001)) vagy inhibitor leválás (pl.: NF- κ B (Shirakawa és Mizel, 1998)) következtében szabaddá váló NLS-sel magyarázható.



4. ábra: Az importin α és importin β molekulaszervezete; az importin α/β dimer kialakulása (Goldfarb és mtsai., 2004).

A: Az importin α cNLS kötött állapotban nyújtott molekula, melynek jelentős részét helikális szerkezetű tandem Armadillo ismétlődések (10 db) alkotják. Az importin β szerkezetét 10 tandem un. HEAT ismétlődés képezi, amelyek hurokkal összekapcsolt A és B hélixből állnak. Az A hélixek külső konvex felszín, a B hélixek a molekulán belül konkáv felszín hoznak létre. Az NPC kötés a konvex, az IBB kötés a konkáv felszínen történik.

B: Az önálló transzport lebonyolítására képtelen importin α szerkezetében az ARM ismétlődések zsebet formálva a cNLS kötésében vesznek részt. A molekula N terminálisán található flexibilis IBB domén transz helyzetben az importin β -hoz kapcsolódik, míg cisz helyzetben (visszahajolva) kölcsönhatásba lép az cNLS kötő zsebbel, ezáltal autoinhibitor funkciója van. Ennek következtében az importin α/β dimerekhez képest az önálló importin α jóval kisebb affinitással köti a szállítandó fehérjék cNLS-ét.

3. Metodikák

3. 1. Alkalmazott antitestek

Kísérleteink során a PI4K230 detektálására 4 különböző, monospecifikus, poliklonális antitestet használtunk. A fehérje aminosavszekvenciájában a 873-1145 peptidszakaszt felismerő (továbbiakban: anti-N) antitestet valamint a 1566-1863 szakaszra specifikus (anti-C) antitestet Dr. Vereb György kutatócsoportja korábbi munkája során állította elő. Az antitestek tisztítása a peptidszakaszokkal immunizált tyúkok tojássárgájából kloroformos extrakció és affinitáskromatográfia útján, valamint a tisztított antitestek specificitásának tesztelése két közleményben (Gehrmann és mtsai., 1999; Balla és mtsai., 2000) szerepel. A PI4K230 1361-1378 peptidszakaszára specifikus nyúlban termeltetett és affinitáskromatográfiával tisztított antitestet (PI4KIII α) Dr. Balla Tamástól kaptuk (Balla és mtsai., 2005), míg az 1201-1220 peptidszakasz elleni kecske N-19-jelű antitestet a SantaCruz-tól vásároltuk.

A PI4K55 α elleni nyúl antitesteket Dr. Pietro de Camilli (Yale University School of Medicine, New Haven, USA) bocsátotta rendelkezésünkre. A PI4K92 ellen nyúlban termeltetett (Upstate Biotechnologies), a nukleolin és fibrillarin ellen egerben termeltetett (Santa Cruz), a poli-hisztidin ellen HRP (torma-peroxidáz)-jelzett eger (anti-poli-His) (Sigma), a glutation-S-transzferáz (GST) ellen nyúlban termeltetett (anti-GST) (Sigma) a hemagglutinin (HA) ellen nyúlban termeltetett (anti-HA) (Covance) gyári antitestet használtunk. Az primer antitestekre specifikus Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 647 festékekkel jelölt második antitesteket a Molecular Probes-tól, míg a peroxidázzal HRP-jelölt második antitesteket a Sigmától vásároltuk.

Anti-PI4K230 antitest jelölése Alexa Fluor 488 fluoreszcens festékkel

A PI4K230 elleni, affinitáskromatográfiával tisztított anti-C antitestet 0,1 M NaHCO₃ (pH: 8,3) pufferben gyári előírás szerint reagáltattunk aminoreaktív (succinimido) Alexa Fluor488 fluoreszcens festékkel (Molecular Probes; szobahőmérséklet, 1 h) majd azonos térfogat 1 M etanolamin-HCl (pH: 8,0) oldattal blokkoltuk 1 órán át. A festék feleslegét ötszöri 1:10 arányú PBS (10 mM K-foszfát, 120 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH:7,4) hígítást követően Centricon-10 mikrokonzentrátorban (Amicon) történő koncentrálással távolítottuk

el. A jelölt antitest festék/fehérje aránya 2,2 volt. Immuncitokémiai jelölésre 4 µg/ml koncentrációban használtuk.

3. 2. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat a Ruhr Egyetem (Bochum, Németország) az Anatómia és a Fiziológiai Kémia Intézetében végeztem Dr. L.M.G. Heilmeyer és Dr. Elisabeth Petrasch-Parwez mellett, az alábbiakban leírt módon.

3. 2. 1. Preparálási technikák

A kísérleti patkányok kezelése a nemzetközi és német előírásoknak megfelelően történt. A **paraformaldehides perfúziós eljárás** során a nátriumpentobarbitállal (10mg/100g testsúly) altatott patkányok mellkasát feltárva a szívcsúcson bevezetett kanülön át perfúziót végeztünk: elsőként 4% dextrán (Pharmacia) és 3 g/l nátrium-nitroprusszid tartalmú módosított Ringer oldattal (pH:7,4) 15 másodpercig, majd PBS-ben oldott 4%-os (m/v) depolimerizált paraformaldehid (PFA) (Sigma) oldattal 30 percig (0,5-1 l). Az agyat és gerincvelőt kipreparáltuk, fagyasztó médiumba (Leica) ágyasztuk majd 8% metilciklohexánt tartalmazó 2-metilbután (v/v, -80°C) oldatban lefagyasztottuk és -20°C-on tároltuk.

A **gyorsfagyasztós metszetek** készítéséhez a patkányokat CO₂ gázban elkábítottuk, majd a lehető legrövidebb idő alatt (kb. 3 perc) kipreparáltuk az agyat és a gerincvelőt és a fent említett módon fagyasztottuk és tároltuk.

3. 2. 2. Immunfluoreszcenciás jelölés

A fagyasztott szövetekből kriosztáttal 16-20 µm vastag metszeteket készítettünk, amelyeket 1 órán át, 40°C-on szilanizált tárgylemezre szárítottunk. Ezt követően a metszeteket abszolút etanolban (-20°C, 10 perc) vagy 4%-os (m/v) PFA oldattal fixáltuk (szobahőmérséklet 30 perc). Egyes metszeteknél a PFA fixálás előtt 10 perces, szobahőmérsékletű PBS előmosást végeztünk. Fixálás után a minták kezelése szobahőmérsékleten történt. A fixált metszeteket 30 percig mostuk PBS-sel, majd 1 óráig blokkoltuk 10% normál szérum (NS) (a második antitest állatának széruma, itt: normál kecske

szérum) tartalmú TX-TPBS oldattal (10mM Tris, 0,5% (m/v) Triton X-100 PBS-ben). A primer antitestekkel (anti-N 5 µg/ml, anti PI4K92 2,5 µg/ml) egy éjszakán át inkubáltuk a metszeteket. Kontrollként anti-N antitest helyett tisztított csirke IgY szolgált. Második antitestként, Alexa Fluor 488 fluorofórral jelölt, kecskéből származó anti-csirke IgY-t, illetve anti-nyúl IgG-t (Molecular Probes) használtunk 4 µg/ml koncentrációban 2 órán át inkubálva a metszetet. Az antitesteket 1% NS tartalmú TX-TPBS-sel hígítottuk. A metszeteket minden inkubáció után 3x10 percig PBS-el mostuk, végül ProLong Antifade (Invitrogen) lefedés és egy éjszakás száradás után konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

3. 2. 3. Citrát pufferes antigénfeltárás

A PFA által maszkírozott epitópok feltárására a PFA 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.

3. 3. Sejtvonalak és fenntartásuk

Az alábbi emlős (ATCC forgalmazású) sejtvonalakat használtuk: *HCN1A* (primer human cortical neuronal), *B50* (patkány neuroblastoma) *HeLa* (human cervical adenocarcinoma) *COS-7* (afrikai zöld majom vese). Valamennyi sejtvonalat 37 °C-os, 5% CO₂ tartalmú termosztátban növesztettük, tápoldatként 10% (v/v) FCS (fetal calf serum) 2 mM L-glutamin és 10 µg/ml gentamycin tartalmú DMEM-et (Dulbecco's modified Eagle's médiumot) használtunk. A szubkonfluens állapotú sejtvonalakat heti 2-3 alkalommal passzáltuk, 0,25% (m/v) tripszin and 0,05% (m/v) EDTA oldattal felválasztva és a tápoldattal 1:4-1:8 arányban hígítva ($2-4 \times 10^4$ sejt / cm²). A sejteket folyékony nitrogénben tároltuk, fagyasztó médiumként 20% (v/v) FCS és 10% (v/v) DMSO (dimetil-szulfoxid) tartalmú DMEM-et használtunk.

Immuncitokémiai vizsgálatokhoz az alacsony passzázs-számú sejteket 24-lyukú tenyésztőedénybe helyezett, 12 mm Ø üveg fedőlemezekben növesztettük. A HCN1A sejteket esetenként az immuncitokémiai vizsgálat kezdete előtt 4 órával differenciációt indukáló kezelésnek tettük ki 25 ng/ml idegi növekedési faktort (NGF), 0,5 mM izobutil-metil-xantint (IBMX) és 0,5 mM dibutiril-ciklikus AMP-t (dBcAMP) adva a tápoldathoz.

Az Sf9 (*Spodoptera Frugiperda*) rovar sejteket (Invitrogen) 10 µg/ml gentamycin tartalmú SF-900 II SFM médiumban (Invitrogen), letapadó formában, 28 °C +/- 0,5 °C-on

növesztettük. A heti 3 alkalommal elvégzett passzálás során a sejteket ütégetésével választottuk fel a tenyésztőedény aljáról és a szubkultúrában $3-5 \times 10^5$ sejtszámot állítottunk be. A sejtek fagyasztásához 50% régi és 50% új tápoldatot valamint 7,5% (v/v) DMSO-t használtunk.

3. 4. Immuncitokémia

Az immuncitokémiai vizsgálatok fixálás, blokkolás és immunfestés lépései nagyrészt azonosak az immunhisztokémiai vizsgálatoknál bemutatottakkal, azonban az első és második antitestekkel csak 1 óráig inkubáltuk a sejteket és hígításukhoz 5% NS tartalmú TX-TPBS-t használtunk. Az egyes lépések között 3x 5 perces PBS mosásokat alkalmaztunk.

Első antitestek koncentrációi: anti-N: 2 $\mu\text{g/ml}$, anti-C: 4 $\mu\text{g/ml}$, N-19: 20 $\mu\text{g/ml}$, anti-PI4KIII α : 6 $\mu\text{g/ml}$, anti-PI4K92: 5 $\mu\text{g/ml}$, anti-PI4K55 α : 40 $\mu\text{g/ml}$, anti-nukleolin: 4 $\mu\text{g/ml}$, anti-fibrillarin: 4 $\mu\text{g/ml}$, anti-HA: 2 $\mu\text{g/ml}$. Az Alexa Fluor festékekkel jelzett második antitesteket 4 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban használtuk. A sejtmagok helyzetének pontos meghatározásához propidium-jodidos DNS festést végeztünk 1 $\mu\text{g/ml}$ PBS koncentrációban, 5 percig.

3. 4. 1. B50 sejtek TX-100 és nukleáz kezelése

A fedőlemezen növesztett sejteket 15 percig proteáz inhibitorok jelenlétében (aprotinin, leupeptin, chymostatin, TPCK mindegyik 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban) szobahőmérsékleten TX-TPBS-sel permeabilizáltuk. majd 17 $\mu\text{g/ml}$ dezoxiribonukleáz I-el (DNáz I) (Sigma) , 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 és proteáz inhibitorok jelenlétében vagy 70 $\mu\text{g/ml}$ ribonukleáz A-val (RNáz A) (Sigma) 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA és proteáz inhibitorok jelenlétében inkubáltuk, szobahőmérsékleten 20 percig. Ezt követően a sejteket PBS-sel mostuk, etanollal fixáltuk, majd immunfluoreszcenciával jelöltük a fent leírt módon.

3. 5. COS-7 sejtek siRNS kezelése

A kezelést megelőző napon a COS-7 sejteket fedőlemezekre passzáltuk, 10^4 sejt/ cm^2 sűrűségben. Másnap 30-40%-os konfluenciánál a sejteket Oligofectamine (Qiagen) felhasználásával transzfektáltuk 0,2 μM dupla-szálú RNS-sel (Qiagen), aminek szekvenciája

megfelelt a PI4K230 1072-1092 nukleotidszakaszának. A transzfekció során Opti-MEM-et (Invitrogen) használtunk, technikai kivitelezése a gyári leírásnak megfelelően történt. 6 óra múlva a tápoldatot 10% FCS tartalmú DMEM-re cseréltük. Az siRNS transzfekciót 24 óra elteltével megismételtük, a PI4K230 fehérje szinten bekövetkező változását immuncitokémiai eljárással az első transzfekciót követő harmadik napon vizsgáltuk.

3. 5. 1. Az siRNS kezelés hatékonyságának vizsgálata RT-PCR technikával

A PI4K230 mRNS szintű változását RT-PCR módszerrel mutattuk ki, siRNS kezelt és kontroll COS-7 sejteken. A sejteket 6-lyukú tenyésztőedény lyukaiba passzáltuk 10^4 sejt/cm² sűrűségben és a fent leírt módon transzfektáltuk siRNS-sel. A kontroll sejteket a transzfektáltakkal azonos módon kezeltük, de siRNS nélkül. A transzfekció után 1 nappal totál RNS-t preparáltunk SV Total RNA Isolation System (Promega) segítségével a gyári utasítás szerint.

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 (RNase H Minus, Point Mutant) használtunk 1 x RT pufferben, 25 µl végtérfogatban (valamennyi anyagot a Promegától vásároltuk). Először az RNS-t és random primert tartalmazó oldatot 70 °C-on 5 percre inkubáltuk, majd a többi komponenst hozzáadva 50 °C-on 50 percre folyt a reverz transzkripció. Az így nyert cDNS PI4K230 tartalmának specifikus felszaporításához használt primerek szekvenciája: 5'-AACATGGAAGAGTCTCTCCTCTC-3' és 5'-CCATCACACT-GGCTACAATG-3' a kontrollként használt gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) felszaporításához használt primerek szekvenciája: 5'-GCCTCAAGATCATCAGCAAT-3' és 5'-GAGCTTGACAAAGTGGTCGT-3'.

A PCR közeg összetétele: (50 µl végtérfogatban): 3 µl RT közeg, primerek egyenként 0,5 µM, dNTP-k egyenként 0,2 mM, polimeráz (Long PCR Enzyme Mix, Fermentas) 1, 25 U és 1x puffer (15 mM MgCl₂ tartalmú).

A polimeráz reakció során alkalmazott PCR profil:

- 94 °C	2 perc		
- 59,4 °C	30 s	}	35x
- 68 °C	50 s		
- 94 °C	20 s		
- 59,4 °C	30 s		
- 68 °C	10 perc		

A PCR során felszaporított DNS szakaszok megjelenítéséhez a mintákat etidium-bromid tartalmú, 1%-os agaróz gélen futtattuk és UV-ban detektáltuk.

3. 6. COS-7 sejtek transzfektálása

A PI4K230 és deléciós mutáns formáinak szubcelluláris lokalizációjára COS-7 sejteket transzfektáltunk PI4K230, illetve a mutáns cDNS-eket hordozó emlős expressziós vektorokkal (2. táblázat), melyeket Dr. Heilmeyer L.M.G. kutatócsoportja (Ruhr Egyetem, Bochum, Németország) készített.

deléción	molsúly (kDa)	plazmid	Expresszált fehérje aktivitása $\mu\text{mol/mg/perc}$
-	230	pHM6-PI4K230	58
1-872	130	pEGFP-Δ130	48
1-1189	97	pEGFP-Δ97	-
1-1427	68	pEGFP-Δ68	-
1-1531	56	pEGFP-Δ56	-

2. táblázat: *PI4K230 fehérjét és deléciós mutánsait kódoló emlős expressziós vektorok*

A vektorokat először One Shot TOP10 coliban felszaporítottuk (baktériumos munka részleteit lásd a: 3. 9. és 3. 10. 2. fejezetben), Minipreppel (Qiagen) kitisztítottuk és tisztaságukat agaróz gélen megfuttatva ellenőriztük.

A transzfekciót megelőző napon a COS-7 sejteket 10^5 sejt/cm² sűrűségben, 24-lyukú tenyésztő lemez lyukaiba helyezett üveg fedőlemezre passzáltuk. A transzfekció napján elért 60-70% konfluenciájú tenyészetet FuGENE 6 transzfekciós reagens (Roche) segítségével transzfektáltuk az adott plazmiddal, a gyári leírásnak megfelelően. (Alkalmazott FuGENE (μl)/DNS (μg) arány=3:2). A PI4K230, PI4K Δ 130 és PI4K Δ 97 fehérjék kifejeződését két nap múlva, a PI4K Δ 68 és PI4K Δ 56 fehérjék kifejeződését pedig a transzfekciót követő napon vizsgáltuk. Az etanollal fixált COS-7 sejtekben az expresszált PI4K230-at a fehérje N-terminálisán expresszáldó hemagglutinin (HA) indirekt immunfluoreszcens jelölését

követően (3. 4. fejezet) konfokális mikroszkóppal detektáltuk. Mivel a deléciós mutáns fehérjét N-terminális GFP (zöld fluoreszcens protein)-fúziós formában expresszáltuk, etanol fixálás után közvetlenül vizsgálhatók voltak konfokális mikroszkóppal.

3. 7. PI4K230 expresszió Sf9 sejtekben

A PI4K230 rovarsejtes expresszióját a Bac-to-Bac bakulovírus expressziós rendszer (Invitrogen) segítségével valósítottuk meg. A munkához használt anyagok jelentős részét az Invitrogen-től vásároltuk.

3. 7. 1. A PI4K230 cDNS klónozása bakulovírusba

A PI4K230-at először egy pFastBac-HT típusú donor plazmidba klónoztuk, ami szerkezetében olyan Tn7 elemeket tartalmaz, amelyek lehetővé teszik a közéjük inzertált gén irányított transzpozícióját a bakulovírus genomba (bakmid).

A PI4K230 cDNS-ét pHM6 plazmidba klónozva Dr. Heilmeyer L. M. G. bocsátotta rendelkezésünkre. A plazmidot a PI4K230 cDNS-ének 5' végén található HindIII hasítóhelynél emésztettük (Fermentas) a keletkezett túlnyúló véget Klenow enzimmal (Promega) feltöltöttük a gyári utasításnak megfelelően, majd a PI4K230 cDNS 3' végén található NotI restrikciós hasítóhelynél emésztve (Fermentas) kihalásztottuk a cDNS-t.

A pFastBac-HT B olvasási keretű plazmidot StuI és NotI restrikciós enzimekkel (Fermentas) emésztettük, majd a PI4K230 közeggel együtt 1%-os agaróz gélen megfuttatva a kívánt sávokat a gélből Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega) segítségével gyári leírás szerint tisztítottuk. A puffercserét az egyes hasítások között ammónium-acetát + etanolos kicsapással biztosítottuk az alábbi lépésekkel: inkubálás 1/10 térfogat ammónium-acetáttal (4M, pH: 5,4) és 3 térfogat abszolút etanollal (4°C, 10 perc), centrifugálás (12000 rpm, 10 perc), csapadék mosása 70% etanollal, centrifugálás (12000 rpm, 10 perc), szárítás, csapadék felvétele TE pufferben vagy steril vízben.

A gélből kinyert, hasított pFastBac-HT-B plazmidot és PI4K230 cDNS-t 1:3 arányban ligáltuk T4 DNS ligázzal (Promega). A ligálási közeggel először a One Shot TOP10 kompetens *Escherichia coli*-t transzformáltuk (Invitrogen), majd a felszaporított transzformáns coliból Miniprep-pel (Qiagen) a gyári utasítást követve tisztítottuk a pFastBac-HT-B-PI4K230 plazmidot mely a restrikciósan emésztett plazmid gélképe alapján valóban tartalmazta a PI4K230 cDNS-t. A rekombináns plazmidot DH10Bac kompetens *E. coli*-ba

transzformáltunk. (A transzformáció és baktérium tenyésztés részletei: 3. 9. és 3. 10. 2. fejezet.) A DH10Bac coli gyárilag tartalmazta a bakmidot és egy segéd plazmidot, amely a transzpozázt kódolja. Mivel a transzpozíció törölkreszi a bakmid genom LacZa génjét, így Blue-gal tartalmú táptalajon fehér színnel jelentek meg a rekombináns bakmidot tartalmazó kolóniák. A kiválasztott és felszaporított kolóniából S.N.A.P. MidiPrep Kit segítségével tisztítottuk ki a bakmidot. A bakulovírus genomra specifikus M13 forward és M13 reverse primerekkel elvégzett PCR eredménye egyértelműen igazolta a PI4K230 jelenlétét a bakmidban. Ezenkívül szekvenálással az olvasási keret helyességét is ellenőriztük. A rekombináns bakulovírusok létrehozásához az Sf9 sejteket transzfektáltuk a bakmiddal (1µg DNS / 9×10^5 sejt), Cellfectin reagenst és Grace's Insect Cell Culture Medium-ot használva a megadott leírásnak megfelelően. 72 órával a transzfekció után az Sf9 sejtek nagy mennyiségben ürítették a vírusokat, ekkor a rekombináns vírus tartalmú tápoldatokat begyűjtöttük (un. P1 stock), a sejtörmelégeket lecentrifugáltuk, majd 4 °C-on fénytől védve felhasználásig tároltuk.

3. 7. 2. Vírustiter meghatározás

A vírustiter meghatározáshoz 6-lyukú sejttenyésztő lemez lyukaiba 10^6 Sf9 sejtet passzáltunk (kb. 50%-os konfluencia). Letapadás után a vírus törzsoldatból készített 10x tovaftó hígítású oldatokkal (hígítás: Grace's Insect Cell Culture Medium) 1 órán át fertőztük az egyes lyukakban lévő Sf9 sejteket. Ezt követően a sejteket tápoldatot tartalmazó 1%-os agaróz oldatba ágyasztuk (ehhez 1,3x Sf-900 Mediumot használtunk) és páradús környezetben 27 °C-on 10 napig inkubáltuk. A vírusok által létrehozott tarfoltokat 1 mg/ml neutralvörös oldattal való festés után számoltuk össze. Vírustiter: legkevesebb tarfoltot tartalmazó lyuk foltjainak a száma x hígítás mértéke.

A PI4K230 rekombináns bakulovírusokat tartalmazó P1 oldat titere 2×10^6 volt. Mivel ez fehérjeexpresszióra alacsony, így $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ sűrűségű tenyészetet újra fertőztünk $\text{MOI}=0,1$ értékkel (MOI = multiplicity of infection – vagyis az 1 sejtre jutó víruspartikulák száma). A fertőzést követő 5. napon begyűjtött tápoldat (P2 stock) titere 5×10^7 volt.

3. 7. 3. PI4K230 expresszió

Expressziós céllal végrehajtott vírusfertőzés esetén 2×10^5 sejt/ cm^2 sűrűségű Sf9 sejteket $\text{MOI}=5$ értékkel fertőztünk. Az expressziós szintet 12 óránként tesztelve (SDS-

PAGE-val) megállapítottuk, hogy a maximális expresszió 96 óránál következik be. Mivel az Sf9 sejtek a PI4K230-at nem szekretálták, így közvetlenül a sejteket gyűjtöttük össze, melyeket jéghideg PBS-sel mostunk majd felhasználásig -70°C-on tároltuk.

A feltárás során a sejteket lízis pufferrel 1 percig vortexeltük, majd ultrahanggal kezeltük (lízis puffer: 20 mM KH_2PO_4 pH 7,0, 150 mM NaCl, 1% (v/v) TX-100, 0,5 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ pepstatin, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin). Import kísérletekhez import pufferben (összetételét lásd a 3. 14. fejezetben) oldott 60 $\mu\text{g/ml}$ digitoninnal készített lizátumot hígítottunk 1:20 arányban import pufferrel az import kísérletek leírásánál alkalmazott proteázinhibitor koncentrációk mellett.

A rekombináns PI4K230 immunobloton PI4K230 specifikus antitestekkel és az N-terminális poli-His tag elleni anti-poli-His antitesttel is kimutatható volt. A fehérje megfelelő szerkezetét bizonyítja, hogy enzimaktivitással is rendelkezett. (Tiszta PI4K230-at sem immunprecipitációval sem nikkel agaróz kromatográfiával nem sikerült a lizátumból izolálni a - feltehetően a fehérje hidrofobicitásából fakadó - gyantaszemcsékhez való erős aspecifikus kötődése miatt.)

3. 8. PI4K aktivitásmérés

A PI4K aktivitásmérése során a $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP-ből a PtdIns-ba beépülő radioaktív foszfát mennyiségét határozzuk meg. A PtdIns (4)P savas közegben történő kloroform-metanolos extrakcióval választható el a be nem épült ATP-től és a foszfoproteinektől (Schacht, 1981). A PtdIns-ba beépült radioaktív foszfát mennyiségét folyadékszintillációs spektrométerrel mértük. A reakcióközeg összetétele 37,5 μl végtérfogatban:

26 μl minta; 0,83 mg/ml PtdIns; 5 mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (400-800 Bq/nmol); 27 mM MgCl_2 ; 116 mM KCl; 116 mM Hepes / KOH; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTE; 0,4% (v/v) Triton X-100 (pH 7,5)

A reakcióelegyet 25°C-on 15-30 percig inkubáltuk majd a reakciót 1ml kloroform/metanol (3:1) elegyével állítottuk le. Miután a közeghez 0,15 ml 2,4 M HCl-ot mértünk, erős vortexelés hatására a radioaktív ATP a felső vizes fázisba került. Az alsó, radioaktív PtdIns (4)P tartalmú kloroformos fázis aliquotját 2,5 térfogat metanol/HCl (1M) 1:1 arányú keverékével mostuk, majd a kloroformos alsó fázisból 100 μl radioaktivitását 1 ml szcintillációs folyadékkal mértük. Az enzimaktivitás számítása: 1 egység (U) enzim 1 nmol foszfátot épít be 1 perc alatt a szubsztrátból a fenti reakciókörülmények között.

3. 9. Baktériumok tenyésztése, tárolása

Munkánk során plazmidszaporításhoz One Shot Top 10, expresszióhoz BL21, BL21(DE3), BLR és M15 E. coli törzseket használtunk, rekombináns bakulovírus konstrukt készítéshez pedig DH10Bac coli törzset.

A munkánk során használt baktérium törzsek genotípusa:

BL21: F⁻, dcm, ompT, hsdS(r_B⁻m_B⁻), gal., lon(4)

BL21(DE3): F⁻, dcm, ompT, hsdS(r_B⁻m_B⁻), lon(4), galλ(DE3)

BLR: F⁻, dcm, ompT, hsdS(r_B⁻m_B⁻), gal., lon(4), recA⁻

M15: pREP4:: kan^R

One Shot TOP10: F⁻, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, RecA1, araD139, Δ(ara-leu)7696, galU, galK, rpsL, (Str^R), endA1, nupG

DH10Bac: F⁻, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ(ara, leu)7697, galU, galK, λ-rps-L, nupG/bMON14272/pMON7124

A baktériumokat 37 °C-on 200 rpm fordulatszámon rázatva növesztettük. A tenyésztéshez használt tápoldatok összetétele m/v %-ban:

LB : 1% Trypton (tripszinnel emésztett kazein, Spektrum 3D), 1% élesztő kivonat (Spektrum 3D), 0,5% NaCl, pH 7,2

2YT: 1,6% Trypton, 0,5% élesztő kivonat, 0,5% NaCl, pH 7,2.

A szilárd táptalajként használt **LB-agar lemezek** 1,5% agar-agar tartalmúak (Spektrum 3D)

Az alkalmazott antibiotikumok koncentrációja: ampicillin: 100 µg/ml, kanamycin: 30 µg/ml.

A baktériumokat 20% glicerol tartalmú tápoldatban, -80 °C-on tároltuk.

3. 10. Fehérjék expresszálása baktériumokban

3. 10. 1. Baktériumok kompetenssé tétele

A One Shot Top 10 és DH10Bac colikat gyárilag kompetensen vásároltuk, a többi baktériumtörzset CaCl₂-os módszerrel tettük kompetenssé. Ehhez a baktériumokat OD₆₀₀ (600 nm-en mért abszorbancia érték) = 0,3-0,5 sűrűségig növesztettük. Ezután a tenyészetet 4 °C-

ra hűtöttük és a baktériumokat centrifugálással (5000 rpm, 5 perc) összegyűjtöttük. A felülúszót eltávolítva a baktériumokat eredeti (V) térfogatú 50 mM jéghideg CaCl_2 (pH 7,4) oldatban szuszpendáltuk és 30 percig jégen állni hagytuk. Újabb centrifugálást követően a baktériumokat 1/10 V 50 mM CaCl_2 -ban vettük fel és vagy közvetlenül használtuk transzformációra, vagy 20% glicerollal lefagyasztva $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk. Ilyen körülmények között 1 évig kompetensek maradtak.

3. 10. 2. Transzformáció

Az általunk kompetenssé tett coli baktériumok (30 μl) transzformálásához 5-10 ng DNS-t használtunk. A kompetens sejteket és a plazmid DNS-t 30 percig inkubáltuk jégen, majd $42\text{ }^\circ\text{C}$, 2 perces hő sokknak tettük ki. A transzformációs elegy lehűtése után 80 μl SOC tápoldatot [2% (m/v) Trypton, 0,5% (m/v) élesztő kivonat, 0,05% (m/v) NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 20 mM glükóz, pH 7,0] hozzáadva $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on 200 rpm fordulatszámmal rázattuk, majd 1 óra múlva -megfelelő antibiotikumot tartalmazó- LB-agar lemezekre szélesztettük. A $37\text{ }^\circ\text{C}$ -os inkubátorban 14 óra alatt kinőtt telepekből egy különállót levettünk, megfelelő antibiotikum tartalmú tápoldatban felnevesztettük, belőle glicerines tartalékot fagyasztottunk, valamint plazmidot preparáltunk vagy tovább vittük fehérje expresszióra. (A gyári kompetens coli törzsek transzformálásakor a cég által ajánlott protokollt követtük.)

3. 10. 3. Fehérjék expresszálása

A sejtmagi import vizsgálatához használt expresszált és tisztított fehérjék előállításához a Ran-expressziós konstruktot Dr. Szabad János munkacsoportja (Szegedi Tudományegyetem), a RanGAP, importin $\alpha 1$ és importin β expressziós vektorokat Dr. Dirk Görlich (Heidelbergi Egyetem, Németország), az importin $\alpha 3$ és importin $\alpha 5$ expressziós konstruktokat Dr. Riku Fagerlund (National Public Health Institute, Helsinki, Finnország) bocsátotta rendelkezésünkre.

A vektorokat először One Shot TOP10 coliba transzformáltuk, felszaporítottuk, Miniprepel (Qiagen) kitisztítottuk és tisztaságukat (hasítás után) agaróz gélen megfuttatva ellenőriztük. Ezt követően a plazmidokat az expressziós coli törzsekbe transzformáltuk (3. táblázat). A pQE-importin β tartalmú M15 coli felszaporításához 2YT, a többi vektort tartalmazó coli esetében pedig LB tápoldatot használtunk. Valamennyi konstrukt rezisztenciát hordoz 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillinre; emellett az M15 coli tápoldatát 30 $\mu\text{g/ml}$ kanamycinnel is kiegészítettük. Az M15 coli LacI^q represszort túltermelő (kanamycin rezisztens) pREP4

plazmidot hordoz, ami a lac operon-nal rendelkező plazmidok indukció nélküli expresszióját gátolja, így lehetővé teszi olyan, a coli számára toxikus fehérjék termelését, mint a RanGAP, importin $\alpha 1$, importin β . A még hatékonyabb expresszió-gátlás érdekében, ezek expressziója esetén az agar lemezekhez és a kis térfogatú kultúrában való növesztéshez 2% (m/v) glükózt is használtunk.

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 $\alpha 1$	<i>pQE-70</i>	<i>M15</i>	<i>Ni-agaróz</i>
Importin $\alpha 3$	<i>pQE-60</i> (<i>poli-His-t kódoló szakasz GST-re cserélve</i>)	<i>BL21</i>	<i>GSH-sepharose</i>
Importin $\alpha 5$	<i>pQE-60</i> (<i>poli-His-t kódoló szakasz GST-re cserélve</i>)	<i>BL21</i>	<i>GSH-sepharose</i>
Importin β	<i>pQE-60</i>	<i>M15</i>	<i>Ni-agaróz</i>

3. táblázat: Fehérjék expressziója és tisztítása

Mikor a baktériumtenyészetek sejtsűrűsége elérte az $OD_{600}=0,4-0,7$ értéket, a fehérjék termelődését IPTG-vel (Izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid) indukáltuk. Az indukció körülményei: RanGAP és importin $\alpha 1$: 1 mM IPTG, 28 °C, 3 óra; importin β : 1 mM IPTG, 2% etanol, 18 °C 3 óra; Ran, importin $\alpha 3$ és importin $\alpha 5$: 0,4 mM IPTG 28 °C, 4 óra. Az indukció végén a baktériumokat lecentrifugáltuk (5000 rpm, 15 perc, 4 °C), jéghideg PBS-sel mostuk, újabb centrifugálás után lízis pufferben vettük fel és ultrahanggal (3x1 perc) feltártuk. A lízispuffer összetétele:

- RanGAP, importin $\alpha 1$ és importin β izolálásakor: 50 mM Tris/HCl (pH: 7,5), 200 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 4 mM merkaptóetanol, leupeptin (2 $\mu g/ml$), pepstatin (10 $\mu g/ml$), TPCK (100 $\mu g/ml$), PMSF (1 mM), aprotinin (Gordox) (0,2 ml/ml), benzamidin (50 mM);
- Ran tisztításakor: 50 mM Tris/HCl (pH: 7,4), PMSF (0,5 mM), benzamidin (50 mM), leupeptin (2 $\mu g/ml$), pepstatin (10 $\mu g/ml$) és TPCK (100 $\mu g/ml$);

- Importin $\alpha 3$ és importin $\alpha 5$ tisztításakor: 50 mM Tris/HCl (pH: 7,5), Gordox (0,2 ml/ml), benzamidin (50 mM), pepstatin (10 μ g/ml), TPCK (100 μ g/ml), phosphoramidon (10 μ g/ml), PMSF (1 mM), bestatin (20 μ g/ml), E-64 (5 μ g/ml).

Feltárást követően a lizátumot centrifugáltuk (15000 rpm, 15 perc, 4 °C) és a felülúszót használtuk affinitáskromatográfiás tisztításra.

3. 10. 4. Fehérjék tisztítása nikkel-agarózon

A Ran, RanGAP, importin $\alpha 1$ és importin β expresszált proteinek N-terminálisán poli-His-tag található, így tisztításukhoz Ni-agarózt (Qiagen) használtunk az alábbiak szerint:

- Gyanta ekvibrálása: 50 mM Tris/HCl (pH: 7,4).
- Adszorpció: minta felvitele, gyantával forgatás 30 perc, 4 °C
- Mosások: 1.: 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,1% TX-100, proteázgátlók
2.: 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,1% TX-100, 0,5 M NaCl
3.: 50 mM Tris/HCl (pH 7,4); 0,5 M NaCl
4. : 5 mM imidazol ekvibráló pufferben;
5.: 20 mM imidazol ekvibráló pufferben;
- Elúció: 200 mM imidazol ekvibráló pufferben.

Az eluátum fehérje tartalmú frakcióit Centriprep-10-ben (Amicon) koncentráltuk. A tisztítás során az egyes frakciók fehérjeösszetételét, és a tisztítandó fehérje feldúsulását SDS-PAGE segítségével Coomassie festéssel ellenőriztük. A gél festésére (15 perc) használt oldat: 0,25% (m/v) Serva blue R 250; 45,4% (v/v) metanol; 9,2% (v/v) ecetsav; a főleges festék kimosását 12% (v/v) etanol, 7% (v/v) ecetsav oldattal végeztük. Az eluátumban Coomassie festéssel kapott fehérjesáv(ok) azonosítására immunoblottot is végeztünk. A koncentrált eluátumot 30 % glicerollal vagy 250 mM szacharózzal -20 °C-on tároltuk.

3. 10. 5. Fehérjék tisztítása GSH-sepharose-on

A pGEX típusú plazmidról expresszált importin $\alpha 3$ és importin $\alpha 5$ fehérjéket az N terminális GST-tag segítségével GSH-Sepharose-on tisztítottuk az alábbi lépésekkel:

- GSH-Sepharose oszlop ekvibrálása: 50 mM Tris/HCl (pH. 7,5)
- Adszorpció: minta forgatása a gyantával, 30 perc, 4 °C
- Mosások: 1.: 50 mM Tris/HCl (pH: 7,5), benzamidin (25 mM), PMSF (0,1 mM) Gordox (0,1 ml/ml)
2.: 50 mM Tris/HCl (pH: 7,5)

- Elúció: 10 mM redukált glutation (GSH) 50 mM Tris/HCl (pH: 8,0)-ban oldva

A frakciók fehérjeösszetételének ellenőrzése és a frakciók koncentrációja a Ni-agarózos tisztításnál bemutatott módon történt. A koncentrált eluátumokat 250 mM szacharóz jelenlétében -20 °C-on tároltuk.

3. 11. Szintetikus peptidek kapcsolása Alexa Fluor 488 fluoreszcens festékkel jelölt BSA-hoz és tripszin inhibítorhoz

A PI4K230 nukleáris transzportjában feltételezett monopartit, bipartit és nem klasszikus NLS szekvenciák vizsgálatára ezen NLS-eknek megfelelő szekvenciájú, és bázikus aminosavakban mutáns peptideket szintetizáltattunk, melyeket Alexa Fluor 488-al jelölt BSA-hoz, illetve tripszin-inhibítorhoz (trp.inh.) kapcsoltunk. A szintetikus peptidek összetételét mutatja a 4. táblázat.

Elnevezés	Szintetikus peptidek szekvenciája
NLS1	Cys- ⁹¹⁶ NFNHIIHKRIRRVADKYLSG ⁹³⁴
NLS1mut	Cys- ⁹¹⁶ NFNHIIHAAIAAVADKYLSG ⁹³⁴
NLS2	Cys- ¹⁴¹⁴ SKKTNRGSQLHKYYMKRRTL ¹⁴³³
NLS2mut	Cys- ¹⁴¹⁴ SAATNRGSQLHKYYMMGMTL ¹⁴³³
NLS2/1	Cys- ¹⁴¹⁴ SKKTNRGSQLHKY ¹⁴²⁶
NLS2/2	Cys- ¹⁴²⁷ YMKRRTL ¹⁴³³
NLS3	Cys- ⁹³⁴ GLVDKFPHELLWSGTVLK ⁹⁵⁰

4. táblázat: A szintetizált peptidek elnevezése és szekvenciája

A megfelelő mobilitás biztosítása valamint a bázikus szekvenciák közvetlen környezetének figyelembevételével (Harreman és mtsai., 2003, 2004) a PI4K230 szekvenciájából a 4. táblázatban feltüntetett N-terminális Cys-nel kiegészített peptideket Dr. Tóth Gábor és munkacsoportja (Szegedi Tudományegyetem) szintetizálta.

Tripszin inhibítor fluoreszcens jelölése Alexa Fluor 488 festékkel

A 0,1 M NaHCO₃-ban (pH: 8,3) oldott tripszin inhibítort (szójabab, Mr 20 000, Sigma) succinimidil-Alexa Fluor 488-al (Molecular Probes) gyári előírás szerint jelöltük, szobahőmérsékleten 30 percig. Az aminoreaktív festék feleslegét háromszori 1:20 hígítással

és Centriprep 10Y-ban történő koncentrálással távolítottuk el; a mosásra 0,15 M NaCl-t tartalmazó 0,1 M foszfát puffert (pH: 7,2), majd desztillált vizet, végül 50 mM foszfát puffert (pH 7,2) használtunk. A festék/fehérje átlagos molaránya 3-4 mol/mol volt.

Szintetikus peptidek kapcsolása Alexa Fluor 488-jelölt BSA-hoz és tripszin inhibitorhoz

Az Alexa Fluor488-jelölt fehérjékbe Sulfo-SMCC-vel maleimido-csoportokat vittünk be és ezekhez kapcsoltuk a szintetikus peptidek N-terminálison elhelyezkedő Cys-oldalláncát. A kivitelezés Backstrom és Sanders-Bush (1997) leírása alapján az alábbiak szerint történt:

Alexa Fluor488-BSA-t (Alexa488BSA) (Molecular Probes, festék tartalom 4-8 mol/mol), illetve a fentiek szerint készített Alexa Fluor 488-tripszin inhibitor (Alexa488trp.inh.) reagáltattunk Sulfo-SMCC-vel (Pierce) (2:1 tömegarányban) 50 mM K-foszfát pufferben (pH 7,2) szobahőmérsékleten, 1 óráig. A reagens feleslegét négyszeri 1:10-1:20 hígítással és ezt követő Centriprep 10Y-ban történő koncentrálással mostuk ki 50 mM foszfát pufferrel (pH 7,2). A maleimido-fehérjét N₂-vel átbuborékolatott desztillált vízzel hígítottuk, 4 °C-ra hűtöttük, majd 10-szeres moláris feleslegben adtuk hozzá a kapcsolandó peptidet és az oldatot barna lezárt üvegben egy éjszakán át kevertettük. A szabadon maradó maleimido-csoportokat 50 mM pH 7,2 Tris-HCl-ben oldott 1 mg/ml ciszteinnel blokkoltuk (szobahőmérséklet, 1h), majd háromszori 1:20 import pufferes (összetétele: 3. 14. fejezetben) hígítással és ezt követő koncentrálással távolítottuk el az el nem reagált peptideket, illetve ciszteint. A kevés oldhatatlan csapadék lecentrifugálását követően általában 0,5-1 mg/ml koncentrációjú kapcsolt peptidet kaptunk. A termék SDS-PAGE-en széles csíkot adott. A ligandum/fehérje aránya a látszólagos mólsúlynövekedésből számítva tripszin inhibitor esetén 1-3, BSA esetén 3-5 mol/mol volt.

3. 12. NLS2 klónozása, expressziója, tisztítása, jelölése

Célunk volt a PI4K230 egy olyan szakaszának klónozása, mely magába foglalja a PI4K230 feltételezett bipartit NLS-ét és mérete megfelelően nagy ahhoz, hogy aktívan, receptor függő módon transzportálódjon a sejtmagba (>40-50 kDa). Mindezek, valamint a doménhatárok figyelembevételével klónoztuk a PI4K230 3498-5001 bp szakaszát (számozás Gehrmann és mtsai., 1999 szekvenciája alapján), amely egy 501 aminosavnyi peptidet kódol (expr.NLS2: 1166-1667 aminosavak). A fragment felszaporítása során az 5' végre egy EcoRI, a 3' végre egy XhoI restrikciós hasítóhelyet kapcsoltunk. A PCR során használt primerek szekvenciája:

5'-ATATGAATTCGAGCATGGCATGGAGACGG-3' és 5'-CCGAGGAACAGGCCGG-GAGCTCAATT-3'. A PCR reakcióhoz Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen) polimerázt használtunk. A PCR közeg összetételéből a dNTP-k, polimeráz, primerek koncentrációja azonos a Long PCR Enzyme Mix-nél használttal, de itt 2 mM MgSO₄-ot és 50 ng templát DNS-t használtunk.

Az alkalmazott PCR profil:	94 °C	2 perc		
	58 °C	30 mp	}	5x
	68 °C	1 perc 30 mp		
	94 °C	20 mp		
	68 °C	30 mp	}	30x
	72 °C	1 perc 30 mp		
	94 °C	20 mp		
	68 °C	10 perc		

A PCR terméket és a pET-28a (Novagen) prokarióta expressziós vektort EcoRI és XhoI restriktációs enzimekkel hasítottuk, ligáltuk majd BL21(DE3) coliba transzformáltuk. (Az említett folyamatok technikai kivitelezése azonos a 3. 7. 1. és a 3. 10. 2. fejezetben leírtakkal.)

A transzformánsokból tisztított rekombináns plazmidban (pET-28a-NLS2) az NLS2 jelenlétének bizonyítására PCR-t végeztünk, amihez a pET-28a vektor multi-klónozó helyének két oldalára specifikus primerpárt használtunk: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' és 5'-GCTAGTTAT-TGCTCAGCGG -3'. Az olvasási keret helyességét szekvenálással ellenőriztük.

Mikor a fehérjeexpressziós céllal növesztett pET-28a-NLS2 tartalmú BL21(DE3) coli sűrűsége elérte az OD₆₀₀=0,4-0,7 értéket, (kanamycines LB, 37 °C, 200 rpm) a fehérje termelődését 0,4 mM IPTG-vel indukáltuk 28 °C-on, 4 óráig. A baktériumok összegyűjtése, mosása, feltárása a 3. 10. 3. fejezetben leírtak szerint történt. A lízis puffer összetétele: 50 mM Tris/HCl (pH: 7,5) 100 mM NaCl, 5 mM Mg-acetát, 5% (v/v) glicerol, proteázgátlók (10 mM benzamidin, 10 µg/ml aprotinin, 20 µg/ml leupetin, 10 µg/ml pepstatin, 20 µg/ml phosphoramidon, 1 mM PMSF, 40 µM TPCK, 25 µg/ml E-64).

Ultrahangos feltárást és centrifugálást követően (10000 g 10 perc 4°C) az expresszált fehérje a csapadék frakcióban volt jelen, melyből csak részlegesen, 2 M majd 7 M urea tartalmú lízis pufferrel sikerült feloldanunk. Bár a rekombináns expr.NLS2 peptid N és C-terminálisán is poli-His-t hordoz, Ni-agaróz kromatográfiával csak kis mennyiségű, nem tiszta preparátumot nyertünk. Mivel az expresszált fehérje bázikus (bipartit NLS) szakasszal

rendelkezik, így megkíséreltük és sikerrel alkalmaztuk az SP-Sepharose-on történő kromatográfiát.

Az **SP-Sepharose kromatográfia** lépései a következők voltak:

Gyanta ekvilibrálás: 50 mM Tris / HCl (pH: 7,5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% (v/v) glicerol, 0,2 mM PMSF, 10mM benzamidin

Minta: 2 ml 2-7 M urea frakció.

Mosás: ekvilibráló pufferrel fehérjementességig.

Elúció: 1 M NaCl tartalmú ekvilibráló pufferrel.

A mosó és eluált frakciókból a számított 57 kDa-os csíkot tartalmazó homogén frakciókat egyesítettük, majd Centriprep 30-ban koncentráltuk. Immunobloton HRP-jelölt anti-poli-His-antitesttel ellenőrizve az 57 kDa-os fehérje csíknak megfelelően egyetlen intenzív ECL-reakciót kaptunk.

Fluoreszcens jelölés Alexa488-maleimiddel

A feltételezett NLS intaktsága érdekében a polipeptid SH-csoportjait jelöltük gyári előírás szerint DMSO-ban oldott Alexa Fluor488-maleimidel (Molecular Probes) szobahőmérsékleten, 90 percig. Ezután 5mM ditiotreitollal 30 percig, szobahőmérsékleten blokkoltuk a reakciót, majd 5% glicerolt tartalmazó „import pufferrel” szemben (összetételét lásd: köv. fejezetben), egy éjszakán át dializáltuk. Az így nyert Alexa Fluor488 jelölt expr.NLS2 (expr.NLS2-Alexa488) tartalmú oldatot Centriprep-30-ban (Amicon) koncentráltuk. A jelölt fehérje SDS-PAGE Coomassie festés alapján homogén és a fluoreszcens festék/fehérje aránya 3,6 mol/mol volt.

3. 13. Az expr.NLS2 sejtmagi transzportja szempontjából kritikus, bázikus aminosavak irányított mutagenézise

Az expresszált NLS2 fragmentum importja szempontjából kritikus bázikus aminosavainak kicserélését a QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) felhasználásával, két lépésben végeztük. Mutagenetikus PCR templátként a pET28-NLS2 vektort használtuk. Az első lépésben végrehajtott Lys1415Ala és Lys1416Ala cseréhez: 5'-CCAAGAAATCAGGCATGTCTGCGGCAACCAACCG-GGGCTCCC-3' szekvenciájú a következő lépésben elvégzett Lys1429Met, Arg1430Gly és Arg1431Met cseréhez: 5'-

GCACAAATACTACATGATGGGCATGACGCTGCTGC-TGTCCC-3' szekvenciájú szensz és ezekkel komplementer antiszensz primereket használtuk. (Az aláhúzás a módosított nukleotidokat jelöli.) A PCR közeg és profil tervezése, a templát DNS DpnI emésztése és az XL10-Gold szuperkompetens coli transzformációja során a gyártó által megadott protokollt követtük. A coliban felszaporított, kitisztított plazmidban a mutációk jelenlétét szekvenálással ellenőriztük, melyhez a 5'-CGCTTCAAGCTGCTGAAC-3' szekvenciájú primert használtuk.

A mutáns NLS2 fehérjét BL21(DE3) coliban expresszáltuk. Az expresszió körülményei, a lízis, ultrahangos feltárás és a 2 M ureás mosás megegyezett az expr.NLS2 esetében alkalmazottal (3. 12. fejezet). A fehérjét 4 M guanidin HCl tartalmú lízis pufferben oldottuk, majd Ni-agarózon tisztítottuk (Qiagen). A gyantára kötött fehérjét az előbbi pufferben oldott 10 mM imidazollal mostuk majd 300 mM imidazol tartalmú pufferrel eluáltuk és Centriprep-10-ben (Amicon) koncentráltuk. A fehérje fluoreszcens jelölését Alexa-488-maleimiddel az előző fejezetben leírtak szerint végeztük, az így nyert expr.NLS2mut-Alexa488 fehérje transzportját import kísérletben vizsgáltuk.

3. 14. A sejtmagi import in vitro vizsgálata

A PI4K230, a szintetizált NLS-ek és az expresszált NLS2 sejtmagi transzportját permeabilizált HeLa sejteken vizsgáltuk, amihez a sejteket a kísérlet előtt 36 órával üveg fedőlemezekre passzáltuk, 4×10^4 /cm² sűrűségben.

A permeabilizáláshoz digitonint használtunk, ami a koleszterol precipitálásával perforálja a membránt. Rövid idejű (<10 perc) digitonin kezelés során elérhető, hogy a citoplazmamembrán permeabilizálódjon, a maghártya viszont intakt maradjon. A digitonint 60 µg/ml koncentrációban használtuk, import pufferben (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) oldva.

Az alaposan mosott, permeabilizált sejteket olyan oldatban inkubáltuk, amely az importálandó molekulák mellett minden más importhoz szükséges komponenst is tartalmaz. A kontroll vizsgálatokhoz a permeabilizált sejteket búzacsíra lektinnel kezeltük, amely a magpórus komplexekhez (NPC) kötődve gátolja az NPC-n keresztüli specifikus transzlokációt. Kísérleteinkben alapvetően két import közeget alkalmaztunk:

Impot közeg retikulocita lizátummal (import pufferben oldva):

- Vizsgált ligandok: expresszált PI4K230 tartalmú Sf9 lizátum (import közegben 10x hígítva),
NLS1-Alexa488BSA, NLS2-Alexa488BSA, NLS3-Alexa488BSA,

NLS2-NLS1-Alexa488BSA, NLS2/1-NLS1-Alexa488BSA, NLS2/2-NLS1-Alexa488BSA, (az említett anyagokat 0,1 mg/ml $\approx$ 1,2 μ M koncentrációban használtuk) expr.NLS2-Alexa488 (700 nM, 90 μ g/ml), import ligand: SV40 vírus NLS-BSA-rodamin (Sigma, 750 nM), Alexa488-BSA (Molecular Probes, 750 nM, 120 μ g/ml)

- Retikulocita lizátum (Sigma) (import pufferrel szemben dializált, végkoncentrációja 150 μ g/ml)
- „Energia regeneráló rendszer”: ATP (1 mM), GTP (0,5 mM), kreatin-foszfát (10 mM), kreatin-kináz (Sigma) (50 μ g/ml) import pufferben
- Proteázgátlók: aprotinin, leupeptin, pepstatin (mindegyik 1 μ g/ml koncentrációban)
- Lektin (negatív kontrollok esetén, Sigma, 20 μ g/ml)

Az import folyamat specifikus gátlására az „Energia regeneráló rendszer” részeként nem hidrolizáló GTP analógot, GTP γ S-t használtunk, 0,2 mM koncentrációban (GTP nélkül).

Import közeg importinokkal (import pufferben oldva):

- A vizsgált ligandok, „energia regeneráló rendszer”, proteázgátlók és az esetenként alkalmazott búzacsíra lektin a fenti közeggel azonos koncentrációban alkalmazva
- Ran mix: Ran-GDP (3 μ M), RanGAP (150 nM), NTF2 (Sigma, 300 nM)
- Importinok: Importin α 1, importin α 3, importin α 5, importin β (Az importinokat önállóan vagy importin β -val együtt használtuk, 1 μ M végkoncentrációban.)

A sejtmagvacskába irányuló transzport vizsgálatára használt tripszin inhibítorral (trp.inh.) kapcsolt peptidek méretükből adódóan szabad diffúzióval mozognak az NPC-n keresztül. A kísérletek során retikulocita lizátumot és „energia regeneráló rendszert” tartalmazó, vagy ezek nélküli import-pufferben vizsgáltuk az alábbi ligandumok transzportját: Alexa488trp.inh., NLS1-Alexa488trp.inh, NLS2-Alexa488trp.inh, NLS2/1-Alexa488trp.inh, NLS2/2-Alexa488trp.inh (mindegyiket 0,1 mg/ml koncentrációban használtuk).

A kísérlet menete: A sejteket kétszer PSB-sel, egyszer import pufferrel, majd permeabilizáltuk 60 μ g/ml töménységű digitoninnal, 7 percig. Újabb mosások után (3x import pufferrel) a lektines kísérletek esetén 5 perces lektin előkezelést alkalmaztunk 20 μ g/ml töménységű, import pufferben oldott lektin oldattal. Az import kísérlet közegével 15 percig inkubáltuk a fedőlemezt, majd ismételt mosások után (3x import pufferrel) abszolút etanollal fixáltuk -20 °C-on, 10 percig. Az Sf9 lizátum importját vizsgálva, a PI4K230-at anti-N antitesttel indirekt módon detektáltuk, ami a nukleolin jelöléssel és propídium-jodidos

magfestéssel együtt az Immuncitokémia (3. 4.) fejezetben ismertetett módon történt. A többi vizsgált peptid transzportja, direkt fluorofórral való jelölésük alapján, fixálást követően azonnal vizsgálható. A kísérletek eredményét konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

3. 15. Fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata dot-blot felülrétegzéssel

1,5 μ g Alexa488BSA-hoz kapcsolt NLS peptideket és exprNLS2-Alexa488 peptidet 2 μ l import pufferben oldva csöppentettünk föl nitrocellulóz membránra és száradást követően 5% (m/v) BSA és 20 μ g/ml leupeptin tartalmú import pufferrel blokkoltuk 4 óráig. Ezt követően az importinok 1 μ M oldatával 1% (m/v) BSA és 20 μ g/ml leupeptin tartalmú import pufferben 4 °C-on, 16 óráig inkubáltuk a membránokat. Az importin α - importin β tartalmú oldatokat a heterodimerképződés biztosítására 15-30 percig szobahőmérsékleten előinkubáltuk 1:1 molarányban. A membránok intenzív PBS mosása után (3x10 min) 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 (Pierce), röntgen filmen detektáltuk.

3. 16. Nukleinsav és fehérje koncentrációmérés

A DNS és RNS tartalmú oldatok koncentrációját az UV 260 nm-en mért abszorbancia alapján, a következő arányosság szerint számítottuk: OD₂₆₀=1 érték a DNS esetében 50 ng/ μ l, az RNS esetében 40 ng/ μ l koncentrációnak felel meg.

A fehérje koncentrációját módosított Bradford módszerrel határoztuk meg (Read és Northcote, 1981). 5-10 μ l mintához 1 ml reagenst adva az A595 értékből számítottuk ki a koncentrációt, a standard 1,0 mg/ml BSA oldat A595 értéke alapján.

3. 17. SDS-Poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) és immunoblot

A mintákhoz Laemmli-puffert (10% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β -merkaptoetanol, 3% (v/v) SDS, 0,1% (m/v) brómfenolkék 60 mM Tris pufferben pH: 6,8) adtunk, legalább a mintával azonos térfogatban, majd 10 percig forraltuk a fehérjék denaturálására. A mintákat a

fehérjék mólsúlya alapján megválasztott töménységű poliakrilamid gélen futtattuk Laemmli (1970) módszere szerint.

A gélelektroforézis során elválasztott fehérjéket PVDF-membránra blottoltuk. Az elektrotranszfert követően a membránt 5% (m/v) sovány tejpor és 1% (v/v) NS (2. antitest állatának széruma) tartalmú PBST-vel (0,1 m/v % Tween-20 PBS-ben) blokkoltuk, (1 óra), majd 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk az első antitestekkel, melyeket 1% sovány tejport és 1% NS-t tartalmazó PBST-ben hígítottunk (Koncentrációk: anti-N: 50 ng/ml, anti-C: 60 ng/ml, anti-PI4KIII α : 40 ng/ml, N-19 antitest: 100 ng/ml, HRP jelzett anti-poli-His: 5 ng/ml, anti-GST: 20 ng/ml). Második antitestként az első antitestekre specifikus, HRP jelölt IgG-t használtunk (szobahőmérséklet, 1 óra) 2 ng/ml koncentrációban, 1% tejpor 1% NS tartalmú PBST-vel hígítva. Az egyes lépések között PBST-vel mosásokat végeztünk 3x5 és 1x15 percig. A második antitest kötődését peroxidáz-reakcióval (ECL kit, Amersham) tettük láthatóvá. Az így kapott kemilumineszcens jeleket röntgen filmen rögzítettük.

3. 18. Konfokális mikroszkópia

A konfokális mikroszkópos felvételeket egy Zeiss LSM 510 típusú (Göttingen, Németország) mikroszkóppal készítettük. A vizsgálatokhoz Plan-Apochromat 63x/1,4NA immerziós objektívet használtunk. Az Alexa Fluor488 festéket Ar ion lézerrel (488 nm) gerjesztettük és egy 505-550 nm emissziós szűrőn keresztül detektáltuk. A propídium-jodid és az Alexa Fluor594 gerjesztéséhez HeNe lézert (543 nm) használtunk és 560-615 nm, illetve 585-615 nm emissziós szűrőkön keresztül detektáltuk. Az Alexa Fluor647 festéket HeNe (633 nm) lézerrel gerjesztettük és 650 nm LP szűrő segítségével detektáltuk. A konfokális blende méretét az 1 μ m-es optikai rétegvastagság eléréséhez megfelelő értékre állítottuk. A képeket az alábbi beállításokkal vettük föl: 512x512 pixel, 12 bit felbontás, 6,4 μ s pixel idő, 2x soronkénti-átlagolás (line-averaging). Minden, több csatornában detektált felvételt multi-track üzemmódban készítettünk. Az egy-egy fluorofórral jelölt kontrollok azonos beállítás mellett a többi csatornába nem világítottak át.

3. 19. Digitális képelemzés

A különböző sejtalkotókban a PI4K230 immunreaktivitás-mértékének meghatározását SCIL Image program segítségével ifj. Dr. Vereb György (DE OEC Biofizikai és Sejtbiológiai

Intézet) készítette. A TX-TPBS kezelés hatására a PI4K230 jelölés eloszlásának időfüggő változását a teljes sejt, citoplazma, magvacska nélküli sejtmag és a sejtmagvacska területén határoztuk meg.

3. 20. Molekulamodellezés

A PI4K230 NLS1, NLS2 és NLS3 szekvenciák importin alfával képzett komplexeinek modellezéséhez az SV40 monopartit NLS-e (PDB code: 1EJL) (Fontes és mtsai., 2000), a nukleoplazmin bipartit NLS-e (PDB code: 1EJY) (Fontes és mtsai., 2000) és a foszfolipid szkrambláz nem klasszikus NLS-e (PDB code: 1Y2A) (Chen és mtsai., 2005) szolgált mintaként. A fehérjestruktúrák elemzését Dr. Bagossi Péter (Debreceni Egyetem OEC Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) végezte.

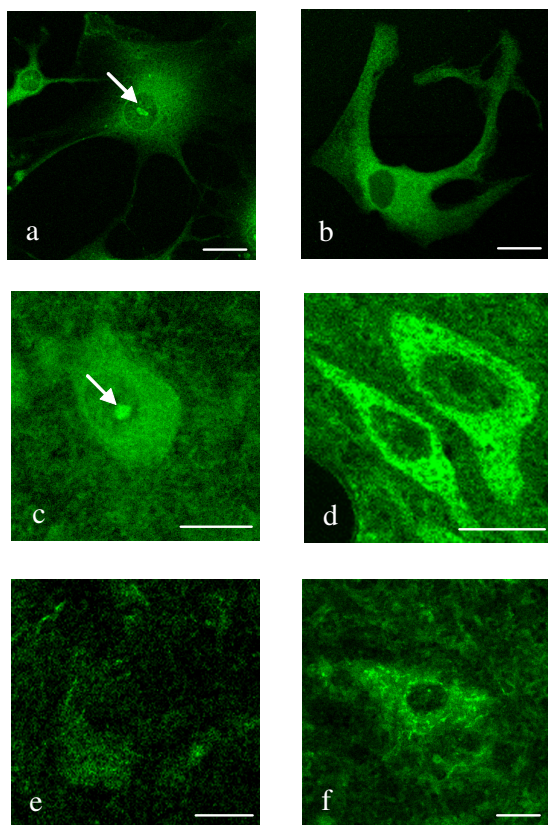
4. Eredmények

4. 1. A PI4K230 detektálása az etanollal fixált sejtek magvacskájában

Immunfluoreszcenciás vizsgálatainkat idegsejteken kezdtük, ugyanis az érdeklődésünk középpontjában álló PI4K230 expressziója itt dominál. Differenciált primer neuronális HCN1A sejtek immuncitokémiai vizsgálatával egy érdekes jelenségre figyeltünk föl: a várható citoplazmatikus jelölődés mellett az etanollal fixált sejtek magvacskája anti-N antitesttel (mely a PI4K230: 873-1145 aminosavnyi peptidszakaszára specifikus) nagyon intenzív festődést mutatott (5. ábra a), viszont a nukleoláris immunreakció teljes hiányát tapasztaltuk ugyanezen sejtek PFA fixálásával (5. ábra b). Ez a festődési mintázat a nem differenciált HCN1A sejteknél is megfigyelhető volt. A kísérletet megismételve gyorsfagyasztásos technikával preparált, etanollal fixált gerincvelői metszeteken, a motoneuronok citoplazmatikus PI4K230 jelölődése mellett itt is jelen volt az intenzív nukleoláris festődés (5. ábra c). Ezzel szemben a PFA-val perfundált patkányok gerincvelői metszeteinek motoneuronjaiban a PI4K230 immunreaktivitása kizárólag a citoplazmára korlátozódott (5. ábra d). A gyorsfagyasztott, utólag PFA-val fixált metszetek immunhisztokémiai festődése azonos a PFA perfúzióval fixált metszetekével, itt is hiányzik a nukleolusz jelölődés (12. ábra c). A PI4K230 immunfluoreszcenciás kimutatásának specifikusságát igazoló kontroll kísérletben az anti-N antitestet nem specifikus csirke immunglobulinnal (IgY) helyettesítve csak gyenge háttérfestődés tapasztalható (5. ábra e). Etanollal fixált gerincvelői motoneuronok PI4K92 tartalmának immunfluoreszcens jelölésekor nem találtunk sejtmagi lokalizációra utaló jeleket (5. ábra f) (5. ábra f).

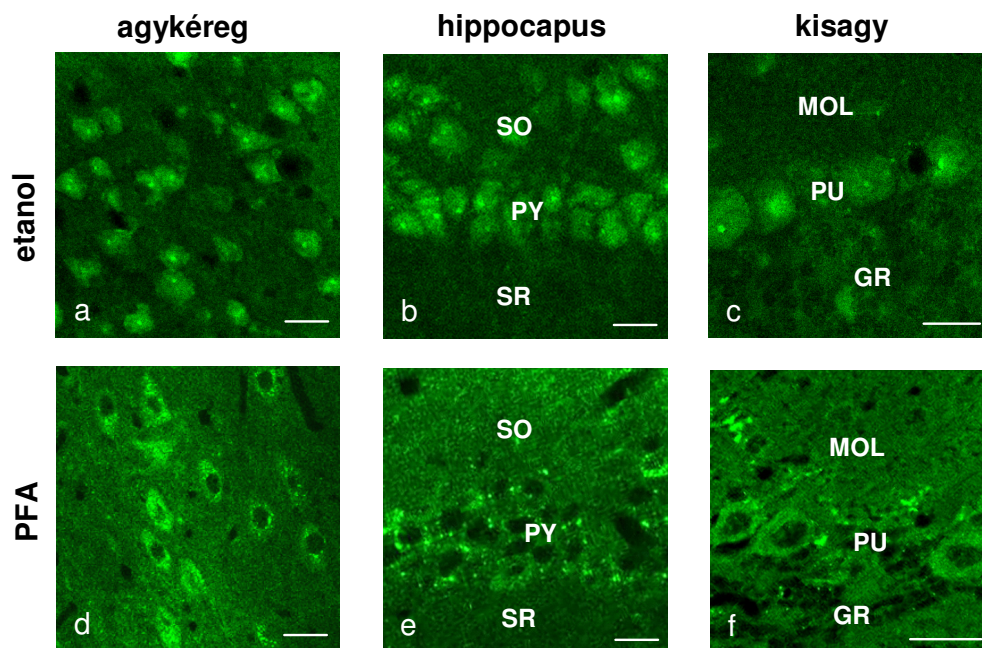
A szövetekben lévő PI4K230 PFA-val és etanollal történő fixálás utáni eltérő immunfestődése általános jelenségnek tekinthető, amit alátámasztanak a különböző agyrégiókon végzett vizsgálataink. A nagyagy kéreg, hippocampus és kisagykéreg területéről származó, etanol-fixált metszeteken a PI4K230 feltűnő nukleoláris jelét találtuk (6. ábra a, b, c), míg ugyanez hiányzott a PFA-perfundált állatok hasonló metszeteiről (6. ábra d, e, f).

Bár a PI4K230 intracelluláris lokalizációját már többen vizsgálták, senki sem számolt be az enzim sejtmagi előfordulásáról. Mivel ezek a kutatócsoportok különböző antitestekkel dolgoztak, kíváncsiak voltunk, hogy más PI4K230 izoforma specifikus antitesttel is tapasztaljuk-e a fent bemutatott jelenséget. Ezzel a nem specifikus, esetleges keresztreakciók



5. ábra: A PI4K230 immunfluoreszcens detektálása etanol és PFA-fixált HCN1A sejteken és motoneuronokon

A PI4K230-at anti-N antitesttel és Alexa Fluor 488 jelölt második antitesttel detektáltuk. Az etanol-fixált HCN1A sejteken (a) és gyorsfagyasztott motoneuronokon (c) feltűnő nukleoláris jelölődés látható az intenzív citoplazmatikus mellett, míg a PFA-fixált HCN1A sejtek (b) és PFA-perfundált gerincvelői motoneuronok (d) magjából teljesen hiányzik a fluoreszcens jel. Kontroll kísérletként a gyorsfagyasztott, etanollal fixált gerincvelői metszetet nem specifikus csirke IgY-nal és Alexa Fluor 488 jelölt második antitesttel inkubáltuk (e). A felvétel a mellső szarv motoneuronban gazdag részéről készült. A képen csak gyenge háttér-jelölődés tapasztalható. Az etanol-fixált metszetek motoneuronjainak PI4K92 jelölése (f) nem mutat magi lokalizációra utaló jeleket. Mérőléc: 20 μm



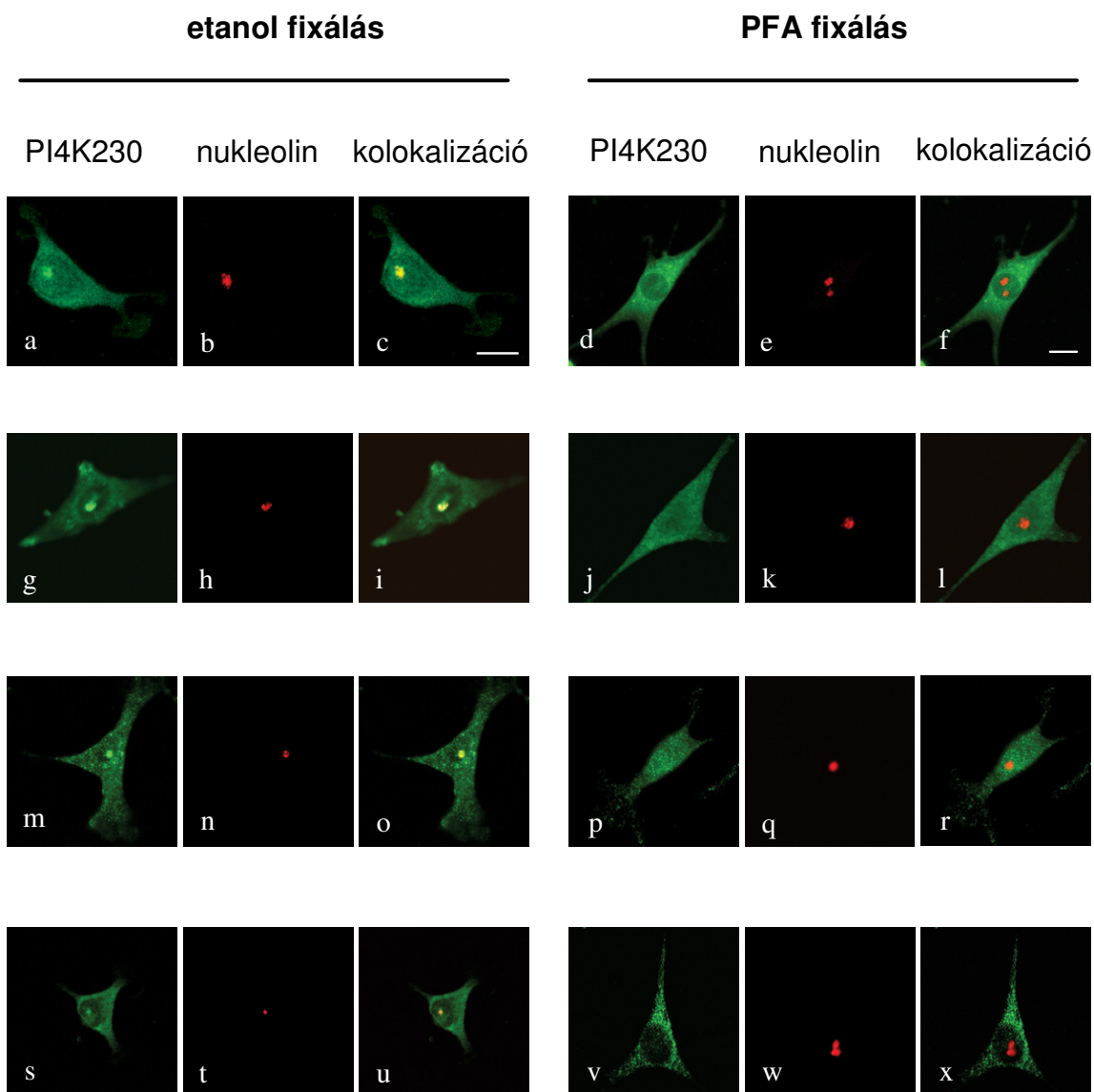
6. ábra: PI4K230 detektálása a patkányagy különböző régióiban

A PI4K230-at anti-N antitesttel indirekt immunfluoreszcenciával detektáltuk etanol (a, b, c) és PFA (d, e, f) fixált, agykéreg (a, d), hippocampus (d, e) és kisagy (c, f) metszeteken. SO: stratum oriens, PY: piramis sejtek rétege, SR: stratum radiatum, MOL: stratum molulare, PU: Purkinje sejtek rétege, GR: granulosa sejtek rétege. Mérőléc: 20 μm

lehetőségét is kiküszöböltük. A vizsgálathoz csirke anti-N (873-1145 aminosavakat tartalmazó peptidszakasz elleni) (7. ábra a-f), kecske N-19 antitestet (1201-1220 peptidszakaszra specifikus) (7. ábra g-l) nyúl anti PI4KIII α antitestet (1361-1378 aminosavak) (7. ábra m-r) és ezekre specifikus Alexa488 jelölt második antitesteket valamint direkt jelölt csirke anti-C antitestet (1566-1863 aminosavak) (7. ábra s-x) használtunk. Az immunfestéseket etanol- és PFA-fixált B50 sejteken (patkány neuroblastoma) végeztük, nukleolin jelöléssel együtt, amely segítséget nyújt a jelölés nukleoláris jellegének megítélésében. Az etanol-fixált B50 sejteken valamennyi antitesttel igazolni tudtuk a PI4K230 jelenlétét a magvacskában (7. ábra 1-3. oszlop), míg a PFA-fixáltaknál csak a nukleolin jelölés látható, PI4K230 kolokalizáció nélkül (7. ábra 4-6. oszlop). Mivel a PFA-fixált B50 sejtek PI4K230 jelölése a citoplazmában jól látható és kismértékben a nukleoplazmában is, így megállapíthatjuk, hogy a PFA kizárólag a sejtmagvacskában található PI4K230 immunreaktivitását szünteti meg. Ugyanezen kísérleteket metanol-ecetsavval, illetve acetonnal fixált sejteken megismételve az eredmény megegyezik az etanolos fixálásnál kapottal. Feltehető tehát, hogy kizárólag a PFA által okozott kémiai reakció felelős a PI4K230 immunreaktivitásának maszkírozásáért.

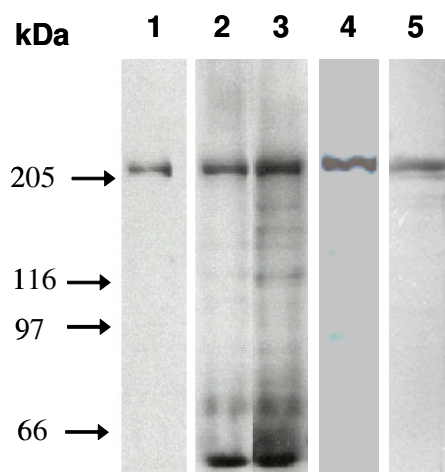
Az előző kísérletek során használt négyféle, különböző epitópok felismerésére képes antitestek specifikusságát immunoblottal is ellenőriztük. Az SDS-PAGE segítségével elválasztott, membránra blottolt, expresszált PI4K230 tartalmú SF9 sejt lizátumban mind a négy antitest az anti poli-His antitesttel kapott sávval azonos magasságban detektálja a PI4K230-at (8. ábra). (Az anti-N és anti-C antitestek által kimutatott kis mólsúlyú sáv valószínűleg az adott minta PI4K230 tartalmának fragmentálódásából adódik.)

A PI4K230 nukleoluszon belüli helyzetéről a nagy méretű magvacskával rendelkező HeLa sejtek immuncitokémiai vizsgálatával próbáltunk pontosabb képet kapni (9. ábra). Vizsgálataink során az etanol-fixált sejtek PI4K230 lokalizációját együtt vizsgáltuk a nukleolin és fibrillarin nukleoláris fehérjékkel. A nukleolin (rDNS transzkripcióban, preRNS érésében, riboszóma alegységek összeszerelésében és transzportjában vesz részt) nagyobb részt a denz-fibrilláris komponensben, kisebb mennyiségben a granuláris komponensben található; a fibrillarin (snoRNP tagja, a preRNS érésében is résztvesz) főleg a denz fibrilláris komponensben van jelen. A PI4K230 mindkét fehérjével részleges kolokalizációt mutat. A jelölések helyzete alapján a nukleoláris PI4K230 elsősorban a denz-fibrilláris komponensre lokalizálható.



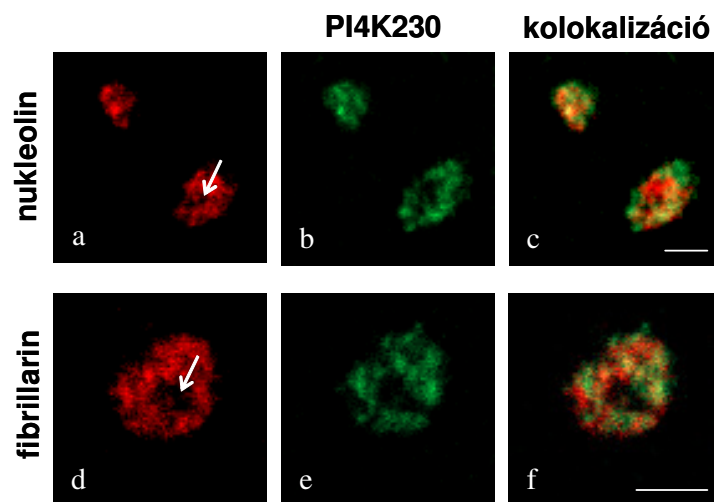
7. ábra: A PI4K230 kimutatása etanol- és PFA-fixált B50 sejteken, különböző antitestekkel

A PI4K230 kimutatásához négy -a fehérje különböző epitópjait felismerő- antitestet használtunk: anti-N (1. sor) (873-1145 aminosavak); N-19 antitest (2.sor) (1201-1220 as.); anti PI4KIII α (3. sor) (1361-1378 as.); anti-C (4. sor) (1566-1863 as.). Az első 3 antitestet a rájuk specifikus, Alexa488 jelölt (zöld) második antitesttel, míg az anti C-t direkt Alexa488 jelöléssel tettük láthatóvá. Valamennyi antitest esetében a nukleoláris jel könnyebb megítélése végett indirekt nukleolin jelölést (piros) is alkalmaztunk. A két csatorna kolokalizációját a 3. és 6. oszlop képei mutatják. Az antitestek jelöléseket etanollal (1.-3. oszlop) és PFA-val (4.-6. oszlop) fixált B50 sejteken egyidejűleg végeztük. A PI4K230 az etanol-fixált B50 sejtek magvacskájában valamennyi antitesttel kimutatható, ugyanakkor teljesen hiányzik a PFA-fixált B50 sejtek magvacskájából. Mérőlé: 10 μ m



8. ábra: *Antitestek specifikusságának vizsgálata immunobloton.*

A rekombináns PI4K230 tartalmú Sf9 sejt lizátum fehérjetartalmát SDS-PAGE (6% gél) technikával elválasztottuk, majd PVDF membránra blottoltuk. Az immundetektálás során 5 különböző primer antitestet használtunk: 1. sáv: anti poli-His, 2. sáv: anti-N, 3. sáv: anti-C, 4. sáv: anti PI4KIII α , 5. sáv: N-19 antitest.

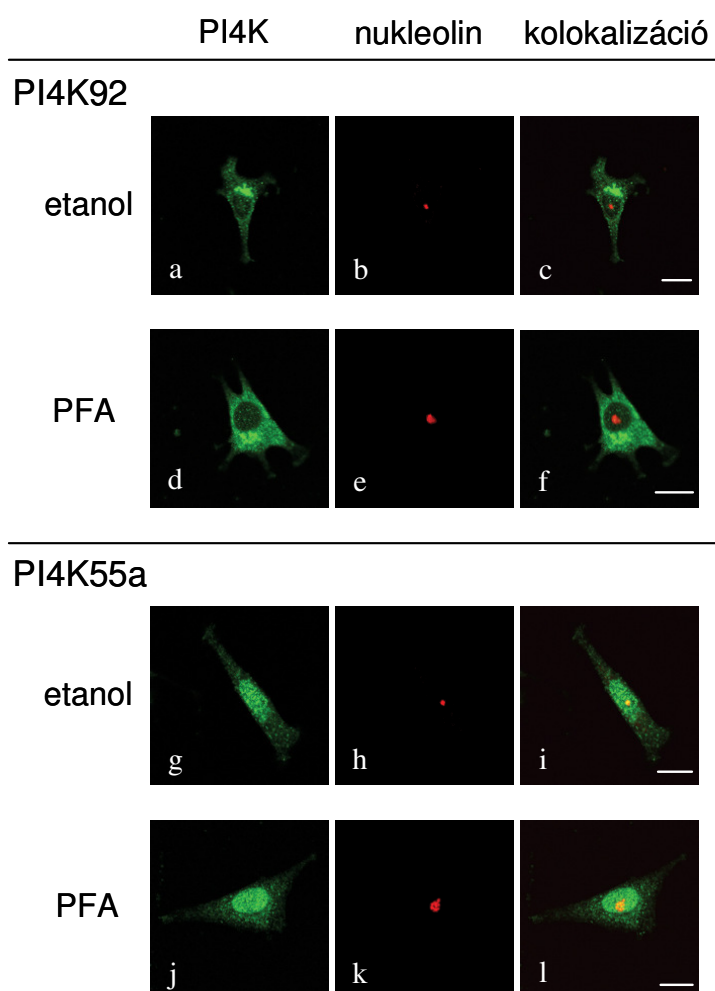


9. ábra: *A PI4K230 és nukleoláris marker fehérjék kolokalizációjának vizsgálata*

HeLa sejtek magvacskájában az anti-N antitesttel indirekt módon jelölt PI4K230 (b,e) a szintén indirekt jelölt nukleolin (a) és fibrillarin (d) fehérjékkel részleges kolokalizációt mutat (c,f). A nyilak által jelölt sötét területek a magvacska fibrilláris centrumai, ahol a PI4K230, a kolokalizációban vizsgált fehérjékhez hasonlóan nem jelenik meg.

Mérőlé: 5 μ m

Összehasonlítottuk a PI4K92 és a PI4K55 α immunreakcióját is etanol- és PFA-fixált B50 sejteken (10. ábra). 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 (10. ábra a-f.). A PI4K55 α gyenge, rögös citoplazmatikus immunreakciójával szemben a sejtmagban intenzív, egész magot kitöltő festődés látható, fixálószertől függetlenül (10. ábra g-l). Immuncitokémiai vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy valószínűleg sem a PI4K92, sem a PI4K55 α nem rendelkezik egyedi nukleoláris funkcióval.

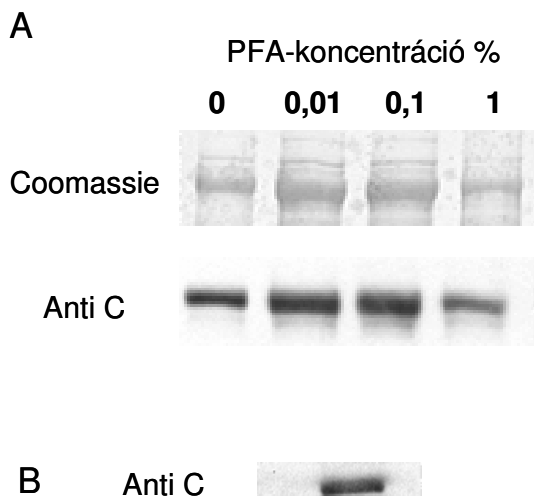


10. ábra: A PI4K92 és PI4K55 α szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata etanol- és PFA-fixált B50 sejteken

A PI4K92 (a-f) és a PI4K55 α (g-l) indirekt immunfluoreszcenciával zöld, a nukleolin piros. A PI4K92 gyenge, rögös és a PI4K55 α diffúz sejtmagi festődését a fixálószer típusa nem befolyásolja. Bár a PI4K55 α valószínűleg jelen van a magvacskában is (g-l), a PI4K230 esetében tapasztalt kifejezett nukleoláris feldúsulás nem látható. Mérőlé: 10 μ m

4. 2. A PFA hatása a PI4K230 immunreaktivitására

Következő kísérletünk arra irányult, hogy megállapítsuk, milyen közvetlen hatást gyakorol a PFA a PI4K230 fehérje immunreaktivitására. Ebből a célból a PI4K230 tartalmú Sf9 sejt lizátumot növekvő koncentrációjú (0-1 %) PFA-val kezeltük 10 percig, majd SDS-PAGE után a fehérjét immunoblottal detektáltuk. A 11. ábra A részében jól látható, hogy a PFA kezelés után (a gélbe jutott PI4K230 fehérje sávját Coomassie festéssel megjelenítve) a fehérjesávok vastagsága arányos az anti-C antitest immunodetektálással kapott sávok vastagságával. Megállapítható, hogy még a nagy koncentrációjú (1%) PFA kezelés sem befolyásolja számottevően a PI4K230 immunreakcióját. A 11. ábra B részében látható, hogy a PI4K230 jól detektálható abban az esetben is, ha a fehérjét PVDF membránra blotolást követően PFA-val (1%) kezeltük. A formaldehid epitóp-maszkírozó hatásáért tehát nem önmagában a PI4K230 formaldehiddel való reakciója a felelős. Feltételezhetően a fehérje és a vele közvetlenül érintkező molekulák között kialakult keresztkötések akadályozzák az antitest lekötődését a PI4K230-hoz.



11. ábra: A PFA hatásának vizsgálata immunoblotton

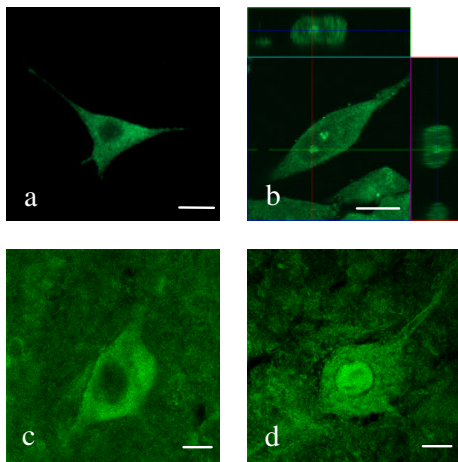
A: Az Sf9 sejtekben expresszált PI4K230-at növekvő koncentrációjú (0-1%) PFA-val kezeltük, majd SDS-PAGE (6% gél) után immunoblottal detektáltuk. A fehérjefestéssel és immunoblottal kapott sávok vastagságát összehasonlítva megállapítható, hogy a PFA kezelés a PI4K230 immunreaktivitását még nagy koncentrációban sem csökkenti.

B: A PFA kezelés akkor sem okoz immunoreaktivitás csökkenést, ha a PVDF-membránra blotolt PI4K230 fehérjén alkalmazzuk.

4. 3. Immunreaktiv epitopok feltárása PFA-fixált sejtek nukleoluszában

A gyakorlatban elterjedt módszer a PFA-fixáláskor maszkírozott epitópok feltárása forró citrátos kezeléssel (Bagdi és mtsai., 2001). Ezzel a módszerrel sikerült kimutathatóvá tennünk a nukleoluszban lévő PI4K230-at (12. ábra). A PFA-val fixált B50 sejtekben lévő PI4K230-at anti-N antitesttel indirekt módon detektálva a sejtmag üresnek tűnik (12. ábra a)

(a PFA perfundált szövetekhez hasonlóan) ha azonban a PFA fixálást követően a B50 sejteket citrát pufferben (pH: 6,0) forrásig hevítettük, a lehülés után végzett anti-N antitestek jelöléssel intenzív nukleoláris jelet kaptunk (12. ábra b). Érdekes módon a PFA maszkírozó hatása elkerülhető volt, ha a gyorsfagyasztott metszeteket PBS-sel mostuk a PFA fixálás előtt (12. ábra d). Bár ezekben a sejtekben a PI4K230 részben kidiffundált a magvacskából, a nukleoláris jel még így is intenzív maradt. A kontroll kísérletben a gyorsfagyasztott metszeteket PFA-val fixáltuk előmosás nélkül (12. ábra c).



12. ábra: A PI4K230 PFA által elfedett immun-reaktív epitópjainak feltárása

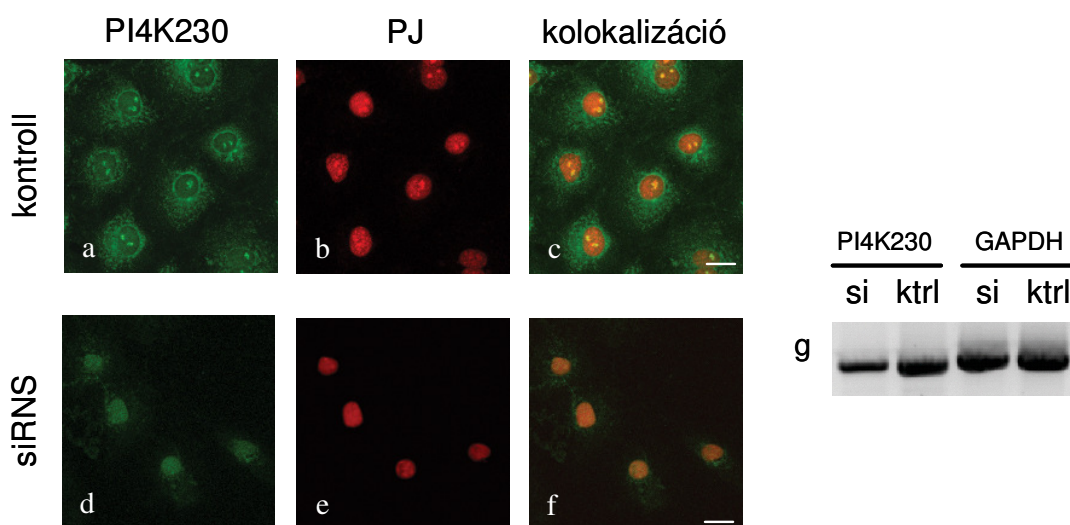
A PFA-val fixált B50 sejtekben (a) a nukleoláris PI4K230 kimutathatóvá válik, ha a fixálást követően a sejteket citrát pufferbe (pH: 6,0) merítve forrásig hevítjük (b). A horizontális metszeten a segédvonalak metszéspontjában lévő jel intranukleáris jellegét bizonyítja, hogy a jel a két függőleges síkú metszeten is megjelenik (b kép felső és jobb oldala). PI4K230 detektálás PFA-fixált gyorsfagyasztott metszeten, fixálást megelőző előmosás nélkül (c) ill. 10 perc PBS előmosást (szobahő) követően (d). Utóbbi esetben a PI4K230 PFA-fixálás ellenére is látható. Az inkubáció alatt a PI4K230 részben kidiffundált a magvacskából. Mérőlésc: 20 μ m

4. 4. A PI4K230 sejtben belüli lokalizációjának változása siRNS-sel kezelt COS-7 sejtekben

Azzal a céllal, hogy képet kapjunk a magvacskában található PI4K230 mobilizálhatóságáról (ezzel is alátámasztva a nukleoláris PI4K230 jel specifikusságát) a COS-7 sejteket olyan siRNS-sel kezeltük, amely a PI4K230 mRNS-sel specifikusan hibridizálódva, annak lebontását indukálja, így az expressziót hatékonyan gátolja (Balla és mtsai., 2005). A COS-7 sejtek ismételt siRNS transzfekcióját követő 3. napon az etanol-fixált sejtek PI4K230 tartalma már jelentősen lecsökkent (13. ábra). Az siRNS-sel nem kezelt COS-7 sejtekkel szemben (13. ábra a-c) az siRNS kezelt sejtek citoplazmájából szinte teljesen eltűnt a PI4K230 és nagymértékű csökkenés tapasztalható a nukleoláris PI4K230-jel intenzitásában is.

A propídium-jodidos festéssel való kolokalizáció alapján a megmaradt PI4K230 a sejtmagban, azt diffúz módon kitöltve jelenik meg (13. ábra d-f).

Az siRNS kezelés által okozott PI4K230 mRNS szint csökkenést a kezelést követően 24 óra múlva vizsgáltuk. Hosszabb ideig tartó kezelés nagymértékű sejtpusztulást okozott. Az RNS preparálást követően elvégzett RT-PCR majd hagyományos PCR reakció eredménye azonban már 24 órás kezelés után egyértelműen mutatja a PI4K230 mRNS szint csökkenését, ugyanakkor a kontrollként használt GAPDH mRNS szintje nem változott (13. ábra g).



13. ábra: *PI4K230 specifikus siRNS-sel kezelt COS-7 sejtek immuncitokémiai vizsgálata*

A COS-7 sejteket PI4K230-ra specifikus, dupla szálú siRNS-sel kezeltük. A három nap után kialakult PI4K230 szintet etanol-fixálás után anti-N antitesttel, indirekt immunfluoreszcenciával detektáltuk. A kontroll COS-7 sejtekhez képest (a) az siRNS kezelés következtében szinte teljesen eltűnt a citoplazmatikus és a prominens nukleoláris jel és csak gyenge diffúz magi festődést tapasztaltunk (d). A sejtmagok helyének könnyebb megállapítása érdekében a PI4K230 jelölést propídium-jodidos magfestéssel (PJ) együtt végeztük (b,e). Mérőléc: 20 μ m.

A 24 órás siRNS kezelést követően a PI4K230 mRNS szintjében jelentős csökkenés következett be a kezeletlen (ctrl)-hez képest, miközben a GAPDH mRNS szintje nem változott (g). Az mRNS meghatározása a Módszerekben leírt módon történt.

4. 5. A TX-100 kezelés hatása a PI4K230 lokalizációjára

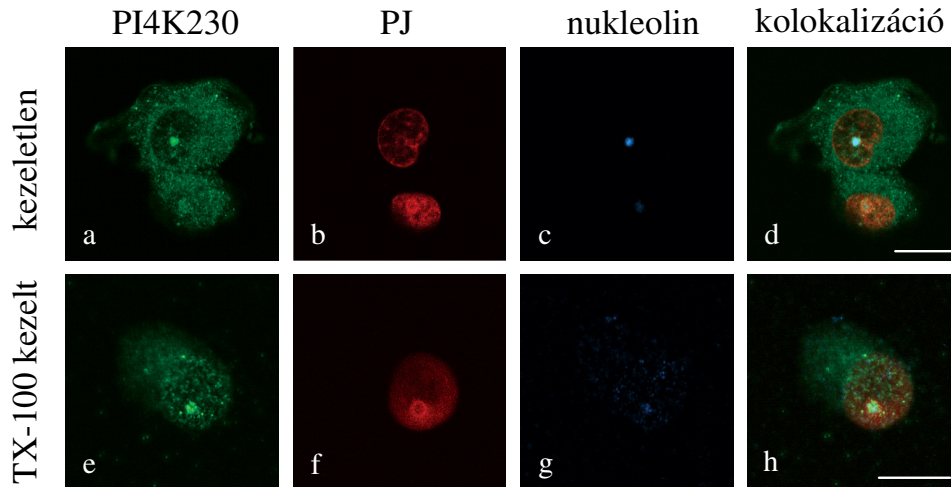
Az a tény, hogy (a citopazmatikus formával szemben) a nukleoláris PI4K230 antitestek detektálása csak nem-keresztkötő fixálószer használatával lehetséges, a sejtmagvacskában található egyedi szerkezeti környezetre utalhat. Mivel már több magban található foszfinozítid kinázról kimutatták, hogy detergenssel nem oldható proteo-lipid komplexekben található (Boronenkov és mtsai., 1998), ezért teszteltük a Triton X-100 (TX-100) kezelés hatását a PI4K230 sejten belüli eloszlására. A B50 sejteken alkalmazott, fixálást megelőző 5 perces 0,5% TX-100 kezelés a citoplazmatikus PI4K230 jel csökkenését eredményezte, a nukleoláris jel intenzitására azonban nem gyakorolt jelentős hatást, ugyanakkor erősödött a nukleoplazmában (14. ábra e). A párhuzamosan detektált nukleolin jel intenzitása ugyan csökkent és fragmentálódása is bekövetkezett, a kolokalizáció azonban megmaradt (14. ábra g-h).

A különböző idejű (5-60 perc) TX-100 kezelésnek kitett B50 sejtek konfokális mikroszkópos szeletein a PI4K230 jelölés eloszlását elemeztük és grafikusán ábrázoltuk (14. ábra). Eredményeink alapján a PI4K230 egy jelentős része már 5 perces TX-100 kezeléssel kivonható a sejtből 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 intenzív jellegét. Ezen megfigyelések alapján megállapítható, hogy a PI4K230 a sejtmagvacska komponenseihez TX-100 rezisztens formában kötődik.

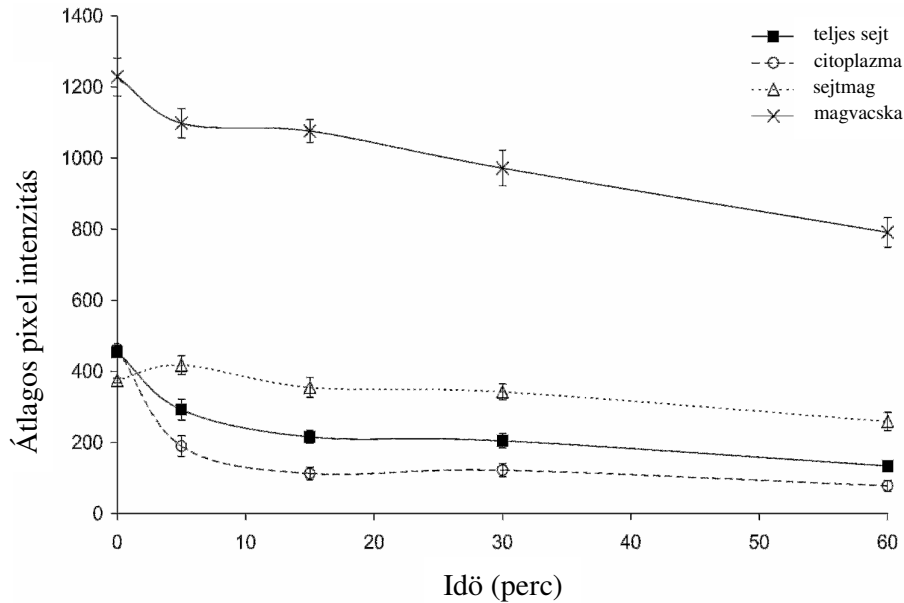
4. 6. DNáz és RNáz előkezelés hatása a PI4K230 nukleoláris lokalizációjára

A sejtmagvacskában a PI4K230 enzimmal kölcsönható komponens felderítése céljából megvizsgáltuk a DNáz és RNáz kezelés hatását a PI4K230 immunfestődésére. A kezelést megelőző 0,5% TX-100-zal (TX-TPBS) végzett 5-60 perces permeabilizáció nem okoz feltűnő változást a PI4K230 nukleoláris festődésében (14. ábra grafikon). Ha azonban a sejteket a permeabilizációt követően 20 percig DNáz I vagy RNáz A oldatban inkubáltuk a PI4K230 nukleoláris jelölődése eltűnik (15. ábra a,e).

A.



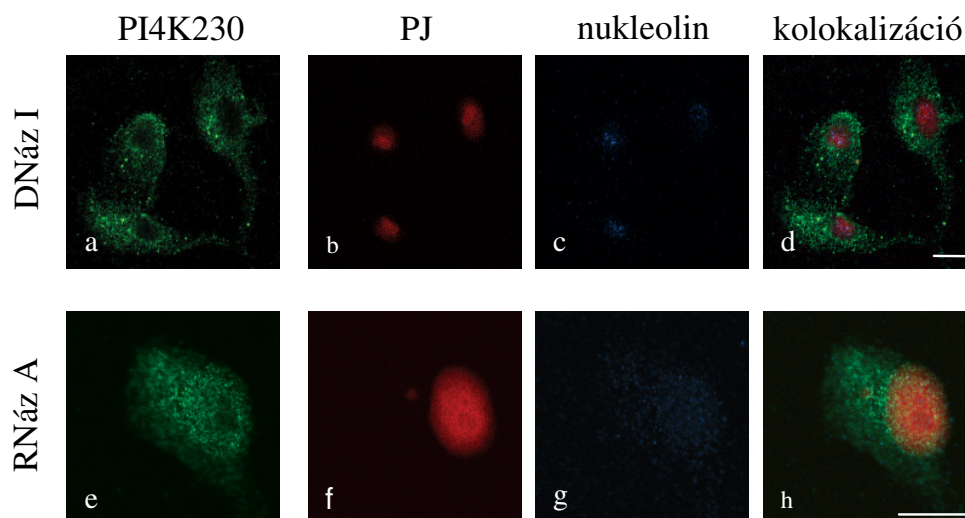
B.



14. ábra: A PI4K230 lokalizációjának vizsgálata TX-100 kezelt sejtekben

A.: PI4K230 kimutatása kezeletlen (1. sor), valamint fixálást megelőzően 5 percig 0,5% TX-100 tartalmú TX-TPBS kezelésnek kitett B50 sejtekben (2. sor) anti-N antitesttel indirekt immunfluoreszcenciával történt (a,e), propidium-jodidos DNS festéssel (b,d) és nukleolin jelöléssel (b-d, f-h) kiegészítve. A detergens kezelés következtében a PI4K230 csökkent citoplazmatikus jelével szemben a nukleoláris festődés nem mutat jelentős változást. Mérőléc: 10 μ m.

B.: TX-100 kezelésnek kitett sejtekben a PI4K230 festődés idő-függő intenzitásváltozását grafikusan ábrázoltuk. A vizsgálat során 10 db random módon kiválasztott sejt citoplazmájában, sejtmagjában (magvacska nélkül), magvacskájában valamint a teljes sejtben megjelenő fluoreszcencia-intenzitás átlagát (szórással együtt) tüntettük fel a TX-100 kezelés időtartamának függvényében.



15. ábra: DNáz és RNáz kezelés hatása a PI4K230 nukleoláris lokalizációjára

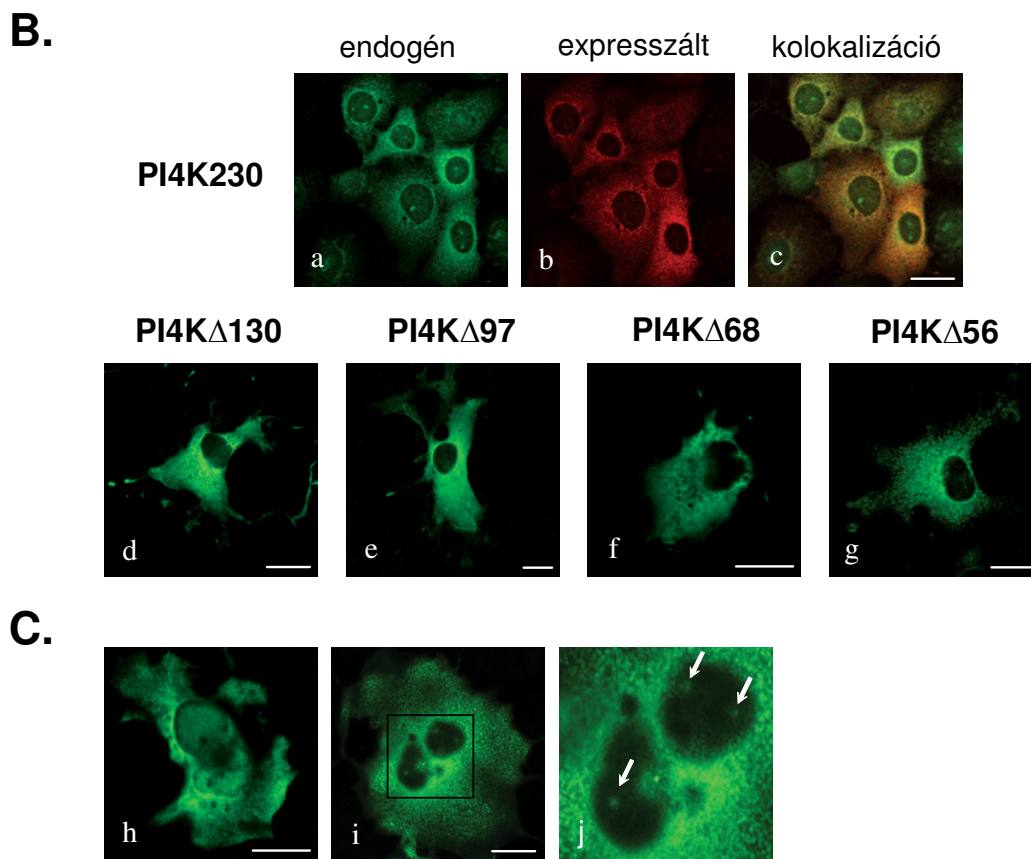
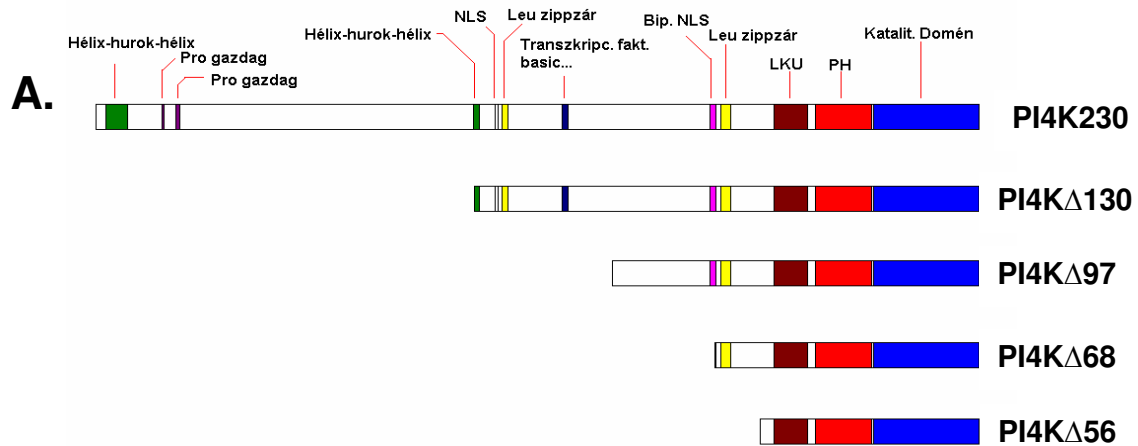
A B50 sejteken 15 perces TX-TPBS permeabilizációt követően 20 percig DNáz I (17 μ g/ml) (1. sor) ill. RNáz A (70 μ g/ml) (2. sor) kezelést végeztünk, majd etanol-fixálás után a PI4K230-at anti-N antitesttel indirekt módon detektáltuk (a, e). PI4K230 mobilizációja a nukleoluszból mind DNáz I (a) mind RNáz A (e) kezelés hatására megfigyelhető. A párhuzamosan alkalmazott propídium-jodidos festés (b,f) és nukleolin jelölés (c,g) jól mutatja a sejtmag/magvacska szerkezeti változását. Mérőléc: 10 μ m.

4. 7. COS-7 sejtekben expresszált PI4K230 holoenzim és deléciós mutáns formáinak vizsgálata

A PI4K230 sejtmagi (nukleoláris) transzportját COS-7 sejtekben expresszált PI4K230 és deléciós mutánsai: PI4K Δ 130, PI4K Δ 97, PI4K Δ 68, PI4K Δ 56 segítségével kívántuk tanulmányozni (méretarányos doménszerkezetüket mutatja a 16. ábra A része).

Vizsgálatainkhoz a PI4K230 cDNS pHM6 plazmidba, a deléciós mutánsok pedig pEGFP plazmidba klónozva a rendelkezésünkre álltak. A rekombináns PI4K230 fehérjét az N-terminálisán található HA-tag elleni antitesttel indirekt módon, a deléciós mutánsokat pedig az N-terminális GFP fluoreszcenciáján keresztül közvetlenül detektáltuk, konfokális mikroszkóppal.

Meglepő módon a COS-7 sejtekben expresszált rekombináns PI4K230 két napos kifejeződési idő alatt nem jelent meg a magvacskában (16. ábra B/b), ugyanakkor ezen sejtek endogén PI4K230 fehérjéje jelen volt a nukleoluszbán.



16. ábra: Az expresszált PI4K230 és deléziós mutánsainak lokalizációja COS-7 sejtekben

A.: A PI4K230 és deléziós mutáns formáinak doménszerkezete. B.: A COS-7 sejtekbe transzfektált pHM6-PI4K230 plazmidról expresszált rekombináns PI4K230-at hemagglutinin fúziós partner elleni antitesttel és erre specifikus Alexa Fluor 594 festékkel jelölt második antitesttel (b), az endogén PI4K230-at pedig anti-N antitesttel és Alexa Fluor 488 jelölt második antitesttel detektáltuk (a). A két jelölés kolokalizációját mutatja a c kép. A deléziós mutánsok génjét tartalmazó pEGFP-C2 plazmidról átíródó GFP-fúziós fehérjék helyzetét a GFP fluoreszcenciája alapján detektáltuk (d-g). C.: Az expresszált PI4K230 10 ng/ml LMB kezelést (4 óra) követően megjelenik a sejtmagban (h); a pEGFP-PI4K Δ 130 plazmidról átíródó fehérje (LMB kezelés nélkül) megjelenik a magvacskában (i, nagyítva: j) Mérőlésc: 20 μ m

Ezt igazolja a 16. ábra B/a képe ahol a transzfektált sejtek teljes PI4K230 tartalmát anti-N antitesttel detektálva egyértelmű nukleoláris festődés látható, szemben a rekombináns fehérje kizárólag citoplazmatikus megjelenésével (16. ábra B/a).

Ha az expresszált PI4K230 lokalizációját a Crm1 sejtmagi export rendszert specifikusan gátló Leptomycin B (LMB) kezelést követően vizsgáltuk (10 ng/ml, 4 óra), néhány esetben a fehérje feldúsult a sejtmagban, diffúz módon kitöltve a nukleoplazmát (16. ábra C/h). A jelenség magyarázata lehet a nukleoluszban kötött PI4K230 hosszú életideje, így a két napos kifejeződési idő alatt „nem válik szükségessé” a nukleoluszban lévő endogén PI4K230 (detektálható mennyiségben) rekombinánsra cserélése. A Crm1 export gátlásával bekövetkező sejtmagi akkumuláció a nukleo-citoplazmatikus körforgalom létreutal, de az a tény, hogy a jelenség csak a sejtek kis százalékánál figyelhető meg, a magi transzport összetett szabályozásával függhet össze.

A deléciós mutánsok esetében szintén nem volt jellemző a nukleoláris akkumuláció (16. ábra B/d-g), azonban a PI4K Δ 130 fehérje néhány esetben megjelent a magvacskában (16. ábra C/i,j).

4. 8. A PI4K230 sejtmagi importjának vizsgálata

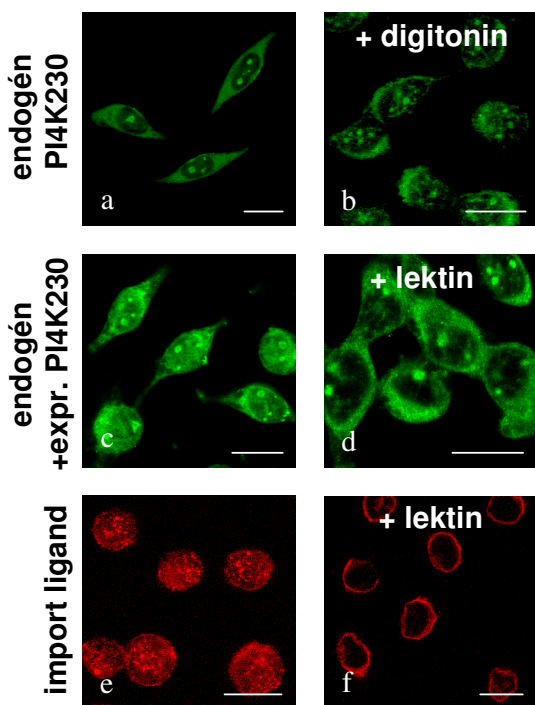
Korábbi megfigyeléseinket összegezve elmondhatjuk, hogy a PI4K230 detergens rezisztens módon jelen van a sejtmagvacskában ahol (direkt vagy indirekt) kölcsönhatásba lép annak DNS és RNS komponenseivel. Arra a kérdésre viszont, hogyan jut a PI4K230 a nukleoluszba, expressziós kísérleteink nem adtak választ. Megfigyelhető volt azonban, hogy míg LMB hatására az expresszált PI4K230 a nukleoplazmában dúsult fel, a fiziológias előfordulás és a pEGFP-PI4K Δ 130 megjelenése a magon belül a nukleoluszban volt észlelhető. Ezek alapján a sejtmagi transzport összetett szabályozását, esetleg többféle transzport mechanizmus létét feltételezhetjük. A transzportban résztvevő potenciális nukleáris lokalizációs szignálok szerepét modell-kísérletekben tanulmányoztuk.

4. 8. 1. Sf9 sejtekben expresszált PI4K230 sejtmagi importja permeabilizált HeLa sejtekben

A nukleáris/nukleoláris import tanulmányozását célzó kísérleteinket permeabilizált HeLa sejteken végeztük az Adam és mtsai. (1990) által bevezetett módszerrel, illetve, Timinszky és mtsai. (2002) által megadott leírás felhasználásával. Az első magtranszportos kísérletünkben Sf9 sejtekben expresszált PI4K230 sejtmagi importját vizsgáltuk digitoninnal permeabilizált citoplazmamembránú HeLa sejteken, a transzporthoz szükséges összes komponenst tartalmazó retikulocita lizátumos közegben, „energia regeneráló rendszerrel” (ATP, GTP, kreatin-foszfát, kreatin-kináz) kiegészítve. A vizsgálatához teljes Sf9 lizátumot használtunk, és a PI4K230-at anti-N antitesttel indirekt módon detektáltuk. A 17. ábra mutatja, hogy az anti-N antitesttel detektált endogén PI4K230 intenzív nukleoláris festődése a HeLa sejteknél is jól megfigyelhető (17. ábra a) és digitonin kezelést követően is megmarad (17. ábra b). A permeabilizált sejthez adott expresszált PI4K230 hatására a PI4K230 határozott sejtmagi feldúsulását tapasztaltuk (17. ábra c), mely elmaradt, ha a sejteket előzetesen és a transzport során búzacsíra lektinnel kezeltük (17. ábra d). A módszer beállításának ellenőrzésére, pozitív kontrollként a kereskedelmi forgalomban kapható ún. „import ligand” (rodaminnal jelölt BSA-hoz kapcsolt SV40 vírus NLS) transzportját vizsgáltuk. Az import ligand vázlatos szerkezetét mutatja a 19. ábra. Az import ligand fentihez hasonló retikulocita lizátumos közegben tapasztalt sejtmagi transzportja (17. ábra e) a

rendszer működőképességét, míg a lektines gátolhatóság (17. ábra f) a maghártya intaktságát bizonyítja. Fontos megjegyezni, hogy a lektin az import ligand maghártyához való szállítását és a mag-póruskomplexhez való kötődését nem gátolja, csak a nukláris transzlokációt. Ezt mutatja a lektin jelenlétében kapott éles perinukláris jelölődés (17. ábra f).

Eredményeink egyértelműen mutatják, hogy a rovarsejtekben expresszált PI4K230 retikulocita lizátummal transzportálódik a sejtmagba. Nukleoláris transzport ellenben nem ítéhető meg a nagyfokú endogén PI4K230 jelölődés miatt. Ennek tisztázására izolált, fluoreszcensen jelölt enzimre lett volna szükség, ilyet azonban nem tudtunk előállítani az expresszált fehérje nagyfokú aggregációs hajlama és nem megfelelő tisztasága miatt. Emiatt, és a feltételezett NLS szakaszok izoláltan történő vizsgálata céljából, az „import ligandhoz” hasonló modellekkel tanulmányoztuk a PI4K230 feltételezett NLS szakaszainak hatását a kémiaihoz hozzá kapcsolt fluoreszcensen jelölt BSA nukleáris/nukleoláris transzportjára.



17. ábra: Endogén, és import kísérlettel bejuttatott expresszált PI4K230 kimutatása HeLa sejtekben

Kezeletlen (a) és digitoninnal (b) permeabilizált HeLa sejtekben az endogén PI4K230 citoplazmatikusan és nukleolárisan található. Az Sf9 sejtekben expresszált PI4K230 hozzáadásakor sejtmagi feldúsulás látható a retikulocita lizátos import során (c), ami lektin kezelés mellett elmaradt (d). Az endogén és hozzáadott PI4K230-at anti-N antitesttel indirekt módon mutattuk ki. A kontrollként alkalmazott import ligand retikulocita lizátalakkumulálódott a HeLa sejtek magjában (e), melyet gátolt a közeg lektin tartalma (f). Mérőlé: 20 μ m

4. 8. 2. A PI4K230 monopartit NLS-e (NLS1) sejtmagba irányító információt hordoz

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy mely szekvenciák közreműködésével, és milyen transzport mechanizmussal történik a PI4K230 sejtmagi importja.

A PI4K230 szerkezetében -szekvenciahomológiai vizsgálatok alapján két klasszikus,

egy monopartit NLS (továbbiakban NLS1) és egy bipartit NLS (NLS2) található (Gehrmann és mtsai., 1999). Az azonban, hogy ezen szekvenciák valóban hordoznak sejtmagba irányító információt, még nem bizonyított. Emellett a PI4K230 egy szakasza részleges szekvenciahomológiát mutat a foszfolipid szkrambláz ncNLS-ével (Ben-Efraim és mtsai., 2004), ami alapján ezt a szakaszt a PI4K230 harmadik potenciális NLS-ének (NLS3) tekintettünk. A feltételezett NLS szekvenciákat mutatja az 5. táblázat.

NLS szekvenciák	Importin kötőhelyek ^h											
	minor					major						
	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '	P ₅ '	P ₁ P ₂ P ₃ P ₄ P ₅						
Monopartit NLS: PI4K230 ₉₂₀₋₉₂₇ ^a SV40 ₁₂₆₋₁₃₂ ^b NS1A ₃₄₋₄₁ ^c						I P					H K R I R K <u>K</u> K <u>R</u> <u>K</u> D <u>R</u> L R <u>R</u>	R V V D Q <u>K</u>
Bipartit NLS PI4K230 ₁₄₁₅₋₁₄₃₂ ^a NPM ₁₅₅₋₁₇₀ ^d RB ₈₆₀₋₈₇₆ ^e NS1A ₂₁₉₋₂₃₇ ^c	K K T N R	G S Q L H K Y Y	M K R R T									
	K R P A A	T K K A G Q	A K K K K									
	K R S A E	G S N P P K P	L K K L R									
	<u>K</u> <u>R</u> K M A	<u>R</u> T A R	S <u>K</u> V <u>R</u> <u>R</u>	D K M A D								

NLS szekvenciák	Kötőhelyek													
	major													
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅		S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅			
ncNLS														
PI4K230 ^a ₉₃₄₋₉₄₇	G	L	V	D	K	F	P	H	L	L	W	S	G	T
PLSCR1 ^f ₂₅₇₋₂₆₆	G	K	I	S	K					H	W	T	G	I

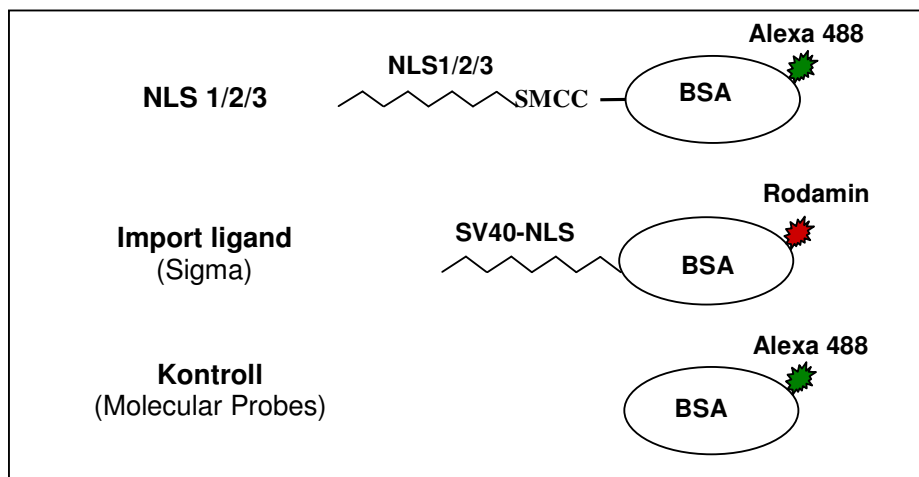
a: SV40 nagy T NLS (Fontes és mtsai., 2000); b: NSA1, influenza A vírus „nonstructural” fehérje 1 (Melen és mtsai., 2007); c: NPM, nukleoplazmin (Xenopus Laevis) (Fontes és mtsai., 2000); d: RB, retinoblasztoma fehérje (Fontes és mtsai., 2003); e: PLSCR1, foszfolipid szkrambláz 1 (Ben-Efraim és mtsai., 2004)

5. táblázat: A PI4K230 feltételezett NLS szekvenciáinak összehasonlítása néhány ismert NLS szekvenciával

Az importin α krisztallográfiai vizsgálatával feltárt minor és major NLS kötőhelyek a mono és bipartit NLS-ek egyes aminosavainak „befogadására” képesek, ezeket P1'-P5', P1-P5 és S1-S5 jelöli (Fontes és mtsai., 2000). Az aláhúzott bázikus aminosavak a transzport szempontjából kritikusak.

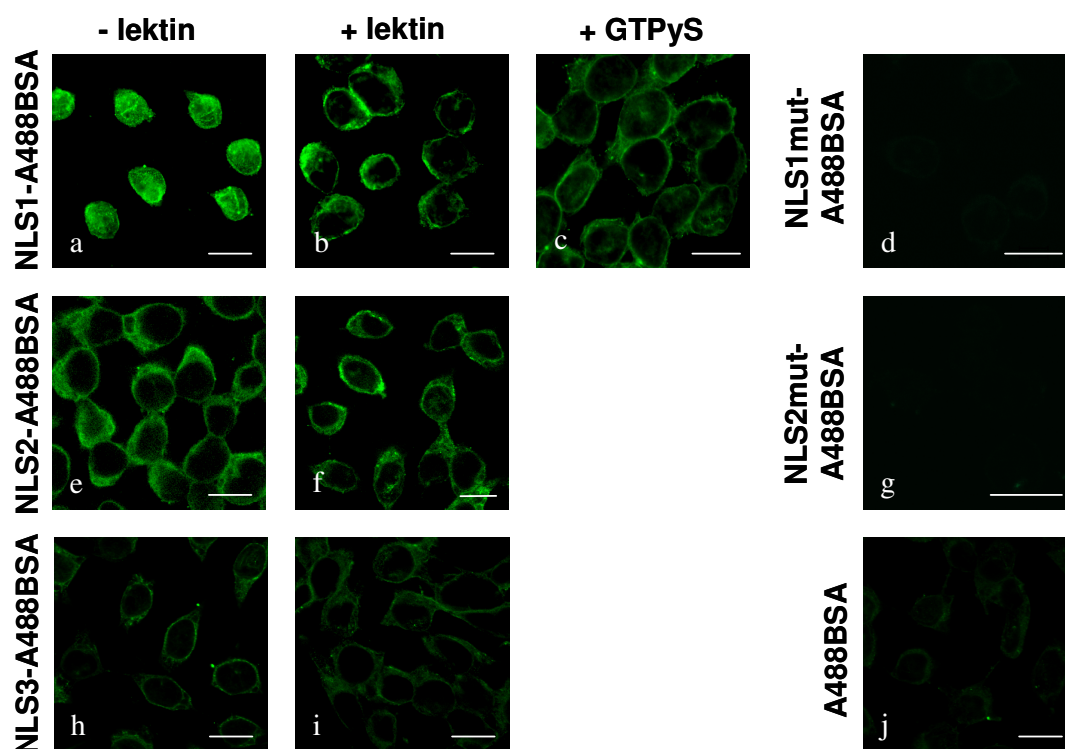
Ezen régiók további vizsgálatához a három feltételezett NLS szekvenciáját magába foglaló peptideket szintetizáltattunk, figyelembe véve a környező aminosavak moduláló szerepét és a szabad mozgás biztosítását (Fontes és mtsai., 2003; Harreman és mtsai., 2004). A szintetikus peptideket méretnövelés céljából Alexa Fluor 488 festékkel jelölt BSA-hoz

kapcsoltuk (18. ábra) és az így kapott NLS peptid-Alexa488BSA komplexek magi transzportját retikulocita lizátumos import kísérletekben vizsgáltuk. A fenti kísérleti körülmények között az NLS1-Alexa488BSA transzportálódott a sejtmagba és egész magot kitöltő diffúz megjelenést mutatott (19. ábra a). Ezzel szemben sem az NLS2-Alexa488BSA (19. ábra e) sem az NLS3-Alexa488BSA (19. ábra h) esetében nem tapasztaltunk nukleáris akkumulációt, amit alátámaszt, hogy a lektin tartalmú retikulocita lizátumos import eredménye (19. ábra f, i) megegyezett a nem gátolt transzportnál kapott képekkel. Az NLS1-Alexa488BSA retikulocita lizátumos rendszerben tapasztalható sejtmagi transzportja lektin jelenlétében nagymértékben gátlódott (19. ábra b). Az NLS1-Alexa488BSA sejtmagi feldúsulása abban az esetben is elmaradt, ha az energia regeneráló rendszerben GTP helyett nem hidrolizáló GTP analógot, GTP γ S-t használtunk (19. ábra c). A kapcsolt peptidet nem hordozó Alexa488BSA sem számottevő perinukleáris akkumulációt, sem nukleáris transzlokációt nem mutatott (19. ábra d), igazolva, hogy az NLS1-Alexa488BSA transzportja a szintetizált peptid hatásának tulajdonítható. További kontroll kísérletekben megvizsgáltuk az Alexa488BSA-hoz kapcsolt mutáns NLS1 peptid transzportját, mely az import szempontjából kritikus bázikus aminosavak helyett alanint tartalmaz (19. ábra d). Mivel nukleáris transzport így nem következett be, megállapítható, hogy az NLS1 szekvencia az importinokhoz klasszikus módon kötődve képes egy fehérjét a sejtmagba „irányítani”.



18. ábra: A receptor-függő import kísérletekben használt ligandok sematikus képe
SMCC: a BSA-val és peptiddel kapcsolódó szulfo-SMCC származék; SV40-NLS: Az SV40 T-antigén NLS szekvenciáját magába foglaló CGGGPKKKRKVED peptid.

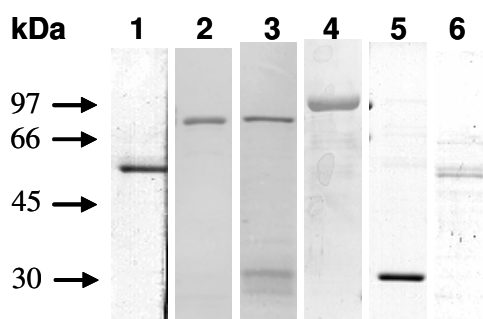
Bár az NLS2-Alexa488BSA nem mutatott sejtmagi transzportot (19. ábra e), a fluoreszcens jel sejtmag körüli -az NLS3-Alexa488BSA-tól jóval intenzívebb- feldúsulása, az NLS2 peptid és a transzport faktorok közötti kölcsönhatásra utalhat. Az importinokkal való kapcsolódás lehetőségét támasztja alá a mutáns NLS2mut-Alexa488BSA peptiddel (4. táblázat) végzett import kísérlet eredménye is: ebben az esetben a perinukleáris fluoreszcens jel hiányzott, ezért a bázikus aminosavakban mutált peptid nem volt képes importinokhoz kapcsolódni és perinukleárisan kötődni (19. ábra g).



19. ábra: *Alexa488BSA-hoz kapcsolt NLS szekvenciák sejtmagi importjának vizsgálata*
 Permeabilizált HeLa sejteken elvégzett retikulocita lizátumos import kísérletben az NLS1-Alexa488BSA határozott sejtmagi feldúsulást mutatott (a), mely gátlódott lektin kezelés mellett (b) vagy GTPγS tartalmú (c) import közegben. A transzport elmaradt bázikus aminosavakban mutált NLS1 peptid (NLS1mut-Alexa488BSA) esetén (d). Az NLS2-Alexa488BSA intenzív (e) az NLS3-Alexa488BSA gyenge (h) perinukleáris jelet adott, a lektin tartalmú közeghez hasonlóan (f, i). NLS2mut-Alexa488BSA (g) és NLS szekvenciát nem hordozó Alexa488BSA (j) csak háttér intenzitású jelet ad. Mérőléc: 20 μm

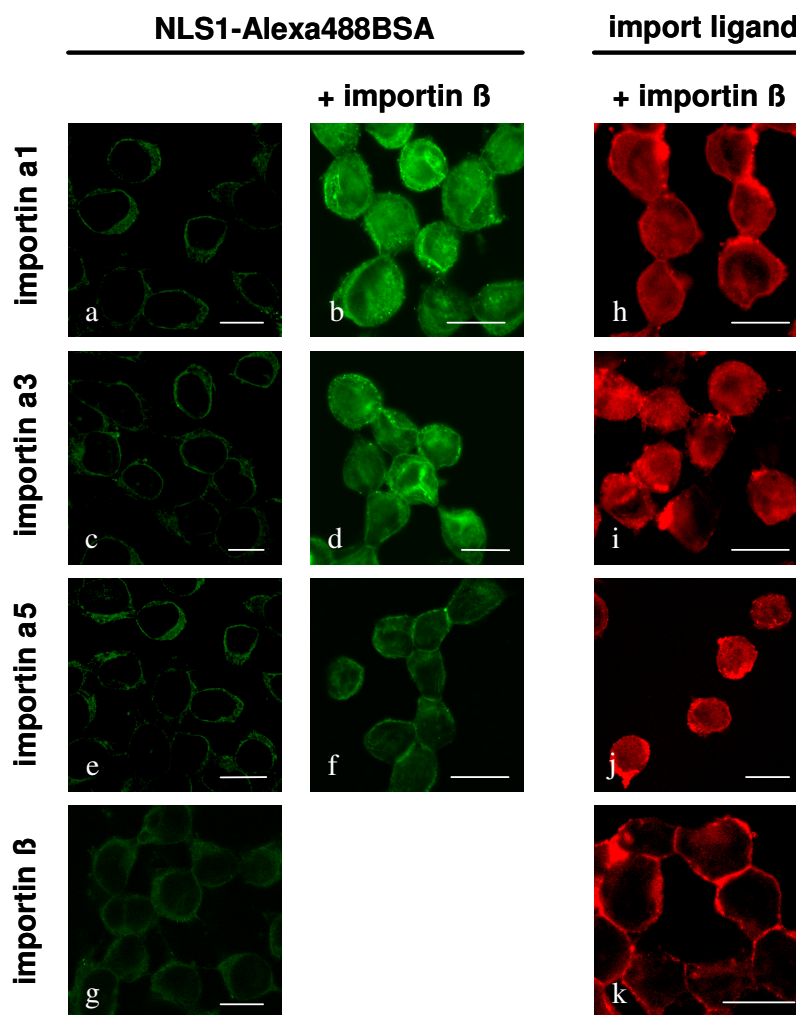
4. 8. 3. Az NLS1 sejtmagi transzportja importin $\alpha 1/\beta$ és importin $\alpha 3/\beta$ heterodimer transzport faktorok közreműködésével történik

A retikulocita lizátum az import rendszer komponenseit fiziológiás koncentrációban tartalmazza, azonban a retikulocita lizátummal végzett import kísérletekből nem lehet megállapítani, hogy az importinok közül melyek a felelősek valamely molekula transzportjáért. A transzport részleteinek vizsgálatára a digitoninnal permeabilizált sejtek inkubációs közegében az import rendszer minden egyes komponensét tisztított formában külön-külön biztosítottuk. A „szintetikus” import közegben az alábbi komponensek szerepeltek: ATP regeneráló rendszer, NTF2 fehérje (kereskedelmi), valamint tisztított rekombináns importin $\alpha 1$ vagy importin $\alpha 3$ vagy importin $\alpha 5$, továbbá importin β , Ran és RanGAP fehérjék. Az izolált rekombináns fehérjék tisztaságát mutatja a 20. ábra.



20. ábra: *Baktériumokban expresszált rekombináns fehérjék tisztítási eredménye*
A rekombináns fehérjéket a Módszerekben leírt módon tisztítottuk. A preparátumok fehérje összetételét SDS-PAGE val (10%-os gélen) és Coomassie festéssel vizsgáltuk. **1.:** His- importin $\alpha 1$, **2.:** GST-importin $\alpha 3$, **3.:** GST-importin $\alpha 5$, **4.:** His-importin β , **5.:** His-Ran, **6.:** His-Ran-GAP. A többségében homogén preparátumok a jellemző molekulásúlyt mutatják.

Expresszált importinokat tartalmazó közegben az NLS1-Alexa488BSA sejtmagi feldúsulása (21. ábra) abban az esetben volt megfigyelhető, ha az import közeg heterodimert létrehozó importin $\alpha 1$ és importin β (21. ábra b) vagy importin $\alpha 3$ és importin β (21. ábra d) transzportinok keverékét tartalmazta. Ezzel szemben az importin $\alpha 5/\beta$ dimert (21. ábra f) vagy az importinokat izoláltan tartalmazó közegekben (21. ábra a, c, e, g) a transzport elmaradt. Ugyanezen kísérleti rendszert az NLS2-Alexa488BSA és NLS3-Alexa488BSA fehérjékre is beállítottuk de egyetlen esetben sem tapasztaltunk sejtmagi feldúsulást (nincs bemutatva). A kontrollként használt import ligand importin $\alpha 1/\beta$ (21. ábra h.), importin $\alpha 3/\beta$ (21. ábra i.) és importin $\alpha 5/\beta$ komplexekkel (21. ábra j) egyaránt transzportálódott a sejtmagba, míg az önálló importin β -val nem (21. ábra k).



21. ábra: Az NLS1 által vezérelt magtanszport importin-függőségének vizsgálata

Az NLS1-Alexa488BSA sejtmagi importját (az NTF2, Ran-mix, energia regeneráló rendszer mellett) a megadott expresszált importinokat illetve importin α/β dimereket tartalmazó import közegekben vizsgáltuk. Az NLS1-Alexa488 fehérje importin $\alpha 1/\beta$ (b) és importin $\alpha 3/\beta$ (d) tartalmú közegben transzportálódott a sejtmagba, míg monomer importin alfákkal (a,c,e), vagy importin β -val (g) és importin $\alpha 5/\beta$ dimerekkel (f) a magi feldúsulás elmaradt. A rendszer működőképességét import liganddal teszteltük, ami importin $\alpha 1/\beta$ (h), importin $\alpha 3/\beta$ (i) és importin $\alpha 5/\beta$ (j) dimerekkel egyaránt sikeresen transzportálódott a sejtmagba, míg önálló importin β -val nem (k).

Az NLS-ek és az importinok közötti közvetlen kölcsönhatást felülrétegzéses dot-blot kísérlet segítségével is megvizsgáltuk (22. ábra). A transzport kísérleteinkkel összhangban a membránon immobilizált NLS1-Alexa488BSA nem, vagy csak kis mértékben kötődik különálló importin $\alpha 1$, importin $\alpha 3$ és importin β transzportinokhoz, de erősen asszociál importin $\alpha 1/\beta$ és importin $\alpha 3/\beta$ dimerekkel. Érdekes módon az NLS2-Alexa488BSA szintén erősen köti az importin $\alpha 1/\beta$ és $\alpha 3/\beta$ dimereket, emellett az importin β -val való kölcsönhatása felveti az előzőektől eltérő sejtmagi transzport lehetőségét is. Importin $\alpha 5$ -tel és importin $\alpha 5/\beta$

dimerekkel az NLS1 és NLS2 származékok csak nagyon gyengén vagy egyáltalán nem asszociálnak (nincs feltüntetve). Az NLS1mut- és NLS2mut-Alexa488BSA mono- és dimer importinokkal sem asszociál. Az NLS3-Alexa488BSA és a kontrollként alkalmazott Alexa488BSA egyetlen monomer és dimer importinnal sem lép kölcsönhatásba (nem dokumentált).

Ezen megfigyelések megerősítik, hogy a PI4K230 sejtmagi importja receptor-függő folyamat, amely a fehérje NLS1 szekvenciájával közvetlen kölcsönhatásba lépő importin $\alpha 1/\beta$ és importin $\alpha 3/\beta$ dimerek által vezérelt útvonalakon történhet.

antitestek	anti poli-His (importin $\alpha 1$ + importin β)				anti GST (importin $\alpha 3$)	
	imp. $\alpha 1$ (His)	imp. β (His)	imp. $\alpha 1$ (His) + imp. β (His)	imp. $\alpha 3$ (GST) + imp. β (His)	imp. $\alpha 3$ (GST)	Imp. $\alpha 3$ (GST) + imp. β (His)
NLS1-Alexa488BSA	○/⊙	○	●	●	⊙	●
NLS1mut-Alexa488BSA	○	○	○	○	○	○
NLS2-Alexa488BSA	○	●	●	●	⊙	●
NLS2mut-Alexa488BSA	○	○	○	○	○	○
expr.NLS2-Alexa488 (His)					○	⊙
expr.NLS2mut-Alexa488 (His)					○	○

22. ábra: Az import kísérletekben alkalmazott PI4K230 NLS-származékok asszociációja importinokkal: dot blot kísérlet

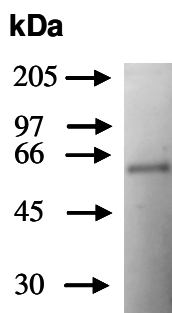
Az import pufferben oldott expr.NLS2-Alexa488 és NLS-Alexa488BSA peptideket nitrocellulóz membránra cseppentettük és blokkolást követően a feltüntetett importinokkal inkubáltuk. PBS mosások után az importinok kötődését antitestek segítségével ECL reakcióval tettük láthatóvá.

Jelölések: ● - erős immunreakció, ⊙ - gyenge immunreakció, ○ - nincs immunreakció.

Az expr.NLS2-Alexa488 (4.8.4. fejezet) nem köti az importin $\alpha 3$ fehérjét de specifikusan asszociál importin $\alpha 3/\beta$ dimerekkel. A mutáns expr.NLS2 forma és az importin $\alpha 3/\beta$ dimerek között nem jön létre kölcsönhatás. Az expr.NLS2 és importin $\alpha 1$ közötti asszociáció lehetősége jelen kísérleti rendszerben nem vizsgálható (mivel mindkét rekombináns fehérjén N-terminálisan poli-hisztidint hordoz), importin $\alpha 1$ elleni antitesttel azonban az asszociáció kimutatható volt (nem dokumentált).

4. 8. 4. Az expresszált NLS2 peptid (1166-1667 aminosavak) hatékonyan transzportálódik a magvacskába

Ahogy azt korábban bemutattuk, az NLS2-Alexa488BSA fehérje esetében nem tapasztaltunk nukleáris transzlokációt, sem retikulocita lizátumos közegben, sem importinokkal vizsgálva. Mivel irodalmi adatok szerint egyes esetekben a nukleoláris transzport csak nagyobb peptidszakaszok hatására jön létre, az NLS2-t tartalmazó nagyobb enzim fragment, az expresszált NLS2 transzportját is megvizsgáltuk. Az általunk klónozott rekombináns fehérje magába foglalja a PI4K230 1166-1667 aminosavnyi szakaszát (18. ábra), melynek 57 kDa-os mólsúlya meghaladja az NPC-k diffúziós határértékét. Az izolált expr.NLS2 tisztaságát mutatja a 23. ábra.

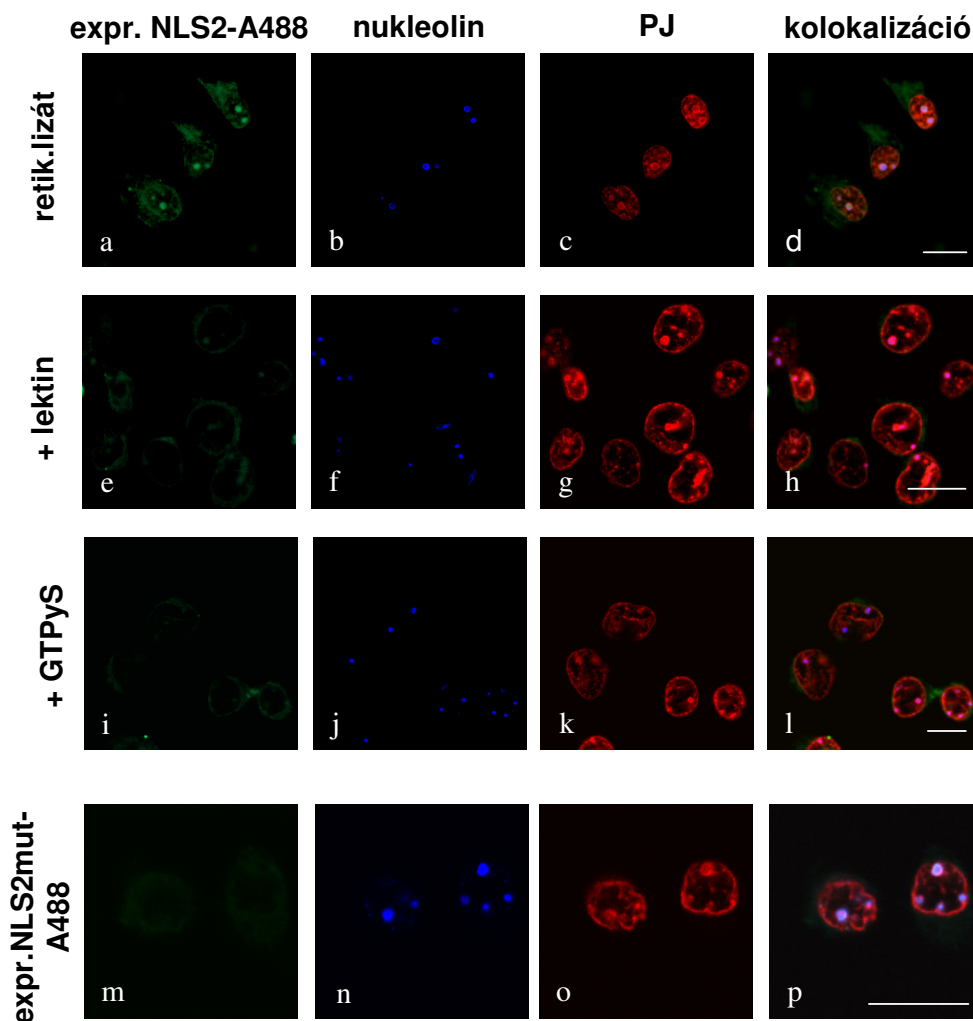


23. ábra: Az *expr.NLS2* tisztasága

Az általunk klónozott rekombináns His-NLS2 fehérjét BL21(DE3) E. coliban expresszáltuk, majd a lizátumból SP-sepharose kromatográfiával tisztítottuk. Az ábra az eluált fehérje tisztaságát mutatja Coomassival festve 10% SDS-PAGE után.

Alexa Fluor 488 festékkel történő jelölése után az expr.NLS2 import kísérletekben a sejtmagon belül túlnyomóan a sejtmagvacskában akkumulálódott (24. ábra a-d). A párhuzamosan alkalmazott indirekt immunfluoreszcenciás nukleolin jelölés (24. ábra 2. oszlop) és a propidium-jodidos magfestés (24. ábra 3. oszlop) biztosította a vizsgált peptid pontos lokalizációjának meghatározását. Az expr.NLS2-Alexa488 importja lektin-érzékeny és Ran-függő, ugyanis lektin (24. ábra e-h) valamint GTP γ S (24. ábra i-l) jelenlétében végzett import kísérletben gyakorlatilag megszűnt. A transzport szempontjából kritikusnak tartott bázikus aminosavakban mutáns expr.NLS2mut-Alexa488BSA fehérje – melyben az

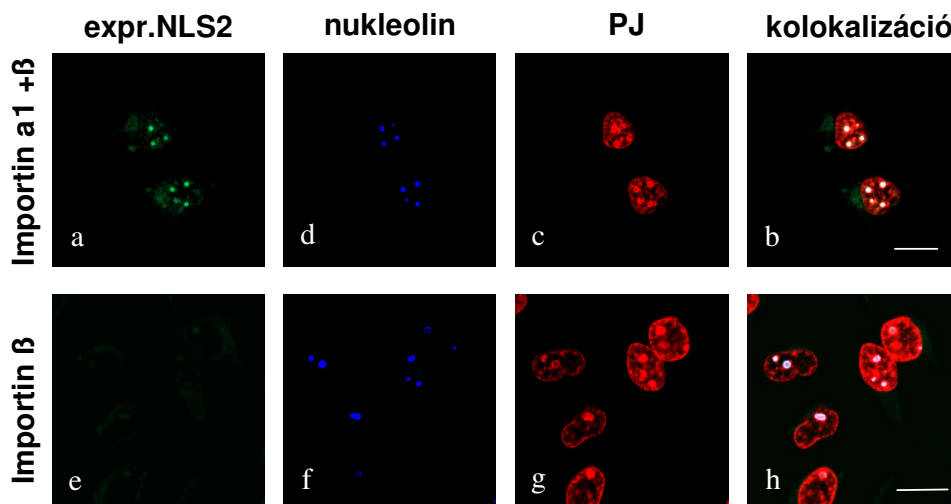
NLS2mut szintetikus peptiddel azonos módon a lizinek és argininek: alaninra, metioninra, glicinre vannak cserélve – retikulocita lizátumos rendszerben vizsgálva nem jelent meg a sejtmagban (24. ábra m-p).



24. ábra: Az *expr.NLS2-Alexa488* és *mutáns formájának magtranszportja*

A PI4K230 1166-1667 aminosavnyi szakaszát magába foglaló klónozott NLS2 peptidet és kritikus bázikus aminosavakban mutáns (*expr.NLS2mut*) formáját Alexa Fluor 488 festékkel jelöltük majd mozgásukat retikulocita lizátos import rendszerben vizsgáltuk. A kísérlet során az *expr.NLS2-Alexa488* peptid feldúsulását tapasztaltuk a HeLa sejtek magvacskájában (a) mely elmaradt lektin (e) vagy GTPγS (i) tartalmú retikulocita lizátos közegben. A sejtmagi transzport az *expr.NLS2mut-Alexa488* peptid esetében sem figyelhető meg (m). A nukleoláris jel könnyebb megítélése végett az Alexa488-jelölt peptidek (1.oszlop) indirekt jelölt nukleolinnal (2. oszlop) és propídium-jodiddal (3. oszlop) kolokalizációban (4. oszlop) láthatók. Mérőlé: 20 μm

Vizsgáltuk az expr.NLS2 magi transzportját izolált importinokat tartalmazó import rendszerben is (25. ábra). Az általunk összeállított import rendszerben az expr.NLS2-Alexa488 nukleoláris feldúsulását tapasztaltuk nem csak -a dot blot eredményekkel összhangban lévő- importin $\alpha 3/\beta$ dimerekkel (nincs bemutatva) hanem importin $\alpha 1/\beta$ dimereket tartalmazó közegben is (25. ábra a-d), míg önálló importin β -val (25. ábra e-h) és importin $\alpha 5/\beta$ dimerekkel a transzport elmaradt (nincs bemutatva).



25. ábra: Az *expr.NLS2-Alexa488* sejtmagi transzportja importinokkal

Az *expr.NLS2-Alexa488* sejtmagi transzportjának importin-függőségét vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a peptid importin $\alpha 1/\beta$ tartalmú közegben sikeresen transzportálódik a magba, ahol a magvacskában akkumulálódik (a), míg önálló importin β -val (importin $\alpha 1$ példáján: e) a transzport elmarad. Az *expr.NLS2-Alexa488* transzportját nukleolinnal (2. oszlop) és propídium jodidos magjelöléssel (3. oszlop) kolokalizációban (4. oszlop) mutatjuk be. Mérőléc: 20 μ m

Bár a szintetikus NLS2-Alexa488BSA esetében nem tapasztaltunk sejtmagi importot, a PI4K230 bipartit NLS-e funkcionáló NLS lehet, amit alátámaszt az *expr.NLS2-Alexa488* receptor-függő importja és a dot blot eredmények. Ezek szerint az *expr.NLS2* importin α/β dimerek közreműködésével transzportálódik a sejtmagon belül főleg a nukleoluszba. A szintetikus és expresszált NLS2 import kísérletben tapasztalt eltérő viselkedésének okaként felmerül a környező aminosavak szerepe, melyek hatást gyakorolhatnak az NLS által közvetített importra (Harreman és mtsai., 2003). Ezért egy hosszabb, szintetikus NLS2 peptid (1405 STISKKSGMSKKTNRGSQLHKYYMKRRTL 1433) transzportját is vizsgáltuk, amely azonban azonos kísérleti körülmények között szintén nem transzportálódott a sejtmagba (nem dokumentált).

4. 8. 5. Az NLS2, mint sejtmagvacskába irányító szignál

További vizsgálataink annak felderítésére irányultak, hogy mely szekvenciák közreműködésével valósul meg az expr.NLS2-Alexa488 sejtmagvacska-transzportja. Bár konszenzus nukleoluszba irányító (targeting) szignál (NTS) szekvenciákat az irodalom nem írt le, a megismert NTS-ek közös jellemzője a bázikus aminosav-gazdagság, amely NLS szignál részét is képezheti (Dynes és mtsai., 2004). Szekvenciahomológiai vizsgálatainkkal nagyfokú hasonlóságot találtunk a humán angiogenin NTS-e (Lixin és mtsai., 2001) és a PI4K230 bipartit NLS-ének C-terminális bázikus fele között.

angiogenin NTS:	IMRRRGL
PI4K230 NLS2:	SKKTNRGSQLHKYMKRRTL
	* : * * *

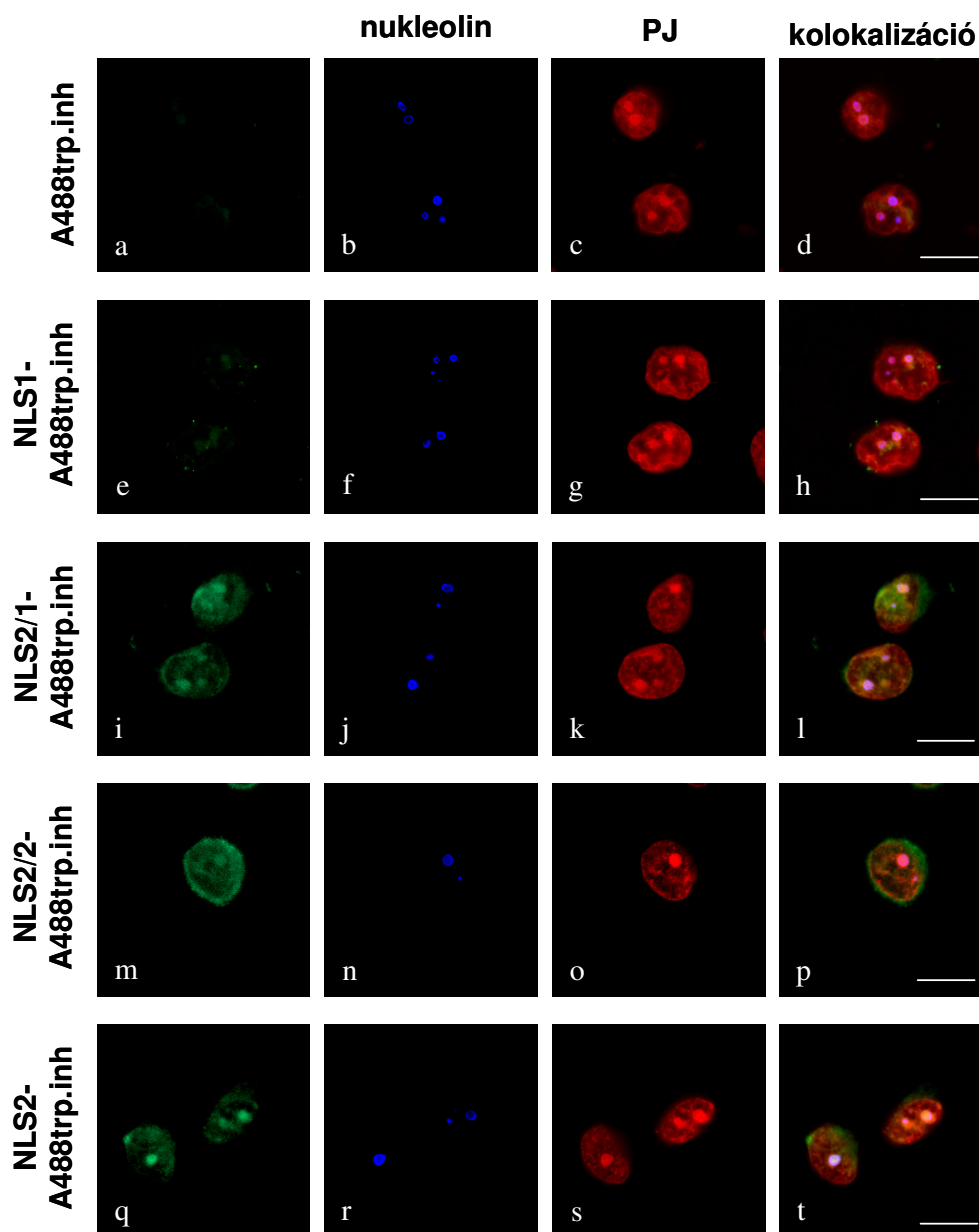
(*- azonos aminosav, :- csoportazonos aminosav, aláhúzás- kritikus bázikus aminosav)

Az NTS-ek bázikus sajátosságát alapul véve 3 szintetizált peptid esetében is megvizsgáltuk a nukleoluszba irányító képességet: az NLS2 N-terminális bázikus részét és összekötő szakaszát (NLS2/1), az NLS2 angiogenin homológ C-terminális bázikus részét (NLS2/2) és a teljes hosszúságú NLS2-t tartalmazó peptideket:

NLS2	–	1414	SKKTNRGSQLHKYMKRRTL	1433	
NLS2/1	–	1414	SKKTNRGSQLHKY	1426	
NLS2/2	–		1427	YMKRRTL	1433

A szintetizált peptideket Alexa Fluor 488 festékekkel jelölt tripszin inhibitorhoz (trp.inh.) kapcsoltuk. Az így kapott fehérjék mólsúlyuk alapján szabad diffúzióval juthatnak az NPC-n keresztül, így a kísérletek során tapasztalt nukleáris/nukleoláris akkumuláció kizárólag a sejtmag/nukleolusz valamely komponensével való közvetlen kölcsönhatással magyarázható.

A nukleoláris transzport vizsgálata során a permeabilizált HeLa sejtekhez adott közeg megegyezett a retikulocita lizátumos importnál használttal. A jelölt fehérjéket -helyzetük pontosabb meghatározása végett- kolokalizációban vizsgáltuk indirekt jelölt nukleolinnal (26. és 27. ábra 2. oszlop) és propidium-jodidos magfestéssel (26. és 27. ábra 3. oszlop). Kontrollként az Alexa488trp.inh.-t használtuk, amely a permeabilizált HeLa sejtek magjában semmilyen akkumulációt nem mutatott (26. ábra a-d).



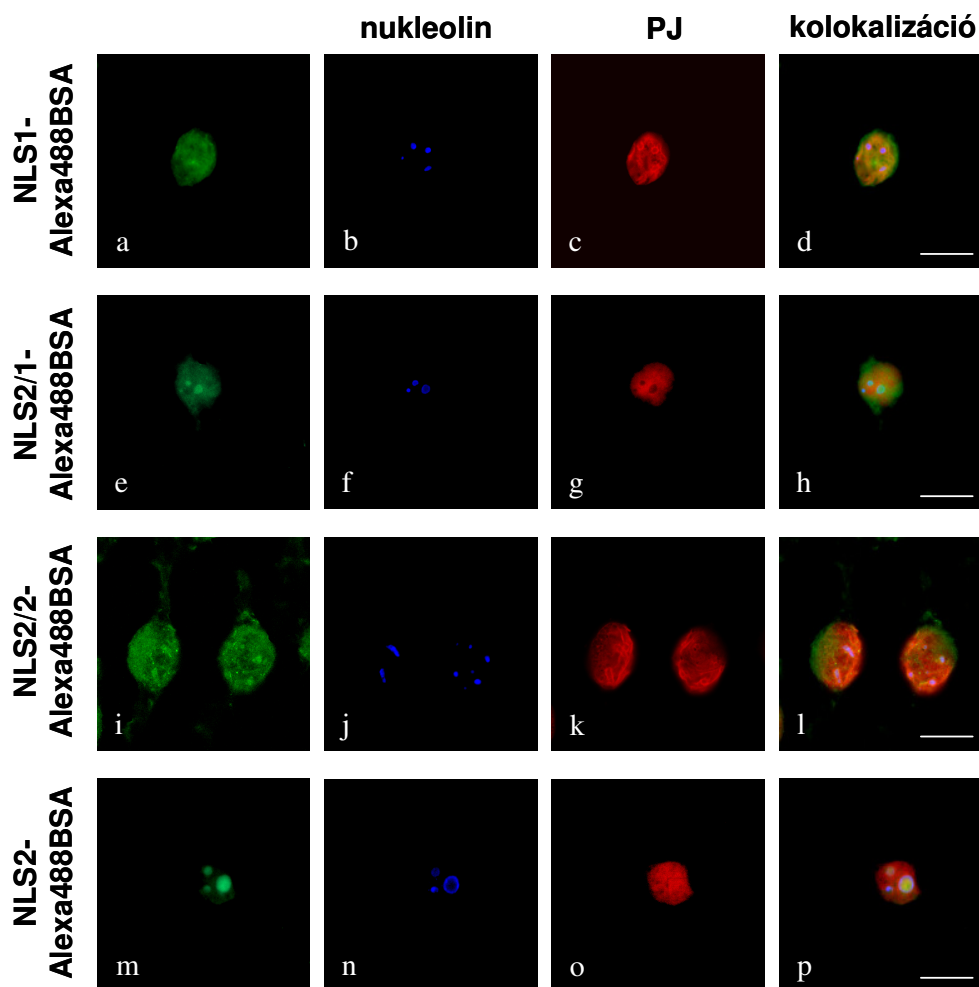
26. ábra: *Alexa488trp.inh-hoz kötött NLS peptidek lokalizációja permeabilizált HeLa sejtek magjában*

Az NPC diffúziós határértékétől kisebb méretű, fluoreszcensen jelölt tripszin inhibitorhoz (Alexa488trp.inh) kapcsolt NLS szekvenciák megjelenését vizsgáltuk permeabilizált HeLa sejtek magjában. Magi feldúsulást sem önálló (a), sem az NLS1 szekvenciát hordozó (e) Alexa488trp.inh esetében nem tapasztaltunk. Ezzel szemben az NLS2-t (q) ill. fragmentjeit (i,m) hordozó Alexa488trp.inh a gyenge karioplazmatikus megjelenés mellett a magvacskában akkumulálódott, amely a teljes NLS2-Alexa488trp.inh esetén (q) volt a legkifejezettebb. 2. oszlop: nukleolin jelölés, 3. oszlop: propidium-jodid, 4. oszlop: 1-3 oszlop kolokalizációja. Mérőlé: 20 μ m

Az NLS1-Alexa488trp.inh. esetében a háttérintenzitású halvány jeltől eltekintve szintén nem volt nukleáris/nukleoláris feldúsulás, ami arra utal, hogy az NLS1 peptid nem lép erős kapcsolatba magi komponensekkel és nem transzportálódik a nukleoluszba (26. ábra e-h). Viszont a gyenge, diffúz nukleoplazmatikus jelölés mellett határozott nukleoláris akkumulációt tapasztaltunk az NLS2/1-Alexa488trp.inh. esetében (26. ábra i-j), míg az NLS2/2-Alexa488trp.inh. ennél gyengébb nukleoláris megjelenést mutatott (26. ábra m-p). A permeabilizált HeLa sejtek sejtmagvacskájában tapasztalható feldúsulás a teljes NLS2-Alexa488trp.inh. esetében volt a legkifejezettebb, jóval meghaladva azt a mértéket, amit az NLS2 fragmentjei esetében tapasztaltunk (26. ábra q-u).

További kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy az előző peptidek (NLS2/1, NLS2/2, teljes NLS2) a receptor-függő importtal magba juttatott fehérjét is feldúsítják-e a magvacskában. Ennek érdekében az NLS2-t és fragmentjeit NLS1-Alexa488BSA-hoz kapcsoltuk és retikulocita lizátumos import kísérletben vizsgáltuk. A korábbiakkal megegyező módon, a kontrollként alkalmazott NLS1-Alexa488BSA belépett a sejtmagba de nem mutatott nukleoláris akkumulációt (27. ábra a-d). Az NLS2/1-NLS1-Alexa488BSA (27. ábra e-h) és az NLS2/2-NLS1-Alexa488BSA (27. ábra i-l) fehérjék nukleoláris megjelenésében mutatkozó különbségek hasonlítottak az Alexa488trp.inh.-hoz kapcsolt NLS2/1 és NLS2/2 esetén tapasztaltakhoz (26. ábra i-p). A teljes NLS2 szignál magvacskába irányító képességét jól szemlélteti az NLS2-NLS1-Alexa488BSA-val elvégzett import kísérlet, melynek eredményeként az összes sejtmagba transzportálódott molekula a sejtmagvacskában akkumulálódott (27. ábra m-p).

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



27. ábra: Szintetizált peptidek nukleoluszba irányító képességének vizsgálata.

Az ábra azt mutatja, hogy az NLS2/1, NLS2/2 és teljes NLS2 milyen lokalizáció-módosító hatását fejt ki az NLS1 által sejtmagban juttatott Alexa488BSA-ra. Az NLS1-Alexa488BSA diffúz magi megjelenéséhez képest (a) az NLS2/1-NLS1-Alexa488BSA esetében nagyobb (e), míg az NLS2/2-NLS1-Alexa488BSA esetében kisebb (i) mértékű nukleoláris feldúsulást tapasztaltunk. A teljes NLS2 erős nukleoluszba irányító képességét mutatja, hogy a sejtmagba importálódott NLS2-NLS1-Alexa488BSA szinte teljes mennyisége a magvacskában akkumulálódott (m). 2. oszlop: nukleolin jelölés, 3. oszlop: propidium-jodid, 4. oszlop: 1-3 oszlop egymásravezített képe. Mérőlé: 20 μ m

5. Megbeszélés

A foszfoinozitidek sejten belüli komplex szerepében új fejezetet jelentett az a felismerés, hogy jelen vannak a sejtmagban is és számos sejtmagi funkcióban nélkülözhetetlen szerepet játszanak. Előfordulásuk szubnukleáris kompartmentekhez köthető ahol, a citoplazmatikus formához hasonlóan, sokféle szabályozó hatást fejtenek ki. Mivel a teljes klasszikus foszfolipid szignálútvonal intermedierjei jelen vannak a sejtmagban, igen korán felvetődött egy, a citoplazmatikustól független magi foszfoinozitid jelpálya lehetősége. Kimutatták, hogy a DAG a PKC transzlokációját indukálja, az IP_3 pedig Ca^{2+} -ot szabadít fel a belső maghártyában IP_3 receptorokon keresztül. Emellett különféle foszfoinozitidek szerepet játszanak a sejtosztódásban, a sejtciklus szabályozásában, differenciálódásban (Divecha és mtsai., 1995; Martelli és mtsai., 1999) kromatinszerkezet változásában, (Gonzales és Anderson, 2006), génexpresszióban (Martelli és mtsai., 1999), mRNS érésében (Osborne és mtsai., 2001) és apoptotikus folyamatokban (Furuta és mtsai., 2003).

A magi foszfoinozitidek bioszintézisének első és meghatározó lépése, legtöbb esetben a magi PtdIns 4P képződése (Gonzales és Anderson, 2006). A folyamat katalízisében potenciálisan valamennyi PI4K izoforma részt vehet, mivel szerkezetükben NLS szekvenciák valószínűsíthetők. A PI4K55 jelenlétét kimutatták sejtmagi aktinhoz asszociáltan (De Graaf és mtsai., 2002) de pontos magi funkcióját még nem állapították meg. A PI4K92 izoformát is megtalálták több sejtvonal magjában (De Graaf és mtsai., 2002) és LMB hatására annak feldúsulását tapasztalták. Később Szivák és mtsai. (2006) a PI4K92-t a nukleáris spekle-ekben detektálták, továbbá kimutatták, hogy a PI4K92 magi transzlokációja foszforilációs szignálhoz kötött (Szivák és mtsai., 2006). Sejtvonalakon végzett vizsgálatainkban a PI4K55 és PI4K92 magi jelenlétét, izoforma-specifikus antitestekkel, mi is meg tudtuk erősíteni. A PI4K230-at azonban munkacsoportunkon kívül eddig senki sem mutatta ki a sejtmagban, bár szubcelluláris lokalizációjára vonatkozó vizsgálatok folytak gerincvelői neuronokon (Balla és mtsai., 2000) és különféle sejtvonalakon (Nakagawa és mtsai., 1996; Wong és mtsai., 1997) is.

A doktori munka fő célkitűzése a PI4K230 izoforma sejtmagi lokalizációjának, funkciójának és maghártyán át történő transzportjának vizsgálata volt. Ennek során új eredményeket a következő területeken értünk el:

1. *Kimutattuk a PI4K230 nukleáris, azon belül nukleoláris előfordulását.*

Immunhisztokémiai/immuncitokémiai vizsgálataink szerint a PI4K230 jelen van az agy neuronális sejteiben, továbbá ideg- és nem ideg eredetű sejtvonalakban, ahol a

sejtmagban, elsősorban a nukleoluszban feltűnően intenzív immunreakciót mutat (5-7 ábrák). A nukleoláris PI4K230 kimutatható volt a patkánygyulladás különböző régióiból készült gyorsfagyasztott metszeteken (6. ábra), és valamennyi vizsgált sejtvonalban (HCN1A, B50, COS-7, HeLa). A nukleoláris jelenlét azonban csak dehidratáción alapuló fixálás esetén volt észlelhető (etanol, metanol, metanol-ecetsav, acetone), a keresztkötést létesítő formaldehid (PFA) alkalmazását követően nem. Mivel az immuncitokémiai/immunhisztokémiai kimutathatóság fixálás-függő volt, ki kellett zárni immunológiai keresztreakciókból származó esetleges műtermékek keletkezését. A kimutatás specificitását támasztja alá, hogy a PI4K230 négy különböző epitópja elleni antitesttel végzett immunreakciók egységes nukleoláris megjelenést mutattak. Emellett a formaldehid fixálással maszkírozott epitópok visszanyerték immunreaktivitásukat forró citrátos feltárás után (12. ábra), valamint a PI4K230-ra specifikus siRNA kezelés hatására nemcsak a citoplazmából, hanem a nukleoluszból is eltűnt az immunreaktív fehérje (13. ábra). A fixálás-függő kimutathatóság csak a PI4K230 nukleoláris formájára jellemző, hiszen a citoplazmatikus forma PFA és etanol fixálást követően is hasonló megjelenést mutatott, másrészt a PI4K92 és PI4K55 α immunreakciója a nukleoluszban etanolos fixálás után sem volt észlelhető (10. ábra).

2. A PFA maszkírozó hatása a PI4K230 és a vele szorosan asszociált molekulák közötti keresztkötésen alapszik

A PFA-fixálás maszkírozó hatására feltételeztük, hogy a PI4K230 és vele szorosan asszociálódó makromolekulák között hoz létre keresztkötést, amely megakadályozza az antitestek kapcsolódását az epitópokhoz. Ennek igazolására kimutattuk, hogy az expresszált, és gélelektroforézissel elválasztott PI4K230 PFA kezelést követően is megtartja immunreaktivitását. A PI4K230-at túltermelő Sf9 sejtek lizátumát PFA-val kezelve sem csökkent az immunobloton az immunreaktivitás, igazolva, hogy a PFA nem hoz létre az immunreakciót zavaró keresztkötést a PI4K230 és citoplazmatikus fehérjék között (11. ábra). Ez a megfigyelés összhangban van azzal a tapasztalattal, hogy a PFA-val fixált sejtek citoplazmájában az immunreakció nem különbözik a más módon fixáltakétól. A nukleoluszban tapasztalt maszkírozó hatás reverzibilis, mivel az epitópok ismét immunreaktívok válnak forró citrátos kezelést követően. A nukleoluszra korlátozódó keresztkötésség egyúttal felvetette azt a kérdést is, melyek lehetnek a PI4K230-al szorosan asszociálódó nukleolusz-specifikus molekulák.

3. A PI4K asszociációja nukleoláris komponensekkel

Számos korábbi megfigyelés igazolja, hogy a sejtmagi foszfoinozitidek detergens inszolubilis nukleinsav-lipid-protein komplexben fordulnak elő (Irvine és Divecha, 1992;

D'Santos és mtsai., 1998). Ez a szerkezeti sajátosság jellemző a PI4K230-ra is., B50 sejtek nukleoláris PI4K230 tartalmát vizsgálva megfigyelhettük, hogy 60 perces triton X-100 kezelés után, a kiindulási immunreaktív fehérje több mint 60%-a jelen van. A köcsönható, maszkírozást eredményező molekulára az is jellemző, hogy a gyorsfagyasztott metszetek PFA-fixálást megelőző 5-10 perces PBS mosása a PFA-val keresztkötő molekulát „eltávolítja” és a PFA maszkírozó hatása már nem érvényesül (12. ábra). A folyamat lehet egyszerű kimosódás, de mivel minden sejten bekövetkezett, így feltételezhetően inkább a kölcsönható partner enzimátikus lebontásával kell számolnunk. Figyelembe véve, hogy a nukleázok és proteázok perces nagyságrendben fejtik ki hatásukat, a keresztkötődő molekula lehet fehérje és nukleinsav is. Eredményeink szerint triton X-100-permeabilizált sejtek RNáz A és DNáz I kezelésének hatására egyaránt eltűnt a nukleoláris PI4K230 immunreaktivitás. Mivel dot-blot kísérletekben az expresszált PI4K230 asszociációját a vizsgált sejtekből izolált DNS-sel és RNS-sel nem tudtuk kimutatni, feltételezzük, hogy több molekulából álló asszociátum bomlik meg a fenti kezelések során, amelynek épsége a nukleoláris RNS és rDNS.intaktségéhez kötött.

4. PI4K230 specifikus siRNS kezelésből levonható következtetések

Az siRNS hatékonyságát mutatja, hogy 24 órás kezelés után csökkent a COS-7 sejtekben a PI4K230 mRNS szintje (13. ábra). A sejtek három napi kezelése után jól észlelhetően lecsökkent a citoplazmatikus és nukleoláris immunreaktív PI4K230 fehérje mennyisége. A két kompartment enzimszintjének csökkenése a bennük lévő enzim genetikai azonosságát igazolja és egyben megerősíti az immundetektálás specifikusságát. Az siRNS kezelés egyik feltűnő következménye volt a kezelt sejtek pusztulása és fedőlemezről történő leválása (ennek alapján a megmaradt sejtek feltehetően a kevésbé károsodottak közé tartoztak). Ez a jelenség megnehezítette az immuncitokémiai vizsgálatot, másrészt viszont fényes bizonyítéka ezen izoforma vitális fontosságának. Az siRNS-sel kezelt sejtek nukleoplazmájában megjelenő megnövekedett immunreaktivitás a nukleoluszból kidiffundáló és/vagy a citoplazmából beáramló enzimből származik, sőt lehetséges, hogy éppen a károsodott sejtek apoptotikus folyamataiban játszik valamilyen szerepet.

6. A PI4K230 deléciós mutánsainak szubcelluláris lokalizációja

A PI4K230 szerkezeti jellegzetessége gazdag doménszerkezete, amely sokféle fehérje-fehérje, fehérje-lipid és fehérje-nukleinsav kölcsönhatást tesz lehetővé. A PI4K230-ban feltételezett NLS-ek helyzete alapján azt vártuk, hogy az NLS-t nem tartalmazó deléciós mutánsok (16. ábra) a PI4K Δ 56 és PI4K Δ 68 GFP-fúziós származékai nem tudnak a sejtmagba bejutni a tranziensen transzfektált COS-7 sejtekben. Annak alapján, hogy a

PI4K Δ 97 már rendelkezik a bipartit NLS2-vel, a PI4K Δ 130 pedig az NLS1 és NLS2-vel is, ezek nukleáris transzlokációjából kívántunk az NLS-ek szerepéről felvilágosítást nyerni. A transzfekció kismértékű, néhány %-os hatékonysága miatt jól értékelhető megfigyelést nem tudtunk tenni, de néhány esetben a PI4K Δ 130 nukleoláris megjelenését figyeltük meg. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy a két NLS együtt lehet hatékony, esetleg a köztük lévő peptidszakasz, vagy a nativhoz jobban hasonlító szerkezet játszhat szerepet a nukleáris transzportban és a nukleoluszbba történő irányításban. Az expresszált PI4K230 holoenzim viszont a nukleo-citoplazmatikus körforgalomra utaló feldúsulást mutatott néhány leptomycin B-vel (LMB) kezelt transzfektált sejt nukleoplazmájában. Az LMB hatása azon alapszik, hogy a CRM1/exportin1 kritikus Cys-jéhez kovalensen kötődve gátolja a magból kifelé irányuló exportot (Kudo és mtsai., 1999). A deléciós mutánsok és főleg az expresszált holoenzim jól észlelhető nukleáris/nukleoláris transzportjának hiányát okozhatja, hogy a nukleoluszbba a PI4K230 igen stabil nukleo-proteo-lipid komplexekben lehet jelen, amelyben az egyes komponensek kicserélődésére kicsi a lehetőség. A sejtmagi transzlokációra végül is a permeabilizált sejteken végzett transzport kísérletek szolgáltatottak jól értékelhető adatokat.

Az egyes deléciós mutánsok citoplazmatikus megjelenése a transzfektált COS-7 sejtekben eltérő volt. Ebből arra következtethetünk, hogy doménjeik befolyásolhatják a citoplazmatikus kompartmentekkel (ER, Golgi) való asszociációt. A kölcsönható domének és a mechanizmus pontosabb ismerete nélkül azt a következtetést tudtuk levonni, hogy a deléciónak növelésével az expresszált GFP-fúziós mutánsok a sejteket a perifériáig kitöltőtől a perinukleáris régió felé koncentráálódtak (16. ábra).

6. A PI4K230-ban feltételezett NLS szekvenciák asszociációja importinokkal

A PI4K230-ban feltételezett monopartit NLS (NLS1) nagy hasonlóságot mutat a monopartit NLS-ek prototípusaként számontartott SV40 T-antigén NLS-ével. A feltételezett bipartit NLS2 aminosav sorrendje viszont a nukleoplazmin NLS szekvenciájához hasonlít (18. táblázat). A klasszikus NLS-ekkel irányított nukleáris transzport importin α/β heterodimerek közvetítésével történik. Ilyenkor az importin α adaptorként szerepel, míg az importin β a magpórus komplexekkel (NPC) asszociálódik (dokkolódik), először az NPC citoplazmatikus filamentumjai, majd a centrális csatorna citoplazmatikus bejáratánál (Panté és Aebi, 1996), végül végrehajtja a cargo transzlokációját facilitált diffúzióval. Az importin α importin β -kötő doménje (IBB) az NLS szerkezeti analógja, ennek révén autoinhibitor funkcióval rendelkezik: visszahajolva az NLS-kötőhelyre gátolja az NLS kötődését (Harreman és mtsai., 2003). Emiatt csak importin β -hoz kötött állapotban jöhet létre erős kapcsolat az importin α és a cNLS között. Az importin α/β -szállítandó fehérje asszociáció

kialakulása többféle módon is mérhető: az NLS-hez fúzionált GFP fluoreszcencia depolarizációjával (Fanara és mtsai., 2000), ELISA módszerrel, vagy az importin α asszociójának dot-blottal történő kimutatásával. Hübner és mtsai. (1997) munkája alapján a dot-blot kísérleteket választottuk. Kísérleteinkben fontos volt, hogy a nitrocellulóz membránon kötött NLS-fehérjékhez asszociálódó importinok kötődését az expresszált importinok N-terminálisán lévő GST vagy poli-His jelölésével mutassuk ki, mivel ezeket nem befolyásolta az importin α/β heterodimer képződése. Dot-blot kísérleteink szerint az importin α kötődését az NLS1- és NLS2-Alexa488BSA-hoz az importin β jelenléte egyaránt fokozta, vagyis a cNLS-ekre jellemző importin α/β - NLS-fehérje komplex jött létre. Ennek alapján mind az NLS1, mind az NLS2 közreműködhet a magi transzportban. A dot-blot kísérletek azt is igazolták, hogy az NLS nélküli és a mutáns NLS-t hordozó Alexa488BSA nem asszociál sem a monomer importinokkal sem az α/β heterodimerekkel.

7. A nukleáris transzlokáció vizsgálata import kísérletekben

Modell kísérleteinkben a feltételezett NLS-ek szekvenciájával azonos (Alexa488BSA-hoz vagy Alexa488trp.inh.-hoz kapcsolt) szintetikus peptidek nukleáris/nukleoláris transzportját vizsgáltuk. Eredményeink kísérletes bizonyítékokkal szolgálnak a PI4K230 monopartit bázikus szakaszának szerepéről a sejtmag-transzportban és a feltételezett bipartit NLS sejtmagba/magvacskába irányító funkciójáról.

A szintetikus NLS1-Alexa488BSA retikulocita lizátumos, illetve importin $\alpha1/\beta$ és $\alpha3/\beta$ expresszált transzport faktorokat tartalmazó import rendszerben, Ran-függő módon, hatékonyan transzportálódott a sejtmagba. A sejtmag-transzport összetett folyamat, jelenti a szállítandó fehérje-importin kölcsönhatás létrejöttét a citoplazmában, a komplex dokkolódását az NPC-n, importin β -által közvetített átjutást a póruson, a komplex Ran-GTP függő disszociációját a sejtmagban, az importin molekula CAS-Ran-GTP kötött exportját a magból és az önálló importin felszabadulását. Lektin vagy GTP γ S csak a póruson való transzlokációt gátolja, ezáltal perinukleáris akkumulációt eredményez. Így a normál import kísérletek során a maghártya körül megjelenő intenzív fluoreszcens jel azt is jelentheti, hogy az importin-fehérje komplex dokkolódott a maghártyán de a további lépések nem következtek be. Feltételezhetően ez történt az NLS2-Alexa488BSA fehérje esetében is, melynek importin α/β dimerekkel való kapcsolódási készségét a dot blot kísérletek is igazolják. Ezt a feltevést támasztja alá az is, hogy a kontroll Alexa488BSA, illetve NLS2mut- vagy NLS3- konjugált formái esetében sokkal gyengébb perinukleáris fluoreszcencia tapasztalható, ami kisfokú aspecifikus kötődésnek tekinthető. Nem tisztázott azonban, hogy az NLS2-Alexa488BSA transzportja során az import folyamat dokkolódást követő fázisai miért nem mentek végbe.

A PI4K230 NLS3-ként jelölt szekvenciájáról bebizonyosodott, hogy nem rendelkezik NLS aktivitással: retikulocita lizátumos import rendszerben nem képes az Alexa488BSA-t sejtmagba juttatni és dot blot kísérletekben egyetlen importinnal sem asszociál. A PI4K230 NLS-ek és az importin $\alpha 5$ között valószínűleg azért nem jött létre kölcsönhatás, mert az importin $\alpha 5$ hajlamosabb szelektív asszociációra pl. STAT dimerekkel (Melen és mtsai., 2003) és virális proteinekkel (Kitamura és mtsai., 2006).

8. Az NLS-ek importin α -hoz való kötődésének molekuláris modellezése

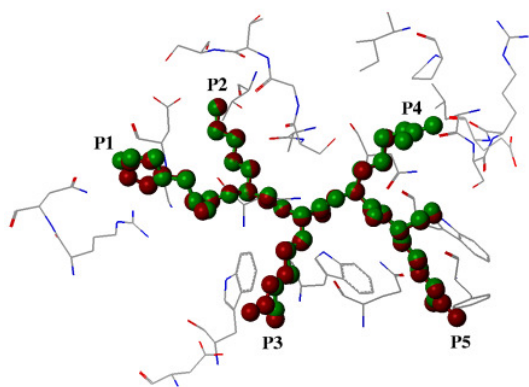
Az NLS2 transzportjában tapasztalt ellentmondások arra ösztönöztek bennünket, hogy megvizsgáljuk, a PI4K230 NLS-ei mennyire felelnek meg az importin α -hoz való kötődés szerkezeti feltételeinek. A PI4K230 NLS-ek importin alfával képzett komplexeinek modellezéséhez az SV40 monopartit NLS-e (Fontes és mtsai., 2000), a nukleoplazmin bipartit NLS-e (Fontes és mtsai., 2000) és a foszfolipid szkrambláz nem klasszikus NLS-e (Chen és mtsai., 2005) szolgált mintaként.

Az importin α röntgenkrisztallográfiás vizsgálatával egy major és egy minor NLS kötőhelyet állapítottak meg (Conti és mtsai., 1998), melyek magukba foglalják a 2-4 illetve a 7-8/9 armadillo ismétlődéseket (Goldfarb és mtsai., 2004). A 28. ábra „A” részén látható molekulamodellezés eredménye szerint a PI4K230 NLS1 szekvenciája jól illeszkedik az importin α major kötőhelyére, melyről azt tartják, hogy a monopartit NLS-ek fiziológias megkötéséért felelős (Conti és mtsai., 1998).

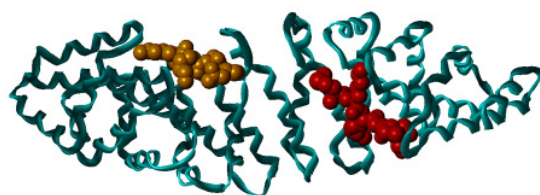
Szekvenciahomológia vizsgálatok szerint a PI4K230 NLS2 szekvenciája jól illeszthető a bipartit NLS-eknél meghatározott konszenzus szekvenciákhoz: $KRX_{10-12}-KRX_{10-12}$ (Fontes és mtsai., 2003) vagy $(K/R)_2X_{10-12}(K/R)_3$ (Fontes és mtsai., 2000). Krisztallográfiái megfigyelések és kísérleti adatok hangsúlyozzák azon bázikus aminosavak kiemelkedő jelentőségét, melyek a minor kötőhelyhez P1' és P2' pozícióban, illetve a major kötőhelyhez P2, P4 és P5 pozícióban (Fontes és mtsai., 2003) illeszkednek. A PI4K230 NLS2 szekvenciájában a P1'-P2' és P2-P4 pozíciójú bázikus klaszterek illeszkednek a mintaként szolgáló nukleoplazmin bázikus szekvenciáira, következésképpen megfelelnek az importin α -hoz való kötődés feltételeinek (28. ábra B). Szekvencia szinten megjelenik azonban egy nagy különbség: a PI4K230 NLS2-ben nem bázikus aminosav van P5 pozícióban. Az importin α – nukleoplazmin együttkristályosításával nyert molekulaszervezet elemzése szerint viszont a P5 helyzetű lizin oldalláncai nem lépnek kapcsolatba az importin α -val (Fontes és mtsai., 2000). Más kísérletekben kimutatták, hogy az SV40 NLS akkor is megőrzi NLS aktivitását, ha a C-terminális lizinjét, treoninra cserélik (Kalderon és mtsai., 1984).

A bipartit NLS-ek legvariábilisabb része a bázikus klaszterek közötti összekötő szakasz, azonban kriszallográfiával ezen a területen is kimutattak a receptorral specifikus kölcsönhatást létrehozó aminosavakat (Fontes és mtsai., 2003). Az NS1A (Melen és mtsai., 2007) és Nop25 (Fujiwara és mtsai., 2006) fehérjék bipartit NLS-ének összekötő szakaszában szintén találtak a kötődésben fontos bázikus aminosavakat. Valójában valamennyi általunk vizsgált NLS -köztük a PI4K230 NLS2- összekötő régiójában van kázikus szekvencia (18. ábra).

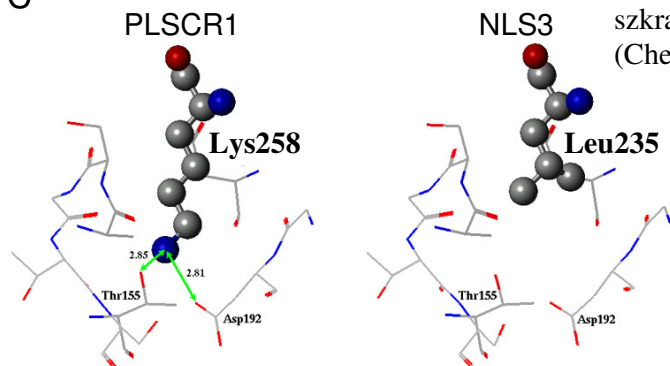
A



B



C



28. ábra: A PI4K230 NLS-ek és az importin α kapcsolatának homológ modellezése

A: A PI4K230 NLS1 – importin α kötődésének modellje (piros) rávetítve az importin α (Δ 1-69) – SV40 NLS (zöld) együttes kristályosításával megállapított molekulaszervezetre (Fontes és mtsai., 2000), PDB kód: 1EJL. NLS peptidek megjelenítése: gömb-pálcika modellként.

B: A PI4K230 NLS2 – importin α kötődésének modellje. Az importin α szalag szerkezetében a major és minor kötőhelyekre bekötődő peptidek helykitöltő megjelenítése (narancs és piros).

C: A PI4K230 NLS3 P2 kötőhelyének összehasonlítása az importin alfával (Δ 1-69) kölcsönhatásban lévő foszfolipid szkrambláz ncNLS-ének azonos helyével (Chen és mtsai., 2003)

A fehérje oldalláncok megjelenítése: gömb-pálcika modellként. A H-kötések kialakulásához megfelelő távolságokat zöld nyilak jelzik, a számok Angströmben értendők.

Bár a szintetikus, Alexa488BSA-hoz kapcsolt NLS2 peptid import kísérleteinkben nem transzportálódott a sejtmagba, a molekulamodellzés szerinti strukturális hasonlóság, a transzport szempontjából kritikus bázikus aminosavak egyezése és a dot blot asszociációs eredmények egyaránt az NLS2 sejtmagi transzportjának lehetőségére utalnak. Noha Xiao és mtsai. (2003) javaslata szerint a távolabbi aminosavak is hatást gyakorolhatnak az importra,

egy hosszabb, szintetikus, Alexa488BSA-hoz kapcsolt NLS2 peptid (¹⁴⁰⁵STISKKSGMSKKTNR-GSQLHKYYMKRRTL¹⁴³³) transzportját vizsgálva sem tapasztaltunk magi feldúsulást. Másrészt viszont, egy jóval hosszabb expresszált peptid (expr.NLS2) mely a PI4K230 1166-1667 aminosavnyi szakaszát tartalmazta akadály nélkül bejutott a sejtmagba és azon belül a nukleoluszban dúsult fel. Mindez azt sugallja, hogy további strukturális elemek jelenléte szükséges a sikeres sejtmag/magvacskába transzportozáshoz. A jelenség egyik magyarázata lehet hidrofób oldalláncok jelenléte az összekötő szakaszban, melyek a hatékonyságot csökkentik (Robbins és mtsai., 1991). Az NLS2 esetében elképzelhető, hogy ezen aminosavak kedvezőtlen hatása kompenzálódik a nagyméretű expr.NLS2 megfelelő térbeli elrendeződésekor.

A PI4K230 NLS3 – importin α kölcsönhatásának molekulamodelljéhez a foszfolipid szkrambláz 1- importin α kristályszerkezetével nyert adatok szolgáltak mintaként (Chen és mtsai., 2005). Ezek szerint a szkrambláz ²⁵⁷GKISKH²⁶² szekvenciája az importin α major kötőhelyéhez kapcsolódik és részlegesen illeszthető a PI4K230 ⁹³⁴GLVDFK⁹³⁹ szekvenciájára. A legnagyobb különbség a döntő P2 pozícióban van ahol az NLS3 hidrofób leucinjához képest a szkramblázban pozitív töltésű lizin található (28. ábra). Bár a szkrambláz ezen lizinjének alaninra mutálása nem szünteti meg teljesen a nukleáris lokalizációt (Chen és mtsai., 2005), a mi esetünkben azonban nem csak ez a K258L hanem a H262F csere és egy inzert szakasz jelenléte a GLVDFK és WTGI szekvenciák között együttesen okozhatja az importin α/β komplexhez való kötődés hiányát.

9. Az NLS2 sejtmagvacskába irányító hatása

Az NLS2 sejtmagvacskába irányító funkcióját transzport kísérletekben vizsgáltuk, melyben tripszin inhibítorhoz vagy NLS1-Alexa488BSA-hoz kapcsolt peptidek (teljes NLS2 ill. fragmentjei) mozgását követtük. Az NLS2 C-terminális fele az angiogenin NTS-sel nagyfokú homológiát mutat, a transzport szempontjából viszont nem bizonyult meghatározónak. Valójában az NLS2 mindkét fragmentje transzportálódott a magvacskába de kisebb hatékonysággal, mint a teljes NLS2, azonban az expr.NLS2 nukleoláris megjelenése volt a legkifejezettebb. Itt is felvetődik a környező szekvenciák és a megfelelő térszerkezet jelentősége, amelyek nemcsak a sejtmagi, hanem a nukleoláris transzport szempontjából is fontosak lehetnek. Mindez összhangban van az irodalmi adatokkal, melyek szerint a bázikus aminosavak számának növelése a bipartit NLS-ben vagy környezetében, elősegíti a nukleoláris transzportot, bár néha ezek sem bizonyulnak elégségesnek a nukleoláris transzlokáció létrehozásához (Russo és mtsai., 1997; Melen és mtsai., 2007).

10. PI4K230 szerepe a sejtmagban és nukleoluszban

A magi PI4K230 elsődleges funkciója valószínűleg, hogy a PtdIns (4)P termelésével prekursorat szolgáltat a PtdIns (4,5)P₂ képzéséhez (Gonzales és Anderson, 2006). A különböző térbeli lokalizációjú PI4-kinázok közreműködésével kompartmentalizált PtdIns (4)P bioszintézis valósulhat meg, melynek foszforilálásával még jobban elkülönült PtdIns (4,5)P₂ pool-ok képződhetnek. Így jöhet létre a magon belül az a több különálló foszfoinozitid ciklus, melyek lipid termékei -a célfehérjék foszfoinozitid kötő doménen/motívumon keresztüli toborzásával- más-más folyamatokra gyakorolhatnak szabályozó hatást.

A sejtmagvacska DNS/RNS komponenseivel asszociációban lévő PI4K230 a fentiekhez hasonló módon specifikus funkciók prekursoraként szolgáló PtdIns (4)P-t termel. Osborne és mtsai. (2001) a PtdIns (4,5)P₂ jelenlétét túlnyomórészt a magvacska fibrilláris központjában és a denz fibrilláris komponensben mutatták ki. Mivel a PI4K230 jelenléte elsősorban a denz fibrilláris komponensre tehető (9. ábra), kézenfekvő a szerepe a prekursor PtdIns (4P) termelésében. Bár a PI4K230 és foszfoinozitid termékeinek nukleoláris szerepe ezidáig feltáratlan maradt, azonban az ismert sejtmagi funkciók alapján jelentőségére több lehetőség is felmerül:

- Zhao és mtsai.(1998) kimutatták, hogy a PtdIns (4,5)P₂ részt vesz a kromatinszerkezet megváltoztatásában, kötődésével ugyanis fokozza a kromatin remodelling BAF komplex működését. Ehhez hasonlóan elképzelhető, hogy a nukleoláris foszfoinozitidek szerepet játszanak az rDNS eukromatikus állapotban való tartásában.
- A foszfoinozitidek, elsősorban a PtdIns (4,5)P₂, RNS polimeráz II-höz, valamint a H1 és H3 hisztonhoz kötődve a transzkripció indukálására képesek (Yu és mtsai., 1998; Osborne és mtsai., 2001). Az rDNS transzkripciójának folyamatos indukciója a hisztonok gátló hatásának „kivédésével” a nukleoláris foszfoinozitideknek egy másik funkciója lehetne, mely esetleg (az előzőek mintájára) az RNS polimeráz I aktivációval is kiegészülhet.
- A nukleáris speckle-ekben lévő PtdIns (4,5)P₂ reguláló és/vagy szerkezetstabilizáló szereppel bír az mRNS érési folyamataiban (Osborne és mtsai., 2001). Az rRNS-ek korai érése a denz fibrilláris komponensben, késői érése a granuláris komponensben történik. Saját kolokalizációs vizsgálati eredményeink szerint a PI4K230 a nukleolusz ezen területein található. Felmerül tehát annak a lehetősége is, hogy a foszfolipidek a rRNS érése során jutnak fontos szerephez.

A PI4K230 és lipidtermékeinek a felsorolt folyamatok bármelyikében való részvétele megmagyarázná az összefüggést a neuronális sejtek intenzív riboszóma-biogenezise és a nagymértékű neuronális PI4K230 expresszió között.

-Furuta és mtsai. (2003) szerint a PI4K230 apoptotikus, illetve stressz-adaptációs szignálút vonal részese lehet, hiszen ischemia reperfúzió után a hippocampus neuronok számos vizsgált fehérjéje közül a PI4K230 expressziós szintjében valamint a PtdIns (4,5)P₂ mennyiségében tapasztaltak drasztikus csökkenést. A PI4K230 túltermeltetésével a hipoxia egyes hatásai kivédhetőek voltak. Más eredmények a PI4P (PI5P) mennyiségének jelentős növekedéséről számoltak be ultrabolya sugárzás és oxidatív károsodást követően.

Ezen tények és a nukleoláris lokalizáció közötti párhuzam elég kézenfekvő, hiszen a sejtmagvacskáról ismert, hogy integritásának változásán keresztül mint stressz szenzor funkcionál. Számos tumor szupresszor és protoonkogén a riboszómaképződés szintjén hat (Ruggero és Pandolfi, 2003). A riboszóma képzés csökkenése apoptózist indukál p53-függő és -független úton (David-Pfeuty és mtsai., 2001; Pestov és mtsai., 2001), a nukleolusz sérülése pedig p53 stabilizációt eredményez (Rubi és Milner, 2003). Ha feltételezzük a PI4K230 részvételét a folyamatban, akkor máris felmerül potenciális effektorként az ING2 (inhibitor of growth protein 2). Az ING2 kromatin asszociált fehérje, melynek PHD ujjáról igazolták, hogy monofoszfoinozitideket köt, melyek aktivációjához szükségesek: tumor szupresszor, növekedés megállást és apoptózist indukál p53-függő úton (Jones és Divecha, 2004; Gozani és mtsai., 2003).

A PI4K230 pontos nukleoláris funkciójának megismerése további izgalmas kísérletek tárgya lehet. Fontos azonban megemlíteni, hogy a PI4K230 akkor is jelen lehet a nukleoluszban ha nem rendelhető hozzá egyértelmű nukleoláris funkció, hiszen a magvacskában nagy számban raktározódnak olyan proteinek, amelyek részt vesznek az apoptózisban, sejtciklusban, sejtosztódásban (Cockell és Gasser, 1999; Visintin és Amon, 2000).

6. Összefoglalás

A PI4K230 sejtmagi jelenlétét bizonyító, továbbá a magi fehérje kölcsönható partnereit vizsgáló és sejtmagi, illetve magvacskába történő transzportjának megismerését célzó kísérletes munkánk eredményei az alábbiakban foglalhatók össze:

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 inhibitorhoz kapcsolva, mely akadálytalanul halad át az NPC-n, annak nukleoláris feldúsulását okozza. Ebben a tekintetben a teljes NLS2 hatékonyabb nukleoláris akkumulációt eredményez, mint fragmentjei.

Summary

We set as an aim to investigate the possible nuclear occurrence of PI4K230, to find its interaction partners, and to uncover molecular mechanisms by which nuclear and nucleolar transport of PI4K230 occurs. Our results are summarized as follows:

The presence of PI4K230 in the nucleoli of ethanol fixed neuronal and non-neuronal cells with indirect immunofluorescence using antibodies to four of its distinct epitopes. Based on our colocalisation results, nucleolar PI4K230 exhibits prominent staining in dense fibrillar components.

PFA treatment had no effect on immunoreactivity of PI4K230 in cell lysate or immunoblot but masked reversibly the immunoreactive epitopes of PI4K230 in the nucleolus by crosslinking PI4K230 with tightly associated nucleolar components.

In experiments with siRNA interfering with the expression of PI4K230, elimination of PI4K230 immunoreactivity from the cytoplasm and nucleoli was observed, while the remaining PI4K230 accumulated in the nucleus.

The PI4K230 exists in detergent-resistant proteolipid complexes of the nucleolus interacting with nucleolar DNA and/or RNA, either directly or through associated nucleic acid-bound constituents.

Though recombinant PI4K230 expressed in COS-7 cells does not accumulate in the nucleolus even after 2 days but in transport assays PI4K230 expressed in Sf9 cells enriches in the nucleoplasm of digitonin permeabilized HeLa cells.

Nuclear import directed by the monopartite NLS (NLS1) of PI4K230 is a WGA-sensitive and energy-dependent process mediated by importin $\alpha 1/\beta$ and importin $\alpha 3/\beta$ complexes that interact directly with NLS1.

An expressed 506 amino acid fragment of PI4K230 containing its bipartite NLS is effectively transported to the nucleolus with importin $\alpha 1/\beta$ and importin $\alpha 3/\beta$ heterodimers in a WGA-sensitive and energy-dependent manner. Although the bipartite NLS sequence (NLS2) itself linked to BSA does not translocate to the nucleus, but when linked to trypsin inhibitor that small enough to pass freely the NPC it directs the cargo to the nucleolus. In this capacity, the complete NLS2 is more potent than either of its two fragments.

7. Irodalomjegyzék

1. Adam S. A., Marr R. S., Gerace L. (1990): Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J. Cell Biol.* 111:807-816.
2. Arcaro A., Wymann M. P. (1993): Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem. J.* 296: 297-301
3. Arneson L. S., Kunz J., Andarson R. A., Traub L. M. (1999): Coupled inositide phosphorylation and phospholipase D activation initiates clathrin coat assembly on lysosomes. *J. Biol. Chem.* 274: 17794-17805
4. Asano M., Tamiya-Koizumi K., Homma Y., Takenawa T., Nimura Y., Kojima K. Yoshida S. (1994): Purification and characterization of nuclear specific phospholipase C for phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 269: 12360-12366.
5. Audhya A., Emr S. D. (2002): Stt4 PI 4-kinase localizes to plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP kinase cascade. *Dev. Cell.* 13: 593-605
6. Backstrom J. R., Sanders-Bush E. (1997): Generation of anti-peptide antibodies against serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *J. Neurosci. Methods* 7;77: 109-117
7. Bagdi E., Krenacs L., Krenacs T., Miller K., Isaacson P. G. (2001): Follicular dendritic cells in reactive and neoplastic lymphoid tissues: a reevaluation of staining patterns of CD21, CD23 and CD35 antibodies in paraffin sections after wet heat-induced epitope retrieval. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 9(2): 117-124
8. Bakno L., Peng X. R., Schreiber A. D., Moore H. P., Trimble W. S., Grinstein S. (2000): Focal-exocytosis of VAMP3-containing vesicles of phagosome formation. *J. Cell Biol.* 149: 697-706
9. Balboa M. A., Insel P. A. (1995): Nuclear phospholipase D in Madin-Darby canine kidney cells. Guanosine 5'-O-(thiotriphosphate)-stimulation is mediated by RhoA and is downstream of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 270: 2881-2884.
10. Balla A., Vereb Gy., Gülkan H., Gehrman T., Gergely P., Heilmeyer L. M. G., Antal M. (2000): Immunohistochemical localisation of two phosphatidylinositol 4-kinase isoforms, PI4K230 and PI4K92, in the central nervous system of rat. *Exp. Brain Res.* 134: 279-288
11. Balla A., Tuymetova G., Barshishat M., Geiszt M., Balla T. (2002): Characterization of type II phosphatidylinositol 4-kinase isoforms reveal association of enzymes with endosomal vesicular compartment. *J. Biol. Chem.* 277: 20041-20050
12. Balla A., Tuymetova G., Tsiomenko A., Varnai P., Balla T. (2005): A plasma membrane pool of phosphatidylinositol4-phosphate is generated by phosphatidylinositol 4-kinase type-III alpha: studies with the PH domain of the oxysterol binding domain and FAPP1. *Mol Biol. Cell* 16: 1282-1295
13. Balla T. (1998): Phosphatidylinositol 4-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1436:69-85
14. Balla T. (2001): Pharmacology of phosphoinositides, regulators of multiple cellular functions. *Curr. Pharm. Des.* 7: 475-507
15. Balla T., Downing G. J., Jaffe H., Kim S., Zolyomi A., Catt K. J. (1997): Isolation and molecular cloning of wortmannin-sensitive bovine type III phosphatidylinositol 4-kinases. *J. Biol. Chem.* 272: 18358-18366
16. Barylko B., Gerber S. H., Binns D. D., Grichine N., Khvotchev M., Sudhof T. C., Albanesi J. P. (2001): A novel family of phosphatidylinositol 4-kinases conserved from yeast to human. *J. Biol. Chem.* 276: 7705-7708

17. Ben-Efraim I., Zhou Q., Wiedmer T., Gerace L., Sims P. J. (2004): Phospholipid scramblase 1 imported into the nucleus by the receptor mediated pathway and interacts with DNA. *Biochemistry* 43: 3518-3526
18. Berditchevski F., Tolias K. F., Wong K., Carpenter C. L., Hamler M. E. (1997): A novel link between integrins, transmembrane 4 superfamily proteins (CD63 and CD81) and phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Biol. Chem.* 272:2595-2595
19. Berridge M. J. (1984): Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J.* 220: 345-360
20. Berridge M. J., Irvine R. F. (1984): Inositol triphosphate a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321
21. Boronenkov I. V., Anderson R.A. (1995): The sequence of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase defines a novel family of lipid kinases. *J. Biol.Chem.* 265: 18012-180
22. Boronenkov I. V., Loijens J. C., Umeda M., Anderson, R.A. (1998): Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol. Biol. Cell* 9: 3547-3560
23. Carpenter C. L., Cantley L. C. (1990): Phosphoinositide kinases. *Biochemistry* 29: 11147-11156
24. Carpenter C. L., Cantley L. C. (1996): Phosphatidylinositol 3-kinase and regulation of cell growth. *Biochim. Biophys. Acta* 1288: M11-M16
25. Castellino A. M., Parker G. J., Boronenkov I. V., Anderson R.A., Chao, M. V. (1997): A novel interaction between the juxtamembrane region of the p55 tumor necrosis factor receptor and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J. Biol. Chem.* 272: 5861-5870
26. Chen M. H., Ben-Efraim I., Mitrousis G., Walker-Kopp N., Sims P. J., Cingolani G. (2005): Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin alpha. *J. Biol. Chem.* 280: 10599-606
27. Chong L. D., Traynor-Kaplan A., Bokoch G. M., Schwartz M. A. (1994): The small GTP binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 79: 507-513
28. Chuang H. H., Prescott E. D., Kong H., Shields S., Julius D. (2001): Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns (4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 411: 957-962
29. Ciruela A., Hinchliffe K. A., Divecha N., Irvine R. F. (2000): Nuclear targeting of the beta isoform of type II phosphatidylinositol phosphate kinase (phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase) by its alpha-helix 7 *Biochem. J.* 346: 587-591
30. Clarke J. H., Letcher A. J., D'Santos C. S., Halstead J. R., Irvine R. F., Divecha N. (2001): Inositol lipids are regulated during cell cycle progression in the nuclei of murine erythroleukaemia cells. *Biochem. J.* 375: 905-910
31. Cocco L., Gilmour R. S., Ognibene A., Letcher A., Manzoli F. A., Irvine, R.F. (1987): Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence of polyphosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem. J.* 248: 765-770.
32. Cockell M. M., Gasser S. M. (1999): The nucleolus: nucleolar space for rent. *Curr. Biol.* 9: R575-R576
33. Cockroft S. (1998): Phosphatidylinositol transfer proteins: a requirement in signal transduction and vesicle traffic. *Bioassay* 20: 423-432.
34. Cockroft S., Taylor J. A., Judah J. D. (1985): Subcellular location of phosphatidylinositol 4-kinase isoforms. *Biochim. Biophys. Acta* 845: 163-170
35. Collins C. A., Wells W. W. (1983): Identification of phosphatidylinositol 4-kinase in rat liver lysosomal membranes. *J.Biol. Chem.* 285: 473-479

36. Conti E., Uy M., Leighton L., Blobel G., Kuriyan J. (1998): Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* 94: 193-204
37. Cote J. F., Motoyama A. B., Bush J. A., Vuori K. (2005): A novel and evolutionary conserved PtdIns(3,4,5)P₃ binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nat. Cell Biol.* 7: 797-807
38. Creancier L., Prats H., Zanibellato C., Amalric F., Bugler B. (1993): Determination of the functional domains involved in nucleolar targeting of nucleolin. *Mol. Biol. Cell* 4: 1239-1250
39. Cremona O., De Camilli P. (2001): Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J. Cell Sci.* 114: 1041-1052
40. Das A., Park J. H., Hagen C. B., Parsons M. (1998): Distinct domains of a nucleolar protein mediate protein kinase binding, interaction with nucleic acids and nucleolar localization. *J. Cell Sci.* 111: 2615-2623
41. David-Pfeuty T., Nouvian-Doooghe Y., Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D. (2001): Common and reversible regulation of wild-type p53 function and of ribosomal biogenesis by protein kinases in human cells. *Oncogene* 20: 5951-5963
42. De Camilli P., Emr S. D., McPherson P. S., Novick P., (1996): Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* 271: 1533-1539
43. De Camilli P., Chen H., Hyman J., Panepucci E., Bateman A., Brunger A. T. (2002): The ENTH domain. *FEBS Lett.* 513: 11-18
44. De Graaf P., Klapisz E. E., Schulz T. K., Cremers A. F., Verkley A. J., Van Bergen en Henegouwen P. M. (2002): Nuclear localization of phosphatidylinositol 4-kinase beta. *J. Cell Sci.* 115: 1769-1775
45. De Graaf P., Zwart W. T., Van Dijken R. A. J., Deneka M., Schulz T. K. F., Geijssen N., Coffey P. J., Gadella B. M., Verkley A. J., Van Der Sluijs P., Van Bergen en Henegouwen P. M. (2004): Phosphatidylinositol 4-kinase β is critical for functional association of rab11 with the Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* 15: 2038-2047
46. De Matteis M. A., Di Campli A., Godi, A. (2005): The role of the phosphoinositides at the Golgi complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1744: 396-405.
47. De Vries K. J., Westerman J., Bastiaens P. I., Jovin T. M., Wirtz K. W., Snoek G. T. (1996): Fluorescently labeled phosphatidylinositol transfer protein isoforms (alpha and beta), microinjected into foetal bovine heart endothelial cells, are targeted into distinct intracellular sites. *Exp. Cell Res.* 227: 33-39.
48. Dingwall C., Sharnick S. V., Laskey R. A. (1982): A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* 30: 8449-458
49. Divecha N., Banfic H., Irvine, R. F. (1991): The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *EMBO J.* 10: 3207-3214.
50. Divecha N., Banfic H., Irvine, R. F. (1993): Inositides and the nucleus and inositides in the nucleus. *Cell* 74: 405-407.
51. Divecha N., Truong O., Hsuan J. J., Hinchliffe K. A., Irvine R. F. (1995): The cloning and sequence of the C isoform PtdIns4P 5-kinase. *Biochem. J.* 309: 715-719.
52. Divecha N., Letcher A. J., Banfic H. H., Rheese S. G., Irvine R. F. (1995): Changes in the nuclear inositide cycle during differentiation in murine erythroleukaemia cells. *Biochem J.* 312: 63-67
53. Divecha N., Banfic H., Treagus J. E., Vann L., Irvine R. F., D'Santos C. (1997): Nuclear diacylglycerol, the cell cycle, the enzymes and the red herring (or how we came to love phosphatidyl-choline). *Biochem. Soc. Trans.* 25: 571-575.

54. Divecha N., Roefs M., Los A., Halstead J., Bannister A., D'Santos C. (2002): Type I PIPkinases interact with and regulated by the retinoblastoma susceptibility gene product-pRB. *Curr. Biol.* 12: 582-587
55. Dowler S., Currie R. A., Campbell D. G., Deak M., Kular G., Downes C. P., Alessi D. R. (2000): Identification of pleckstrin-homology-domain containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities. *Biochem. J.* 351:19-31
56. D' Santos C. S., Clarke J. H., Divecha N. (1998): Phospholipid signalling in the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* 1436:201-232
57. Dynes J. L., Xu S., Bothner S., Lahti J. M., Hori R. T. (2004): The carboxyl-terminus directs TAF(I)48 to the nucleus and nucleolus and associates with multiple nuclear import receptors. *J. Biochem.* 135(3):429-38
58. Eberhard D. A., Cooper L. C., Low M. G., Holz R. W. (1990): Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis. Loss of inositol phospholipids and inhibition of secretion in permeabilized cells caused by bacterial phospholipase C and removal of ATP. *Biochem. J.* 26:15-25
59. Endemann G., Dunn S. N., Cantley L. C. (1987): Bovine brain contains two types of phosphatidylinositol kinase. *Biochemistry* 26: 6845-6852
60. Faenza I., Matteucci A., Bavelloni A., Marmiroli S., Martelli A. M., Gilmour R. S., Suh P. G., Manzoli L., Cocco L. (2002): Nuclear PLC β (1) acts as a negative regulator of p45/NF-E2 expression levels in Friend erythroleukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1589: 305-310
61. Fahrenkrog B., Stoffler D., Aepli U. (2001): Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 259: 95-117.
62. Fanara P., Hodel M. R., Corbett A. H., Hodel A. E. (2000): Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin α interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding. *J Biol Chem* 275: 21218-23
63. Fischer U., Huber J. Boelens W. C., Mattaj J. W., Lührmann R. (2001): The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82: 475-483
64. Flanagan C. A., Schnieders E. A., Emerick A. W., Kunisawa R., Admon A., Thorner J. (1993): Phosphatidylinositol 4-kinase: gene structure and requirement for yeast cell viability. *Science* 262: 1444-1448
65. Fontes M. R., Teh T., Kobe B. (2000): Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . *J. Mol. Biol.* 297: 1183-94
66. Fontes M. R., Teh T., Toth G., John A., Pavo I., Jans D. A., Kobe B. (2003): Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin- α . *Biochem. J.* 375: 339-49
67. Ford M. G., Mills I. G., Peter B. J., Vallis Y., Praefcke G. J., Evans P. R., McMahon H. T. (2002): Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419: 361-366
68. Forwood J. K., Lam H. M., Jans D. A. (2001): Nuclear import of Creb and AP-1 transcription factors requires importin- β 1 and Ran but is independent of importin α . *Biochemistry* 40: 5208-5217
69. Foster F. M., Traer C. J., Abraham S. M., Fry M. J. (2003): The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J. Cell Science* 116: 3037-3040
70. Fruman D. A., Meyers R. E. and Cantley L. C. (1998): Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 67: 481-507.
71. Fruman D. A., Rameh I. E., Cantley I. C. (1999): Phosphoinositide binding domains: embracing 3-phosphate. *Cell* 97: 817-820

72. Fujiwara T., Suzuki S., Kanno M., Sugiyama H., Takahashi H., Tanaka J. (2006): Mapping a nucleolar targeting sequence of an RNA binding nucleolar protein, Nop25. *Exp. Cell. Res.* 312: 1703-12
73. Furuta Y., Uehara T., Nomura Y. (2003): Correlation between delayed neuronal cell death and selective decrease in phosphatidylinositol 4-kinase expression in the CA1 subfield of the hippocampus after transient forebrain ischemia. *J. Cerebr. Blood F. Met.* 23: 962-971
74. Gaidarov I., Krupnick J. G., Flack J. R., Benovic J. L., Keen J. H. (1999): Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding. *EMBO J.* 18: 871-881
75. Gaulier J. M., Simonsen A., D'Arrigo A., Bremnes B., Stenmark H., Aasland R. (1998): FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* 394: 432-433
76. Gehrman T., Vereb G., Schmidt M., Klix D., Meyer H. E., Varsanyi M., Heilmeyer L. M. (1996): Identification of a 200 kDa polypeptide as type 3 phosphatidylinositol 4-kinase from bovine brain by partial protein and cDNA sequencing. *Biochim. Biophys. Acta* 1311:53-63
77. Gehrman T., Heilmeyer L. M. G. Jr (1998): Phosphatidylinositol 4-kinases. *Eur. J. Biochem.* 253: 357-370
78. Gehrman T., Gulkan H., Suer S., Herberg F. W., Balla A., Vereb G., Mayr G.W., Heilmeyer L.M.G., (1999): Functional expression and characterisation of a new human phosphatidylinositol 4-kinase PI4K230. *Biochim. Biophys. Acta.* 1437(3): 341-365
79. Godi A., Pertila P., Meyers R., Marra P., Di Tullio G., Iurisci C., Luini A., Corda D., De Mateis M. A. (1999): ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns (4,5)P₂ on the Golgi komplex. *Nat. Cell. Biol.* 1: 280-287
80. Goldfarb D. S., Corbett A. H., Mason D. A., Harreman M. T., Adam S. A. (2004): Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor. *TRENDS in Cell Biol.* 14: 506-514
81. Goldschmidt-Clermont P. S., Kim L. W., Machesky L. M., Rhee S. G., Pollard T. D., (1991): Regulation of phospholipase C_γ1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science* 250: 1231-1233
82. Gonzales M. L., Anderson R. A., (2006): Nuclear phosphoinositide kinases and inositol phospholipids. *J. Cell Biochem.* 97: 256-260
83. Gozani O., Karuan P., Jones D. R., Ivanov D., Cha J., Logovskoy A. A. (2003): The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 114: 99-111
84. Görlich D., Kutay U. (1999): Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 607-660
85. Görlich D., Mattaj I. W. (1996): Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271 (5255): 1513-1518.
86. Graziani A., Ling L. E., Endemann G., Carpenter C. L., Cantley C. L. (1992): Purification and characterization of human erythrocyte phosphatidylinositol 4-kinase. Phosphatidylinositol 4-kinase and phosphatidylinositol 3-monophosphate 4-kinase are distinct enzymes. *Biochem. J.* 284: 39-45
87. Gross S. D., Hoffman D. P., Fiseme P. L., Baas P., Anderson R. A. (1995): A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive casein kinase I α associates with synaptic vesicles and phosphorylates a subset of vesicle proteins. *J. Cell Biol.* 130: 711-724
88. Guo J., Wenk M. R., Pellegrini L., Onofri F., Benfenati F., Camilli P. (2003): Phosphatidylinositol 4-kinase typeII alpha is responsible for the phosphatidylinositol 4-kinase activity associated with synaptic vesicles. *PNAS* 100: 3995-4000

89. Han G. S., Audhya A., Markley D. J., Emr S. D., Carman G. M. (2002): The *Saccharomyces Cerevisiae* LSB6 gene encodes phosphatidylinositol 4-kinase activity. *J. Biol. Chem.* 277: 47709-47718
90. Hanakahi L. A., Bartlett-Jones M., Chappell C., Pappin D., West S. C. (2000): Binding of inositol phosphatase to DNA-PK and stimulation of double-strand DNA repair. *Cell* 102: 721-729
91. Harlan J. E., Hajduk P. J., Yoon H. S., Fesik S. W. (1994): Pleckstrin homology domain bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 371: 168-170
92. Harreman M. T., Hodel M. R., Fanara P., Hodel A. E., Corbett A. H. (2003): The auto-inhibitory function of importin α is essential in vivo. *JBC* 278: 5854-5863
93. Harreman M. T., Kline T. M., Milford H. G., Harben M. B., Hodel A. E., Corbett A. H. (2004): Regulation of nuclear import by phosphorylation adjacent to nuclear localization signals. *J. Biol. Chem.* 279: 20613-21
94. Hartwig J. H., Bokoch G., Carpenter C., Janmey P., Taylor L., Toker A., Stossel T. P. (1995): Thrombin receptor ligand and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 82: 1-20
95. Hausser A., Storz P., Märtens S., Link G., Toker A., Pfizenmaier K. (2005): Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase III β at the Golgi complex. *Nature Cell Biol.* 9: 880-6
96. Heist E. K., Srinivasan M., Schulman H. (1998): Phosphorylation at the nuclear localization signal of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II blocks its nuclear targeting. *J. Biol. Chem.* 273: 1963-19771
97. Hernandez-Verdun D. (2006): The nucleolus: a model for the organization of nuclear function. *Histochem. Cell. Biol.* 126: 135-148
98. Hinchliffe K. A., Ciruela A., Irvine R. F. (1998): PIPkins1, their substrates and their products: new function for old enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1436 (1-2): 87-104
99. Hokin M., Hokin L. (1953): Enzyme secretion and the incorporation of ³²P of pancreas slices. *J. Biomol. Chem.* 203: 967-977
100. Hopper A. K. (1999): Nucleocytoplasmic transport: Inside out regulation. *Curr. Biol.* 9: 803-806
101. Huang C. L., Feng S., Hilgemann D. W. (1998): Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* 391: 803-806
102. Hurley J. H., Meyer T. (2001): Subcellular targeting by membrane lipids. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 146-152
103. Husebye E. S., Flatmark T. (1988): Phosphatidylinositol kinase of bovine adrenal chromaffin granules: kinetic properties and inhibition by low concentration of Ca²⁺. *Biochim. Biophys. Acta* 968: 261-165
104. Hübner S., Xiao C. Y., Jans D.A. (1997): The protein kinase CK2 site (Ser111/112) enhances recognition of the simian virus 40 large T-antigen nuclear-localization sequence by importin. *J. Biol. Chem.* 272: 17191-17195.
105. Irvine R. (2003): Nuclear lipid signaling. *Nature reviews Molec. Cell Biol.* 4: 1-12.
106. Irvine R. F., Divecha N. (1992): Phospholipids in the nucleus - metabolism and possible functions. *Semin. Cell Biol.* 3: 225-35
107. Isenberg G., Goldman W. H. (1995): Actin-binding protein-lipid interaction, in the cytoskeleton. (Hesketh J E, Pryme I F) 1.pp. 169-204, Press London
108. Isenberg G., Niggli V. (1998): Interaction of cytoskeletal proteins with membrane lipids. *Int. Rev. Cytol.* 178: 73-125
109. Ishihara H., Shibasaki Y., Kizuki N., Wada T., Yazaki Y., Azano T., Oka Y. (1998): Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning the third isoform and

- deletion / substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *J. Biol. Chem.* 273: 8741-8748.
110. Itoh T., Takeshi I., Takenawa T. (1998): A novel phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase (phosphatidylinositol-phosphate kinase II γ) is phosphorylated in the endoplasmic reticulum in response to mitogenic signal. *J. Biol. Chem.* 273: 20292-20299.
 111. Itoh T., Koshiba S., Kigawa T., Kikuchi A., Yokoyama S., Takenawa T. (2001): Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science* 291:1047-1051
 112. Jakel S., Görlich D. (1998): Importin beta, transportin, RanBP5 és RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J.* 17: 4491-4502
 113. Janmey P.A.(1994): Phosphoinositides and calcium as regulator of cellular actin assembly and disassembly. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 169-191
 114. Jao G., Cooper G. M., (1995): Requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267: 7466-2006
 115. Jergil B., Sundler R. (1983): Phosphorylation of phosphatidylinositol in rat liver Golgi. *J. Biol. Chem.* 258: 7968-7973
 116. Janmey P. A. (1995): Protein regulation by phosphatidylinositol lipids. *Curr. Biol.* 2: 61-65
 117. Jones D. H., Morris J. B., Morgan C. P., Kondo H., Irvine R. F., Cockcroft S. (2000): Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the golgi compartment. *J. Biol. Chem.* 275: 13962-13966
 118. Jones D. R., Divecha N. (2004): Linking lipids to chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14: 196-202
 119. Kaffman A., O'Shea E. K. (1999): Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 291-339
 120. Kalderon D., Richardson W. D., Markham A. F., Smith A. E. (1984): Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311: 33-38
 121. Kanai F., Liu H., Field S. J., Akbary H., Matsuo T., Brown G. E., Cantley L. C., Yaffe M. B. (2001): The PX domain of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat. Cell. Biol.* 3: 675-678
 122. Kapp-Barnea Y., Melnikov S., Shefler I., Jeromin A., Sagi-eisenberg R. (2003): Neuronal calcium sensor 1 and phosphatidylinositol 4-kinase beta regulate IgE receptor triggered exocytosis in cultured mast cells. *J. Immunol.* 171: 5320-5327
 123. Kauffmann-Zeh A., Thomas G. M., Ball A., Prosser S., Cunningham E., Cockcroft S., Hsuan J. J. (1995): Requirement for phosphatidylinositol transfer protein in epidermal growth factor signaling. *Science* 268: 1188-1190
 124. Kitamura R., Sekimoto T., Ito S., Harada S., Yamagata H., Masai H., Yoneda Y., Yanagi K. (2006): Nuclear import of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 mediated by NPI-1 (Importin alpha5) is up- and down-regulated by phosphorylation of the nuclear localization signal for which Lys379 and Arg380 are essential. *J. Virol.* 80: 1979-91
 125. Kudo N., Matsumori N., Taoka H., Fujiwara D., Schreiner E. P., Wolff B., Yoshida M., Horinouchi S. (1999): Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9112-9107
 126. Kuriki H., Tamiya-Koizumi K., Asano M., Yoshida S., Kojima K., Nimura Y. (1992): Existence of phosphoinositide-specific phospholipase C in rat liver nuclei and its change during liver regeneration. *J. Biochem.* 111: 283-286

127. Kutay U., Bischoff E. R., Kostka S., Kraft R., Görlich D. (1997): Export of importin α from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90: 1061-1071
128. Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
129. Lanford R. E., Butel J. S. (1984): Construction and characterisation of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* 37: 801-813
130. Leach K. L., Ruff V. A., Jarpe M. B., Adams L. D., Fabbro D., Raben D. M. (1992): α -thrombin stimulates nuclear diglyceride levels and differential nuclear localization of protein kinase C isozymes in IIC9 cells. *J. Biol. Chem.* 276: 21816-21822
131. Lee S. J., Imamoto N., Sakai H., Nakagawa A., Kose S., Koike M., Imamoto M., Kumasaka T., Yoneda Y., Tsukihara T. (2000): The adoption of a twisted structure of importin-beta is essential for the protein-protein interaction required for nuclear transport. *J. Mol. Biol.* 302: 251-264
132. Li Y. S., Porter F. D., Hoffman R. M., Deuel T. F. (1989): Separation and identification of two phosphatidylinositol 4-kinase activities in bovine uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 202-209
133. Liscovitch M., Chalifa V., Pertile P., Chen C. S., Cantley L. C. (1994): Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 269: 21403-21406.
134. Liscovitch M., Cantley L. C. (1995): Signal transduction and membrane traffic: the PIP2/phosphoinositide connection. *Cell* 81: 659-662
135. Liu N., Fukami K., Yu H., Takenawa T. (1996): A new phospholipase C delta 4 is induced at S-phase of the cell cycle and appears in the nucleus. *J. Biol. Chem.* 271: 355-360.
136. Lixin R., Efthymiadis A., Henderson B., Jnas D. A. (2001): Novel properties of nucleolar targeting signal of human angiogenin. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 284: 185-193
137. Loijens J.C., Boronenkov I. V., Parker G. J., Anderson R. A. (1996): The phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase family. *Adv. Enzyme Regul.* 36: 115-140.
138. Loijens J. C., Anderson R. A. (1996): Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases are distinct members of this novel lipid kinase family. *J. Biol. Chem.* 271: 32937-32943
139. Lu P. J., Hsu A. L., Wang D. S., Yan H. I., Yin H. L., Chen C. S. (1998): Phosphoinositide 3-kinase in rat liver nuclei. *Biochemistry* 37: 5738-5745
140. Mahajan R., Delphin C., Guan T., Gerace L., Melchior F. (1997): A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88: 97-107
141. Majerus P. W., Kisseleva M. V., Norris F. A. (1999): The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *J. Biol. Chem.* 274: 10669-10672
142. Maraldi N. M., Cocco L., Capitani S., Mazzotti G., Barnabei O., Manzoli F. A. (1994): Lipid-dependent nuclear signalling: morphological and functional features. *Adv. Enzyme Regul.* 34: 129-143.
143. Maraldi N. M., Zini N., Santi S., Manzoli F. A. (1999): Topology of inositol lipid signal transduction in the nucleus. *J. Cell. Physiol.* 181: 203-217
144. Maraldi N. M., Zini N., Santi S., Manzoli F. A. (2000): Intranuclear domains involved in inositol lipid signal transduction. *Eur. J. Histochem.* 44: 81-7.
145. Martelli A.M., Gilmour R.S., Bertagnoli V., Neri L.M., Manzoli L., Cocco L. (1992): Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C beta in Swiss 3T3 cells. *Nature* 358: 242-245.

146. Martelli A. M., Cataldi A., Manzoli L., Billi A. M., Rubbini S., Gilmour R. S., Cocco L. (1995): Inositides in nuclei of Friend cells: changes of polyphosphoinositide and diacylglycerol levels accompany cell differentiation. *Cell Signal* 7: 53-56
147. Martelli A. M., Capitani S., Neri L. M. (1999): The generation of lipid signaling molecules in the nucleus. *Prog. Lipid. Res.* 38: 273-308
148. Martelli A. M., Billi A. M., Manzoli L., Faenza I., Aluigi M., Falconi M., De Pol A., Gilmour R. S., Cocco L. (2000): Insulin selectively stimulates nuclear phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) β 1 activity through a mitogen-activated protein (MAP) kinase-dependent serine phosphorylation. *FEBS Lett.* 486: 230-236
149. Martelli A. M., Fala F., Faenza I., Billi A. M., Cappellini A., Manzoli L., Cocco, L. (2003): Metabolism and signaling activities of nuclear lipids. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 1143-56.
150. Martin T. F. (1998): Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:231-64
151. Matsuura Y., Stewart M. (2004): Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature* 432: 872-877
152. Mattaj J. W., Englmeier L. (1998): Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 265-306
153. Matunis M. J., Coutavas E., Blobel G. (1996): A novel ubiquitin like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 135: 1457-1470
154. Melen K., Kinnunen L., Fagerlund R., Ikonen N., Twu K. Y., Krug R. M., Julkunen I. (2007): Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J. Virol.* 81: 5995-6006
155. Meyers R., Cantley L. C. (1997): Cloning and characterization of a wortmannin-sensitive human phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Biol. Chem.* 272: 4384-4390
156. Michell R. H. (1975): Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* 415: 81-147
157. Mills I. G., Praefcke G. J., Vallis Y., Peter B. J., Olesen L. E., Gallop J. L., Butler P. J., Evans P. R., McMahon H. T. (2003): EpsinR and AP1/clathrin interactin protein involved in vesicle trafficking. *J. Cell Biol.* 160: 213-222
158. Minogue S., Anderson J. S., Waugh M. G., dosSantos M., Corless S., Cramer R., Hsuan J. J. (2001): Cloning of a human type II phosphatidylinositol 4-kinase reveals a novel lipid kinase family. *J. Biol. Chem.* 276: 16635-16640
159. Mortier E., Wuytens G., Leenaerts I., Hannes F., Heung M. Y., Degeest G., David G., Zimmermann P. (2005): Nuclear speckles and nucleoli targeting by PIP2-PDZ domain interactions. *Embo J.* 24: 2556-65.
160. Muhlhauser P., Muller E. C., Otto A., Kutay U. (2001): Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep.* 2: 690-696
161. Nakagawa T., Goto K., Kondo H. (1996a): Cloning and characterization of a 92 kDa soluble phosphatidylinositol 4-kinase. *Biochem. J.* 320: 643-649
162. Nakagawa T., Goto K., Kondo H. (1996b): Cloning, expression, and localization of 230-kDa phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 12088-12094
163. Nakanishi S., Catt K. J., Balla T. (1994): Inhibition of agonist stimulated inositol 1,4,5-triphosphate production and calcium signaling by the myosin light chain kinase inhibitor, wortmannin. *J. Biol. Chem.* 269: 6528-6535
164. Nakanishi S., Catt K. J., Balla T. (1995): A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5317-532

165. Neri L. M., Borgatti P., Capitani S., Martelli A. M. (1998): Nuclear diacylglycerol produced by phosphoinositide specific phospholipase C is responsible for nuclear translocation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 273: 29738-29744
166. Nemergut M. E., Nizzen C. A., Stukenberg T., Allis C. D., Macara I. G. (2001): Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histon H2A and H2B. *Science* 292: 1540-1543
167. Nishizuka Y. (1988): The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334: 661-665
168. Odom A. R., Stahlberg A., Wenthe S. R., York J. D. (2000): A role for nuclear inositol 1,4,5-triphosphate kinase in transcriptional control. *Science* 287: 2026-2029
169. Odorizi G., Babst M., Emr S. D. (2000): Phosphoinositide signalling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trend Biochem. Sci.* 25: 229-235
170. Olsson H., Martinz-Arias W., Drobak B. K., Jergil B. (1995): Presence of a novel form of phosphatidylinositol 4-kinase in rat liver. *FEBS Lett.* 361: 283-286
171. Osborne S. L., Thomas C. L., 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: 2501-2511
172. Owen D. J., Collins B. M., Evans P. R. (2004): Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 153-191
173. Pante N., Aeby U. (1996). Sequential binding of import ligands to distinct nucleopore regions during their nuclear import. *Science* 273: 1729-32
174. Payraastre B., Nievers M., Boonstra J., Breton M., Verkleij A. J., van Bergen en Henegouwen P. M. (1992): A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase and phospholipase C in the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* 267: 5078-5087.
175. Pederson T., (1998): The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acid Res.* 26: 3871-3876
176. Pertile P., Cantley L. C. (1995): Type II phosphatidylinositol 4-kinase is recruited to CD4 in response to CD4 cross-linking. *Biochim. Biophys. Acta.* 1248: 129-134
177. Pestov G. D., Strezoska Z., Lau L. F. (2001): Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle. Effects of nucleolar protein Bop 1 on G1/S transition. *Mol. Cell Biol.* 21: 4246-4255
178. Porter F. D., Li Y. S., Deuel T. F. (1988): Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase from bovine uteri. *J. Biol. Chem.* 263: 8989-8995
179. Rameh L. E., Tolias K. F., Duckworth B. C. Cantley, L. C. (1997): A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 390: 192-196
180. Randazzo P. A. (1997): Functional interaction of ADP-ribosylation factor 1 with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 272: 7688-7692
181. Rando O. J., Zhao K., Crabtree G. R. (2000): Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol.* 10: 92-97
182. Read S M., Northcote D H . (1981): Minimization of variation in the response proteins of the Coomassie Blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochim.* 116: 53-64
183. Ribbeck K., Lipowsky G., Kent H. M., Stewart M., Görlich D. (1998): NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J.* 17: 6587-6598
184. Ribbeck K., Görlich G. (2001): Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* 20: 1320-1330
185. Robbins J., Dilworth S. M., Laskey R. A., Dingwall C. (1991): Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64: 615-23
186. Roche S., Koegl M., Courtneidge S. A. (1994): The phosphatidylinositol 3-kinase alpha is required for DNA synthesis induced by some, but not all growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9185-9189

187. Rodriguez M. S., Dargemont C., Stutz F. (2004): Nuclear export of RNA. *Biol. Cell* 96: 639-655
188. Rouser G., Kritchevsky G., Yamamoto A., Baxter C. F. (1972): Lipids in the nervous system of different species as a function of age: brain, spinal cord, peripheral nerve, purified whole cell preparation, and subcellular particulates: regulatory mechanisms and membrane structures. *Adv. Lipid Res.* 10: 261-360
189. Rout M. P., Aitchison J. D. (2001): The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* 276: 16593-16596
190. Rout M. P., Aitchison J. D., Suprapto A., Hjertaas K., Zhao Y., Chait B. T. (2000): The yeast nuclear pore complex: architecture composition and transport mechanism. *J. Cell. Biol.* 148: 635-651
191. Rubbi C. P., Millner J. (2003): Disruption of the nucleolus mediates stabilisation of p53 response to DNA damage and the other stresses. *EMBO J.* 22:6068-6077
192. Ruggero D., Padolfi P. P. (2003): Does the ribosome translate cancer? *Nat. Rev. Cancer* 3:179-192.
193. Runnels L. W., Yue L. X., Clapham D. E. (2002): The TRPM7 channel is inactivated by PIP₂ hydrolysis. *Nature Cell Biol.* 15: 370-378
194. Russo G., Ricciardelli G., Pietropaolo C. (1997): Different domains cooperate to target the human ribosomal L7a protein to the nucleus and to the nucleoli. *J. Biol. Chem.* 272: 5229-35.
195. Schacht J. (1981): Extraction and purifications of polyphosphoinositides. *Methods Enzymol.* 72: 626-631
196. Schekman R., Orci L. (1996): Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271: 1526-1533
197. Schiavo G., Gu Q-M., Prestwich G. D., Söllner T. H., Rothman J. E. (1996): Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 13327-13332
198. Scholz G., Barritt G. J., Kwok F. (1991): Purification and chemical modification of a Phosphatidylinositol kinase from sheep brain. *Eur. J. Biochem.* 201: 249-255
199. Shaik N. A., Palmer F. B. St. C. (1997): Phosphoinositide kinase in chick brain and nerve. *J. Neurochem.* 28: 395-402
200. Shelton S. N., Barylko B., Binns D. D., Horazdovsky B. F., Albanesi J. P. Goodman J. M. (2003): *Saccharomyces Cerevisiae* contains a Type II phosphatidylinositol 4-kinase. *Biochem. J.* 371: 533-540
201. Smith C. D., Wells W. W. (1983): Phosphorylation of rat liver nuclear envelopes. II. Characterization of in vitro lipid phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 258: 9368-9373.
202. Sorensen S. D., Linseman D. A., McEwen E. L., Heacock A. M., Fisher S. K. (1998): A role for a wortmannin-sensitive phosphatidylinositol-4-kinase in the endocytosis of muscarinic cholinergic receptors. *Molec. Pharmac.* 53: 827-836
203. Steger D. J., Haswell E. S., Miller A. L., Wenthe S. R., O'Shea E. K. (2003): Regulation of chromatin remodelling by inositol polyphosphates. *Science* 299: 114-116
204. Stephens L., Jackson T. R., Hawkins P. T. (1993): Activation of phosphatidylinositol 4,5 biphosphate supply by agonist and non-hydrolyzable GTP analogues. *Biochem J.* 269: 481-488
205. Starling A. P., East J. M., Lee A. G. (1995): Phosphatidylinositol 4-phosphate increases the rate of phosphorylation of the phosphorylated Ca²⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 270: 14467-14470
206. Ström A. C., Weis K. (2001): Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol* 2, reviews 3008.1-3008.9.

207. Suh B. C., Hille B. (2002): Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-disphosphate synthesis. *Neuron* 35: 507-520
208. Sun B., Murray N. R., Fields A. P. (1997): A role for nuclear phosphatidylinositol-specific phospholipase C in the G2/M phase transition. *J. Biol. Chem.* 272: 26313-26324.
209. Sylvia V., Curtin G., Norman J., Stec J., Busdee D. (1988): activation of a low specific activity form of DNA polymerase α by inositol-1,4-bisphosphate. *Cell* 54: 651-658
210. Szivak I., Lamb N. and Heilmeyer L. M. (2006): Subcellular localization and structural function of endogenous phosphorylated phosphatidylinositol 4-kinase (p14k92). *J. Biol. Chem.*
211. Thomas G. M. H., Cunningham E., Fensome A., Ball A., Totty N. F., Truong O., Hsuan J. J., Cockcroft S. (1993): An essential role of phosphatidylinositol transfer protein in phospholipase C-mediated inositol lipid signaling. *Cell* 74: 919-928
212. Timinszky G., Tirian L., Nagy F. T., Toth G., Perczel A., Kiss-Laszlo Z., Boros I., Clarke P. R., Szabad, J. (2002): The importin-beta P446L dominant-negative mutant protein loses RanGTP binding ability and blocks the formation of intact nuclear envelope. *J. Cell Sci.* 115: 1675-87.
213. Tolias K. F., Cantley L. C., Carpenter C. L., (1995): Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J. Biol. Chem.* 270: 07656-17659
214. Vann L. R., Wooding F. B. P., Irvine R. F. Divecha N. (1997): Metabolism and possible compartmentalisation of inositol lipids in isolated rat-liver nuclei. *J. Biochem.* 327: 56-576
215. Varsanyi M., Messer M., Brant N. R. (1989): Intracellular localization of inositol-phospholipid-metabolizing enzymes in rabbit fast-twitch skeletal muscle. Can D-myoinositol 1,4,5-trisphosphate play a role in excitation-contraction coupling? *Eur. J. Biochem.* 179: 473-479
216. Visintin R., Amon A. (2000): The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12: 752
217. Walker D. H., Pike L. J. (1987): Phosphatidylinositol kinase is activated in membranes derived from cells treated with epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7513-7517
218. Walsh J. P., Caldwell K.K., Majerus P. W. (1991): Formation of phosphatidylinositol 3-phosphate by isomerization from phosphatidylinositol 4-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8184-9187
219. Wang Y. J., Wang J., Sun H. Q., Martinez M., Sun Y. X., Marcia E., Kirchhausen T., Albanesi J. P., Roth M. G., Yin H. L. (2003): Phosphatidylinositol 4-phosphate regulates targeting of clatrin adaptor AP1 complexes to the Golgi. *Cell* 114: 299-310
220. Waselle L., Gerona R. R., Vitale N., Martih T. F., Bader M. F., Regazzi R. (2005): Role of phosphoinositide signalling in the control of insulin exocytosis. *Molec. Endocrin.* 19: 3097-3106
221. Watt S. A., Kular G., Fleming I. N., Downes C. P., Lucocq J. M. (2002): Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta 1. *Biochem. J.* 363: 657-666
222. Waugh M. G., Lawson D., Tan S. K., Hsuan J. J. (1998): Phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis in immunisolated caveolae-like vesicles and low buoyant density non-caveolar membranes. *J. Biol.Chem.* 273: 17115-17121
223. Waugh M.G., Miogue S., Anderson J. S., Balinger A., Blumenkrantz D., Calnan D. P., Cramer R., Hsuan J. J. (2003): Localization of a highly active pool of type II phosphatidylinositol 4-kinase in a p97 / valosin-containing-protein-rich factor of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 373: 57-63

224. Weernink P. A. O., Schulte P., Guo Y., Wetzel J., Amano M., Kaibuchi K., Haverland S., Voss M., Schmidt M., Mayr G. W., Jakobs K. H. (2000): Stimulation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase by Rho-kinase. *J. Biol. Chem.* 275: 10168-10174
225. Wei Y. J., Sun H. Q., Yamamoto M., Wlodarski P., Kunii K., Martinez M., Barylko B., Albanesi J. P., Yin H. L. (2002): Type II phosphatidylinositol 4-kinase beta is a cytosolic and peripheral membrane protein that is recruited to the plasma membrane and activated by Rac-GTP. *J. Biol. Chem.* 277: 46586-46593
226. Wennstrom S., Siegbahn A., Yokote K., Arvidsson A. K., Heldin C. H., Mori S., Claesson W.L. (1994): Membrane ruffling and chemotaxis transduced by the PDGF beta receptor require the binding site for phosphatidylinositol 3 kinase. *Oncogene* 9: 651-660
227. Wente S. R. (1999): A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science* 295: 96-100
228. Wetzker R., Klinger R., Hsuan J., Fry M. J., Kauffmann-Zeh A., Muller E., Frunden H., Waterfield M. (1991): Purification and characterization of phosphatidylinositol 4-kinase from human erythrocyte membranes. *Eur. J. Biochem.* 200: 179-185
229. Weis K. (2002): Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 14: 328-335
230. Whitman M., Kaplan D., Roberts T., Cantley L. (1987): Evidence for two distinct phosphatidylinositol kinases in fibroblasts. Implications for cellular regulation. *Biochem. J.* 247: 165-174
231. Wiedeman C., Scrafer T., Burger M. M., Shira T. S., (1998): An essential role for a small synaptic vesicle-associated phosphatidylinositol 4-kinase in neurotransmitter release. *Neurosci.* 18: 5594-5602.
232. Wirtz K. W. (1997): Phospholipid transfer protein revisited. *Biochem. J.* 324: 353-360
233. Wong K., Cantley L. C. (1994): Cloning and characterization of a human phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Biol. Chem.* 269: 28878-28884
234. Wong K., Meyers R., Cantley L. C. (1997): Subcellular locations of phosphatidylinositol 4-kinase isoforms. *J. Biol. Chem.* 272: 13236-13241
235. Xiao Z., Latek R., Lodish, H. F. (2003): An extended bipartite nuclear localization signal in Smad4 is required for its nuclear import and transcriptional activity. *Oncogene* 22: 1057-69
236. Xu A., Suh P. G., Marmy-Conus N., Pearson R. B., Seok O. Y., Cocco L., Gilmour R. S. (2001): Phosphorylation of nuclear phospholipase C $\beta 1$ by extracellular signal regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I. *Mol. Cell Biol.* 21: 2981-2990
237. Xu Y., Seet L. F., Hanson B., Hong W. (2001): The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling. *Biochem. J.* 360: 513-530
238. Yano H., Nakanishi S., Kimura K., Hanai N., Saitoh Y., Fukui Y., Nonomura Y., Matsuda Y., (1993): Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of the phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* 268: 25846-25856
239. Yao R., Cooper G. M. (1995): Requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 2675: 7566-7475
240. York J. D., Majerus P. W. (1994): Nuclear phosphatidylinositols decrease during S-phase of the cell cycle in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 269: 7847-7850.
241. Yoshida S., Ohya Y., Goebel M., Nakano A., Anraku Y. (1994): A novel gene, STT4, encodes a phosphatidylinositol 4-kinase in the PKC1 protein kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269: 1166-1172

242. Yu H., Fukami K., Watanabe Y., Ozaki C., takenawa T. (1998): Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate reverses the inhibition of RNA transcription caused by histon H1. *Eur. J. Biochem.* 251: 281-287
243. Zeng X. T., Hara M., Ingaki C. (1994): Electrogenic and phosphatidylinositol-4-monophosphate stimulated Cl^- transport by Cl^- pump in the rat brain. *Brain Res.* 641: 167-170
244. Zhang J., Barak L. S., Anborgh P. H., Laporte S. A., Caron M. G., Ferguson S. S. (1999): Cellular trafficking of G protein-coupled receptor / beta-arrestin endocytic complex. *J.Biol.Chem.* 274 16: 10999-11006
245. Zhang X., Liojens J. C., Boronenkov I. V., Parker G. J., Norris F. A., Chen J., Thum O., Presthwich G. D., Majerus P. W. Anderson R. A. (1997): Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase isosymes catalyze the synthesis of 3-phosphate containing phosphatidylinositol signaling molecules. *J.Biol.Chem.* 272: 17756-17761.
246. Zhao K., Wang W., Rando O. J., Xue Y., Swiderek K., Kuo A., Crabtree G. R. (1998): Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell* 95: 625-636
247. Zhao X. H., Bondeva T., Balla T. (2000): Characterization of recombinant phosphatidylinositol 4-kinase beta reveals auto and heterophosphorylation of the enzyme. *J. Biol.Chem.* 275: 14642-14648
248. Zini N., Martelli A. M., Cocco L., Manzoli F. A. Maraldi, N. M. (1993): Phosphoinositidase C isoforms are specifically localised in the nuclear matrix and cytoskeleton of Swiss 3T3 cells. *Exp. Cell Res.* 208: 257-269.
249. Zini N., Sabatelli P., Faenza I., Ognibene A., Maraldi N. M. (1996): Interleukin-1 alpha induces variations of the intranuclear amount of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase C beta1 in human osteosarcoma-2 cells. *Histochem.* 128: 495-504.
250. Zolyomi A., Zhao X., Downing G. J., Balla T. (2000): Localization of two distinct type III phosphatidylinositol 4-kinase enzyme mRNAs in the rat. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 278: C914-920

Saját közlemények jegyzéke

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-kinasae 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)

8. Tárgyszavak

Foszfatidilinozitol 4-kináz izoformák, PI4K230, sejtmagvacska, epitóp maszkírozás, sejtmagi import, nukleáris lokalizációs szignál, sejtmagvacskába irányító szignál, immunfluoreszcencia, permeabilizált HeLa sejtek

Key words

Phosphatidylinositol 4-kinase isoforms, PI4K230, nucleolus, epitope masking, nuclear import, nuclear localisation signal, nucleolar targeting signal, immunofluorescence, permeabilized HeLa cells

9. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Vereb György egyetemi docensnek, hasznos tanácsait mellyel elméleti és gyakorlati ismereteimet bővítette, türelmét munkám irányításában és mindazt a segítséget, amellyel hozzájárult dolgozatom és a közlemények elkészítéséhez.

Köszönöm Dr. Gergely Pál intézetigazgató, egyetemi tanárnak, hogy munkánkat támogatta.

Köszönöm ifj. Dr. Vereb György egyetemi docensnek (Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet) a mikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítségét és hogy munkákhoz elméleti és gyakorlati téren hasznos tanácsokat nyújtott.

Külön szeretném megköszönni Dr. Friedländer Elzának, Kása Anitának és Duarte Lisboanak a kísérletes munkában való közreműködést, valamint Dr. Bagossi Péternek (Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) a molekulamodellezést.

Köszönettel tartozom Hunyadi Kálmánné asszisztensnek, hogy alapos, megbízható munkájával laboratóriumi kísérleteim elvégzésében segítségemre volt.

Köszönöm Dr. Ludwig M. G. Heilmeyer egyetemi tanárnak (Ruhr-Universität, Bochum) szakmai irányítását bochumi tanulmányútjaim során, Dr. Elisabeth Petrasch-Parweznek (Ruhr-Universität, Bochum) pedig az immunhisztokémiai kísérletek kivitelezéséhez nyújtott segítséget.

Köszönöm továbbá Dr. Tóth Gábornak (Szegedi Tudományegyetem), és Dr. Balla Tamásnak (NIH, USA) az általuk biztosított kísérleti anyagokat.

Végezetül szeretném megköszönni családomnak a türelmet és támogatást, külön köszönöm édesanyámnak és férjemnek, hogy idejüket áldozták disszertációm elkészítéséhez.