

## ZÁRÓJELENTÉS

A plazmamembrán típusú  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz 4b izoforma szerkezetbeli eltérései polarizált és nem-polarizált sejtekben**TUDOMÁNYOS HÁTTÉR:**

A  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitel egyik kulcsfontosságú eleme a plazmamembránban található  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz (PMCA), mely az ATP kémiai energiájának terhére  $\text{Ca}^{2+}$  ionokat távolít el a citoszólból az extracelluláris térbe. A PMCA egyetlen polipeptidláncból felépülő, 10 transzmembrán hélixszel rendelkező, kb.130 kDa molekulatömegű integráns membránfehérje. A fehérje lényeges funkcionális egysége a citoszólban elhelyezkedő C-terminális szabályozó régió, mely beépített autoinhibítorként is működik: alacsony  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció mellett gátolja a katalitikus domének mozgását, és ezáltal az enzim aktivitását. A PMCA fő aktivátora a  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin komplex, amely a C-terminális régióban található kalmodulin-kötő szekvenciához kötődik. A  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin komplex kötődése olyan szerkezeti változásokat indukál, melynek hatására a fehérje felszabadul a belső gátlás alól. A C-terminális régió számos egyéb regulációs lehetőséget tartalmaz (foszforilációs helyek, proteáz-hasító helyek, fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakítására képes szekvenciák). Ezek a szabályozó egységeken keresztül megváltoztatható a C-terminális szakasz és a fehérje katalitikus doménjeinek viszonya, és ezáltal a PMCA aktivitása. Ezenkívül a C-terminális régió egyes szakaszain keresztül a PMCA olyan multiprotein-komplexekhez kapcsolódhat, melyek speciális szignalizációs membrándoménekbe irányítják a fehérjét [1-3].

A PMCA fehérjéket 4 gén kódolja, melyekről alternatív "splicing" révén több mint 20 különféle izoforma keletkezhet. A PMCA izoformák C-terminális regulátor régiója nagy mértékben különbözik egymástól, ami lehetővé teszi a variánsok működésének eltérő szabályozását [4].

A PMCA fehérjék közül a PMCA4b izoforma az egyik leggyakrabban előforduló variáns, szinte mindenféle sejttypusban megtalálható. C-terminálisán található egy PDZ-kötő szekvencia, amelyen keresztül különböző PDZ-domént tartalmazó fehérjékhez (PDZ-fehérje) képes kapcsolódni. Ilyenek a membrán-asszociált-guanilát-kináz (MAGUK) család tagjai, amelyek fontos szerepet játszanak sejt-sejt kapcsolatok illetve multiprotein-komplexek kialakításában (pl. epitél sejtben a „tight junction”, idegsejtben a posztszinaptikus denzitás fehérjeösszetételét a MAGUK család (SAP97, PSD-95, stb) tagjai befolyásolják). Ezek a PDZ fehérjék többféle fehérje-fehérje interakciós domént tartalmaznak (PDZ,SH3,SH2). Tagjai közül többek között a PSD-95, PSD-93, SAP102 esetében igazolták, hogy kölcsönhatnak a PMCA4b-vel [5, 6].

**KUTATÁSI ELŐZMÉNYEK:**

Különböző sejt vonalakban az expresszált PMCA izoformák analízise során azt találtuk, hogy míg polarizált, adherens sejtekben a klónozott PMCA4b-nek megfelelő, teljes hosszúságú fehérje expresszáldódik, addig vörösvérsejtben, és más nem polarizált sejtekben a PMCA4b izoforma C-terminális szakaszán hiányzik egy rövid (kb. 20-30 aminosav hosszúságú) peptidszakasz. Két olyan humán T sejt leukémia sejt vonalat találtunk, amely mind a rövid, mind a hosszú formát tartalmazta (1. táblázat).

|               | „hosszú” PMCA4b   | „hosszú” és „rövid” PMCA4b                                       | „rövid” PMCA4b   |
|---------------|---|--|--|
| endogén       | HeLa (humán méhnyakrák epitélisejt)<br>HEK-293 (humán embrionális vesesejt)<br>MDCK (kutya vese epitélisejt)<br>N2A (egér neuroblasztóma) | Jurkat (humán T sejt leukémia)<br>MOLT-4 (humán T sejt leukémia) | vörösvérsejt<br>TF1 (eritroleukémia)<br>K562 (eritroleukémia)<br>B-limfocita<br>T-limfocita<br>MEG (megakariocita)<br>DAMI (megakariocita)<br>CHRF (megakariocita) |
| transzfektált | HeLa<br>HEK-293<br>MDCK<br>N2A<br>COS-7 (majom vese fibroblaszt)  | Jurkat<br>K562   |  |

1. táblázat

### A rövid és a hosszú PMCA4b forma előfordulása különböző sejtekben

*A táblázat első sora azt mutatja, hogy az egyes sejtvonalakban az endogén PMCA4b hosszú illetve rövid formában van-e jelen. A második sorban aszerint rendeztük a különféle sejt típusokat, hogy bennük a PMCA4b-vel történő tranziens transzfekciót követően, milyen hosszúságú PMCA4b-t detektáltunk. A transzfekciót követően 3 napig vizsgáltuk a sejtek PMCA4b összetételét.*

Jurkat valamint K562 sejt kultúrák PMCA4b-vel történő tranziens transzfekciója során azt tapasztaltuk, hogy először a teljes hosszúságú PMCA4b forma expresszálódik, majd a transzfekciót követően idővel megjelenik a rövid PMCA4b forma is (1. táblázat). Ez alapján azt feltételeztük, hogy a rövid forma kialakulását poszttranszlációs módosítás, a C-terminális szakasz lehasadása hozza létre.

A hiányzó C-terminális szakasz tartalmazza a PDZ-kötő szekvenciát is. E szekvencia hiánya nem befolyásolja a  $Ca^{2+}$  ATPáz biokémiájának karakterisztikáját, illetve szabályozását kalmomodulinnal és foszforiláción keresztül. Mivel azonban különféle PDZ-kölcsönhatások nagymértékben befolyásolhatják a PMCA4b speciális membránkompartimentbe történő szerveződését, a PDZ-kötő szekvencia hiánya alapvetően határozhatja meg a PMCA  $Ca^{2+}$  jelátvitelben betöltött szerepét.

## **KUTATÁSI EREDMÉNYEK:**

### **1. Hasítási hely vizsgálata mutáció segítségével.**

Irodalmi adatok alapján (Amikor a PMCA4b fehérjét először vörösvérsejtben detektálták, tripszines emésztést követően peptidszekvenálással ellenőrizték, hogy a PMCA4b szekvenciája megfelel-e cDNS-ének. Ennek során nem sikerült azonosítani a cDNS alapján várt rövid C-terminális szakaszt. Az utolsó detektált aminosav az 1176. tirozin volt [7]) elképzelhetőnek tartottuk, hogy a „rövid” PMCA4b forma C-terminálisa az 1176. tirozin. Olyan mutáns PMCA4b fehérjét állítottunk elő, amelyben ezt a tirozint irányított mutagenézissel alaninra cseréltük (Tyr<sup>1176</sup>→Ala mutáns), és az N-terminálisához kapcsolva tartalmazta a zöld fluoreszcens fehérjét (GFP). Tanulmányoztuk, hogy a tirozin mutációja megvédi-e a fehérjét C-terminálisának lehasadásától. A GFP-hez kötött mutáns fehérje

expresszióját kétféle sejttypusban vizsgáltuk: *a*, K562 sejtekben, amelyek eredetileg csak a „rövid” formát tartalmazzák, illetve *b*, Jurkat sejtekben, amelyek mind a „rövid” mind a teljes hosszúságú formát expresszálják. Ezeket a sejteket tranziensen transzfektáltuk a GFP-vel jelölt mutáns és vad típusú PMCA4b fehérjével, majd transzfekciót követően Western blot analízissel időben követtük a fehérje méretében bekövetkezett változást. A GFP-hez kapcsolt PMCA4b fehérjék az elektroforézis során lassabban futottak, mint az endogén PMCA4b fehérje, így attól könnyen elkülöníthettük és függetlenül elemeztük. A GFP-PMCA4b esetében a hosszú és a rövid forma aránya folyamatosan változik a tranziens transzfekciót követően: első napon szinte kizárólag a teljes hosszúságú PMCA4b detektálható. A rövid forma a második napon jelenik meg, majd fokozatosan nő az aránya. Úgy találtuk, hogy a Tyr<sup>1176</sup>→Ala mutáns esetében a változás kinetikája nem különbözik szignifikánsan a vad típusú PMCA4b fehérje kinetikájától. Ez azt bizonyítja, hogy az 1176. tirozin mutációja nem védi meg a fehérje C-terminálisát a feltételezett proteolízissel szemben.

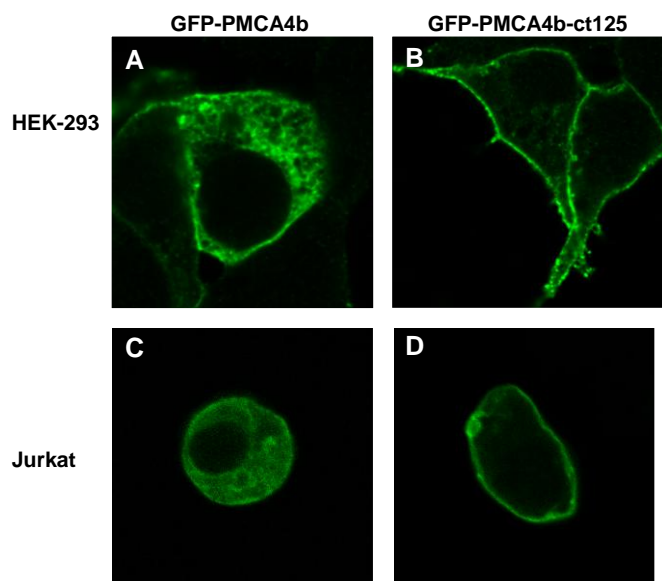
## **2. A PMCA4b szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata rövid formát is tartalmazó sejtekben.**

Konfokális mikroszkóp segítségével tanulmányoztuk a GFP-hez kapcsolt PMCA4b fehérje sejten belüli lokalizációját „rövid” PMCA4b formát is tartalmazó sejtekben (Jurkat, K562). Azt találtuk, hogy a transzfekciót követő első napon a fehérje főleg a citoplazmában helyezkedik el. Western blot analízissel ekkor csak a teljes hosszúságú GFP-PMCA4b-t detektáltuk. A transzfekciót követő második napon már megjelenik a „rövid” forma is (kb azonos mennyiségben van jelen a „rövid” és a „hosszú” forma). Ekkor konfokális mikroszkóppal diffúz, sejten belüli lokalizáció mellett már plazmamembrán lokalizációt is megfigyeltünk. Bár ezek a kísérletek még nem alkalmasak a módosítás helyének pontos meghatározására, de arra utalnak, hogy a „rövid” forma a plazmamembránban lokalizálódik.

## **3. Fehérje lokalizációs motívumok a PMCA4b C-terminális doménjében.**

Olyan GFP-hez kapcsolt mutáns PMCA4b fehérjét készítettünk, amelyben a teljes C-terminális szabályozó régiót eltávolítottuk (GFP-PMCA4b-ct125). Polarizált (COS-7, HEK-293) és nem-polarizált (Jurkat, K562) sejt vonalakban konfokális mikroszkóp segítségével a transzfekciót követően több időpontban is vizsgáltuk a GFP-vel jelölt vad típusú és a mutáns fehérje szubcelluláris lokalizációját. Kimutattuk, hogy a GFP-PMCA4b-ct125 mutáns nagyobb mennyiségben található a plazmamembránban, mint a teljes hosszúságú GFP-PMCA4b.

*Ezek a kísérletek azt bizonyítják, hogy a C-terminális szabályozó régióban olyan eddig nem vizsgált motívum(ok) található(ak), amely(ek) szabályozzák a fehérje expresszióját a plazmamembránban.*

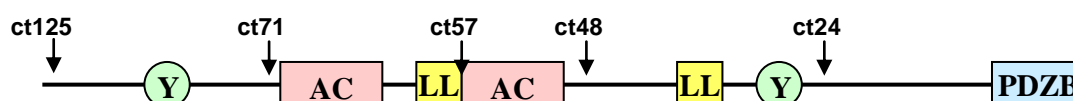


1. ábra

A C-terminális régió eltávolítása elősegíti a PMCA fehérje megjelenését a plazmamembránban

*Konfokális mikroszkóppal készített optikai metszetek GFP-PMCA4b-vel (A) illetve GFP-PMCA-ct125 deléciós mutánsnal (B) transzfektált HEK-293 sejtekről 1 nappal a transzfekciót követően. Hasonló eredményt mutat az azonos körülmények mellett transzfektált Jurkat sejtekben a GFP-PMCA4b (C) és a GFP-PMCA4b-ct125 (D) eloszlása.*

A PMCA4b C-terminális régiójának szekvencia-analízise során több olyan szekvenciát is találtunk, amelyek részt vehetnek a fehérje irányításában (savanyú aminosavakban gazdag régiók, di-leucin illetve tirozin alapú motívumok, illetve a már említett PDZ-kötő szekvencia) (2.ábra).



2. ábra

A PMCA4b C-terminális régiójában – a szekvencia-analízis során talált – szubcelluláris mozgást irányító szekvenciák

*Rövidítések: LL: di-leucin motívum; Y: tirozin; AC: savanyú régió (“acidic cluster”); PDZB: PDZ-kötő szekvencia  
A nyilak a ún. “ct” mutánsok C-terminálisát jelzik.*

A di-leucin és a tirozin alapú motívumok olyan szekvenciák, amelyeket – a fehérjék vezikuláris transzportját szabályozó – ún. „adaptor protein” komplexek ismernek fel. Több különféle „adaptor protein” komplex létezik (AP-1 – AP-4 [8]), melyek többek között a transz-Golgi hálózat (TGN) és endoszómális kompartmentek között irányítják a fehérjét (AP-1), illetve a plazmamembránból segítik elő az internalizációt (AP-2).

A – főként savanyú aminosavakból álló – savanyú régió (acidic cluster) olyan irányító szekvencia, mely a plazmamembrán, az endoszóma-Golgi rendszer illetve az endoplazmás retikulum között szabályozza a fehérjék mozgását. A savanyú régió nem közvetlenül kötődik az „adaptor protein”komplexekhez, hanem az ún. PACS (Phosphofurin Acidic Cluster Sorting proteins) fehérjéken keresztül [9]. E mechanizmusra egy példa a polycystin-2 kation csatorna, melyet – savanyú régiójához kötődve – a PACS-2 fehérje az endoplazmás retikulum felé irányít. Amennyiben ezt a kölcsönhatást meggátolták, a polycystin-2 mennyisége a plazmamembránban jelentősen megemelkedett [10].

Ezek a sejten belüli mozgást irányító szekvenciák általában egy összetett szabályozási rendszert alkotnak és a különféle fehérjepartnereik jelenlététől, illetve a szekvencia környezetének foszforiláltsági állapotától függően együttesen regulálják a fehérjék lokalizációját [11].

Rendelkezésünkre állnak olyan PMCA4b mutánsok, amelyek C-terminálisáról különböző hosszúságú peptidszakaszokat távolítottunk el („ct” mutánsok), lehetővé téve, hogy az egyes szekvenciákat külön-külön vizsgáljuk (2. ábra). A mutánsok neve jelzi, hogy hány aminosav hiányzik a PMCA4b C-terminálisáról (pl. a ct24 mutáns, 24 aminosavval rövidebb, mint a vad típusú PMCA4b).

A különféle mutánsok sejten belüli eloszlását COS-7 sejt vonalban vizsgáltuk, amely a fehérjék szubcelluláris mozgásának vizsgálatára általánosan használt modellsejt. Az egyes „ct” mutánsokat tranziensen transzfektáltuk COS-7 sejtekbe. 1 illetve 2 nap után a sejteket fixáltuk, permeabilizáltuk, 5F10 anti-PMCA ellenanyaggal, majd fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyaggal festettük. Az endoplazmás retikulumot anti-calnexin ellenanyaggal, a Golgi kompartmentet pedig egy fluoreszcensen jelölt lektin (wheat germ agglutinin (WGA)) segítségével jelöltük. A WGA-t plazmamembrán markerként is használtuk, de ebben az esetben fixálás előtt adtuk a sejtekhez, majd rövid, kétperces inkubálást követően a sejteket mostuk, fixáltuk és a fentieknek megfelelően kezeltük. Ilyenkor a WGA csak a sejtfelszíni szénhidrát csoportokat jelöli meg. Konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, hogy a különböző PMCA fehérjék milyen kompartment markerrel kolokalizálnak együtt, majd összehasonlítottuk a mutánsok és a teljes hosszúságú PMCA4b szubcelluláris megoszlását.

### ***Retenció vagy internalizációs szignál.***

A vad típusú PMCA4b fehérjére jellemző, hogy a transzfekciót követő első nap a fehérje főleg az endoplazmás retikulumban (ER) és kisebb mennyiségben a Golgi-ban figyelhető meg. A transzfekciót követő második nap a fehérje már nagyobb arányban található a Golgiban, és megjelenik a plazmamembránban is. Amennyiben a PMCA4b C-terminálisáról az utolsó 48 aminosavat eltávolítjuk (ct48 mutáns), a fehérje viselkedése nem változik. Ezzel szemben megfigyelésünkre a ct24 mutánst a második nap után is csak az ER-ban detektáltuk.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a ct24 és a ct48 mutánsok C-terminálisai között elhelyezkedő régióban található egy olyan szignál, amely a fehérjét az endoplazmás retikulum felé irányítja. Az egyik ilyen feltételezett motívum egy di-leucin alapú szignál [8, 12], mely „adaptor protein” komplexeken keresztül a fehérjét az intracelluláris kompartmentek felé irányíthatja. Ezért irányított mutagenézissel a PMCA4b fehérjében és a ct24 mutánsban az 1167. leucinnal kezdődő három egymást követő leucint alaninra cseréltük (PMCA4b-LLL<sup>1167-1169</sup>→AAA mutáns és ct24-LLL<sup>1167-1169</sup>→AAA mutáns), és vizsgáltuk a mutánsok sejten belüli viselkedését. A transzfekciót követő második napon - szemben a ct24 fehérjével - a ct24-LLL<sup>1167-1169</sup>→AAA mutáns megjelent a plazmamembránban. A sejtek közel 40%-ában túlnyomórészt plazmamembrán lokalizációt detektáltunk. A teljes hosszúságú PMCA4b esetében a leucin-alanin cserék hatására kétszeresére nőtt azoknak a sejteknek az aránya, melyeknél főleg a plazmamembránban figyeltük meg a PMCA-t. A leucin-alanin cserék hatására tehát a PMCA4b molekula könnyebben kijut a

plazmamembránba, ami azt bizonyítja, hogy az itt található di-leucin alapú szignál a PMCA4b fehérjét az intracelluláris kompartmentek felé irányítja.

Mivel az ER retenciós vagy internalizációs szignál ellenére a teljes hosszúságú PMCA4b képes a Golgi és a plazmamembrán kompartmentbe eljutni, valószínű, hogy a PMCA4b utolsó 24 aminosav hosszúságú szakasza valamiképpen elfedi e szignál hatását, és lehetővé teszi a vad típusú fehérje kijutását a plazmamembránba. Hasonló jelenséget írtak le az NMDA receptor NR2B alegységével kapcsolatban [13]. Ennek a fehérjének a C-terminális részén szintén található egy endocitotikus motívum (ebben az esetben egy tirozin alapú szignál), ami a fehérjét az AP-2 komplex segítségével az intracelluláris kompartmentek felé irányítja. Az NR2B C-terminálisan található PDZ-kötő szekvencia azonban képes meggátolni ezt a hatást. A PSD-95 PDZ-fehérje kötődése az NR2B PDZ-kötő szekvenciájához megakadályozza az AP-2 mediált internalizációt. Mivel a PMCA4b utolsó 24 aminosav hosszúságú szakasza szintén tartalmaz egy PDZ-kötő szekvenciát, ezért mi is megvizsgáltuk a PDZ-kötő szekvencia szerepét a sejt felszíni expresszió szabályozásában (lásd 4. és 5. bekezdés)

### ***Savanyú régió.***

Rövidebb „ct” mutánsok segítségével tovább vizsgáltuk a C-terminális régió szerepét. Szemben a vad típusú PMCA4b és a ct48 deléciós mutáns sejten belüli mozgására jellemző kinetikával, a ct57 mutáns és a rövidebb konstrukciók már a transzfekeciót követő első napon megjelentek a plazmamembránban, és a transzfekeciót követő második napon már szinte kizárólag ebben a kompartmentben lokalizálódtak. A megfelelő időpontokban a ct57, illetve a rövidebb mutánsok bár sokkal kisebb mennyiségben, de detektálhatóak voltak mind az ER-ban, mind a Golgi kompartmentben.

Hogy mennyiségileg is elemezzük ezeknek a mutánsoknak illetve a vad típusú PMCA4b-nek a sejt kompartmentek közötti eloszlását, 1 nappal a transzfekeciót követően COS-7 sejtekből membránt preparáltunk. A plazmamembránt, illetve a sejten belüli membránokat Percoll grádiens centrifugálás segítségével szeparáltuk. A szétválasztott frakciókat gélelektroforézist követően 5F10 anti-PMCA ellenanyaggal megfestettük. A PMCA fehérje mennyiségét Bio-Rad Molecular Imager System segítségével értékeltük. Kiszámoltuk a plazmamembránban és az endoplazmás retikulum membránjában található PMCA mennyiségének arányát, és összehasonlítottuk az egyes ct mutánsok és a vad típusú fehérje esetében. A konfokális felvételeknek megfelelő adatokat kaptunk. A transzfekeciót követő első napon a teljes hosszúságú PMCA4b és a ct48 mutáns főleg intracelluláris membránokban helyezkedett el ( $PM/ER_{PMCA4b}=0,45$ ;  $PM/ER_{ct48}=0,28$ ). Ezzel szemben ebben az időpontban a ct57 mutáns már nagyobb arányban megjelent a plazmamembránban ( $PM/ER_{ct57}=1,04$ )

A ct57 és a ct48 mutánsok C-terminálisai között egy savanyú aminosavakban rendkívül gazdag régió található. Kísérleteink azt mutatják, hogy ez a savanyú régió a PMCA4b fehérjét az intracelluláris kompartmentek felé irányítja, és lassítja a PMCA4b fehérje megjelenését a plazmamembránban. *Bár további kísérletek szükségesek a lokalizációs szignálok meghatározására, reményeink szerint eredményeink rövid időn belül közlésre alkalmasak lesznek.*

### ***PDZ-kötő szekvencia.***

Mivel a rövid PMCA4b fehérjéről hiányzó peptidszakasz ismert fontos eleme a PDZ-kötő szekvencia [5, 6, 14, 15], ezért a továbbiakban kitüntetett figyelemmel tanulmányoztuk e motívum szerepét a PMCA4b plazmamembrán lokalizációjában.

#### 4. A PDZ-kötő szekvencia-hiányos mutáns lokalizációja

Megvizsgáltuk, hogy befolyásolja a „hosszú” PMCA4b variáns C-terminálisán található PDZ-kötő szekvencia illetve annak hiánya a fehérje sejten belüli lokalizációját. Olyan mutáns GFP-PMCA4b fehérjét állítottunk elő, amely C-terminálisáról hiányzik egy 6 aminosav hosszúságú, a PDZ-kötő szekvenciát is tartalmazó peptidszakasz (GFP-PMCA4b-ct6 mutáns). A GFP-hez kötött mutáns fehérjét és a teljes hosszúságú PMCA4b-t „rövid” formát tartalmazó, nem polarizált sejtekben (K562, Jurkat) és csak „hosszú” formát tartalmazó, polarizált sejtekben (N2A, COS-7) expresszáltuk. Konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a fehérje szubcelluláris lokalizációját. A GFP-PMCA4b-ct6 mutáns és a GFP-PMCA4b hasonló eloszlást mutatott. Mindkét fehérjére jellemző, hogy a transzfekciót követő 1. nap főleg intracelluláris kompartmentben helyezkedik el, és a 2. napon jelenik meg a plazmamembránban, ahol egyenletes, diffúz eloszlást mutat. *Tehát a PDZ-kötő szekvencia önmagában nem befolyásolta a PMCA plazmamembrán lokalizációját heterológ expressziós rendszerekben.*

#### 5. PMCA4b koexpressziója PDZ-fehérjékkel

Feltételeztük, hogy a vizsgált sejtek PDZ fehérje készlete nem elegendő, hogy a tranziens expressziót követően képződő nagyobb mennyiségű PMCA fehérjéhez kötődve befolyásolja annak viselkedését. Ezért a továbbiakban a PDZ-kötő szekvencia szerepét úgy tanulmányoztuk, hogy különféle sejtekben a PMCA4b fehérjével együtt fejeztük ki a PSD-95 (post-synaptic density-95) PDZ-fehérjét. Bár irodalmi adatok bizonyítják, hogy a PSD-95 kötődik a PMCA4b PDZ-kötő szekvenciájához, ennek a kölcsönhatásnak a  $Ca^{2+}$  ATPáz szubcelluláris lokalizációjára kifejtett hatása még nem ismert. Megvizsgáltuk, hogy az együttes expresszió befolyásolja-e a PMCA4b sejten belüli mozgását illetve lokalizációját.

##### ***A PSD-95 fehérje elősegíti a PMCA4b megjelenését a plazmamembránban***

Tranziens transzfektáltunk COS-7 sejteket GFP-hez kapcsolt PMCA4b-vel PSD-95 fehérjével együtt illetve nélküle, majd konfokális mikroszkóp segítségével a sejt közép magasságában készített optikai metszeten elemeztük a GFP-PMCA4b lokalizációját. A sejteket WGA-val jelöltük, fixáltuk, permeabilizáltuk, majd anti-PSD-95 ellenanyaggal, és fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyaggal tettük láthatóvá a PSD-95 fehérjét. A PMCA4b esetében a GFP szignált analizáltuk.

A PMCA4b plazmamembrán expresszióját úgy értékeltük, hogy kiszámítottuk a sejtek hány százaléka mutat detektálható PMCA jelet a plazmamembránban. Úgy találtuk, hogy a transzfekciót követő első napon a PSD-95 fehérje hiányában a PMCA4b szinte kizárólag intracelluláris kompartmentekben lokalizálódik. A sejteknek mindössze 14%-ában ( $14,3 \pm 1,3$ ) mutatott a PMCA4b plazmamembrán lokalizációt is. A transzfekciót követő második napon – bár még mindig megfigyelhető volt intracelluláris PMCA festődés – a sejtek 75%-ában ( $74,6 \pm 5,2$ ) már megjelent a plazmamembránban a  $Ca^{2+}$  ATPáz.

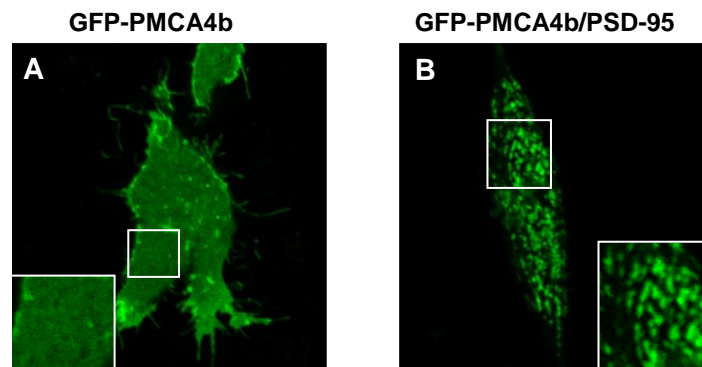
PSD-95-tel történő koexpresszió jelentősen megemelte a PMCA4b plazmamembrán expresszióját: a transzfekciót követő első napon már a sejtek közel 70%-ában ( $67,9 \pm 5,5$ ) megfigyelhető volt PMCA szignál a plazmamembránban, és két nappal a transzfekciót követően már szinte az összes sejtben ( $91,7 \pm 4,2$ ) kijutott a  $Ca^{2+}$  ATPáz a plazmamembránba. *Eredményeink azt bizonyítják, hogy a PSD-95 elősegíti a PMCA4b megjelenését a plazmamembránban.*

##### ***A PSD-95 jellegzetes szigetszerű PMCA4b eloszlást alakít ki a plazmamembránban***

Abból a célból, hogy alaposabban tanulmányozzuk a GFP-PMCA4b eloszlását a plazmamembránon belül, konfokális mikroszkóppal a COS-7 illetve N2A sejtek bazális – a fedőlemezzel érintkező – felszínéről készítettünk optikai metszeteket a transzfekciót követő második napon.

Az egyedül expresszált PMCA4b diffúz eloszlást mutatott a plazmamembránban. Megvizsgáltuk a PSD-95 szubcelluláris lokalizációját is ezekben a sejtekben. Irodalmi adatoknak megfelelően azt találtuk, hogy a PSD-95 mind a citoplazmában mind a plazmamembránban megjelenik, ahol diffúz eloszlást mutat [16].

Amennyiben PSD-95-tel együtt transzfektáltuk, a GFP-PMCA4b plazmamembránon belüli eloszlása lényegesen eltérő képet mutatott (3. ábra). A koexpresszió hatására a  $Ca^{2+}$  ATPáz szabálytalan alakú, szigetszerű csoportokba rendeződött. A „szigeteken” belül a PMCA4b és a PSD-95 fehérje kolokalizálódott.



3.ábra

PMCA4b „szigetek” kialakulása a PSD-95-tel történő kotranszfekció  
következtében N2A sejtekben

*2 nappal a transzfekciót követően PSD-95 nélkül (A) illetve PSD-95-tel együtt (B) transzfektált GFP-PMCA4b eloszlása N2A sejtek bazális plazma-membránjában.*

Ismert, hogy a PSD-95 fehérje az idegsejtek szinaptikus membránjában csoportokba képes rendezni ioncsatornákat illetve neurotranszmitter receptorokat [17, 18]. A PSD-95 fehérje-csoportokat kialakító képességét gyakran modell sejtekben (COS-7, HEK) vizsgálják, ahol – hasonlóan a PMCA4b-hez – szigetszerű struktúrák kialakulását indukálja [19-22]. A különféle fehérjepartnerek esetében azonban eltérő hatékonysággal működik ez a mechanizmus. Összehasonlításukra a „clustering efficiency”-t alkalmaztuk, ami megmutatja, hogy a koexpresszált sejtek hány százalékában alakul ki a szigetszerű rendezettség. A PMCA4b és a PSD-95 esetében ez több mint 90% ( $93 \pm 3.5\%$ ,  $n=150$ ), ami igen magas a többi fehérjéhez (csatornák, receptorok) képest (10% és 70% közötti adatokat írtak le [23-26]). A PDZ-kötő szekvenciát nem tartalmazó mutáns (GFP-PMCA4b-ct6) segítségével igazoltuk, hogy a PSD-95 fehérje PDZ-kölcsönhatáson keresztül fejt ki hatását. Amennyiben a PSD-95 fehérjét a GFP-PMCA4b-ct6 mutánssal expresszáltuk együtt COS-7 vagy N2A sejtekben, nem észleltük a vad típusú PMCA4b-re jellemző szigetszerű elrendeződés kialakulását. Ezekben a sejtekben mind a PMCA fehérje mind a PSD-95 – az egyedül kifejezett fehérjékre jellemző – diffúz eloszlást mutatott a plazmamembránban. A PMCA4b-ct6 eloszlását tehát nem befolyásolta a PSD-95 jelenléte, ami arra utal, hogy a várakozásnak megfelelően a PSD-95 fehérje PDZ kölcsönhatáson keresztül fejt ki hatását.

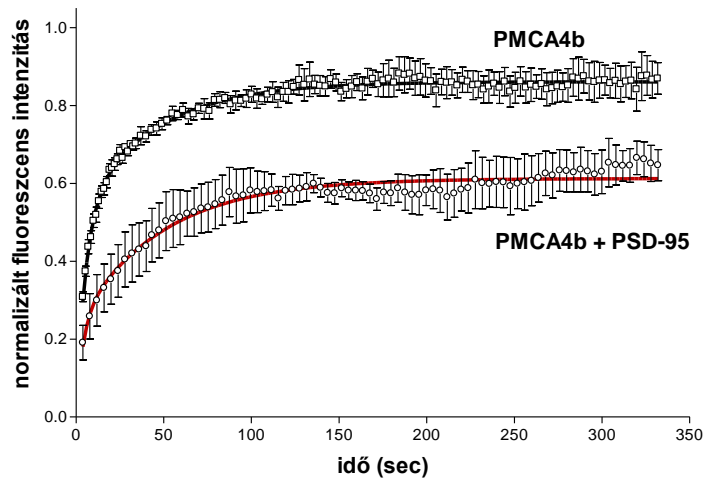
A PMCA4b lokalizációját hasonló módon befolyásolta egy másik PDZ-fehérjével, a PSD-93 (chapsyn 110) történő koexpresszió is.



Kísérleteinket elvégeztük nem GFP-vel jelölt PMCA4b fehérjével is. Ebben az esetben 5F10 anti-PMCA ellenanyaggal és fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyaggal tettük láthatóvá a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz-t. Szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk a GFP-hez kapcsolt, illetve a GFP nélküli fehérjék viselkedésében.

## 6. A PDZ-interakció hatása a PMCA4b laterális mobilitására

A fehérje-fehérje kölcsönhatások korlátozhatják a PMCA laterális mobilitását a plazmamembránban, ezért összehasonlítottuk a PMCA4b mobilitását a diffúz és a szigetszerű eloszlás esetében. A GFP-PMCA4b-t egyedül és PSD-95-tel együtt COS-7 sejtekben fejeztük ki, majd mobilitását a fotokioltság utáni fluoreszcencia visszatérés (FRAP) technika segítségével tanulmányoztuk. Hogy meghatározzuk a kezdeti fluoreszcencia intenzitást a plazmamembránban, a fotokioltság előtt 5 felvételt készítettünk a COS-7 sejtek bazális felszínéről. Ezután egy kör alakú területet (~2  $\mu\text{m}$  átmérőjű) nagy intenzitású 488 nm-es lézersugárral pásztáztunk, és így kioltottuk a területen belül található GFP-PMCA4b molekulák fluoreszcenciáját. A fotokioltság után a szokásos intenzitású lézersugárral sorozatfelvételt készítettünk, amelynek segítségével vizsgáltuk a mobilis fluoreszkáló GFP-PMCA4b molekulák beáramlását a vizsgált területre. A konfokális mikroszkóp Olympus Fluoview programja segítségével meghatároztuk a vizsgált terület átlagintenzitásának változását, majd az adatokat a kettős normalizálás ("double-normalization") módszerével [27] normalizáltuk a fotokioltság előtti kezdeti intenzitásra illetve a sorozatfelvétel közben bekövetkező enyhe mértékű fotokioltsárra. Az így nyert adatokra GraphPad Prism program segítségével exponenciális egyenletet illesztettünk, és így meghatároztuk a fluoreszcencia visszatérés kinetikai paramétereit.



4.ábra

### A fluoreszcencia visszatérés kinetikája a GFP-PMCA4b laterális mozgásának következtében PSD-95 nélkül illetve annak jelenlétében

*Normalizált fluoreszcencia intenzitásának változása időben a fotokioltsást követően. A PSD-95 nélkül transzfektált GFP-PMCA4b-vel nyert adatokat üres négyzettel, míg a PSD-95 mellett szigetszerű csoportokba rendeződött GFP-PMCA4b-vel kapott adatokat pedig üres körrel jelöltük. 5 kísérletből nyert adatokból számolt átlagértékek  $\pm$  S.D. vannak feltüntetve a grafikonon.*

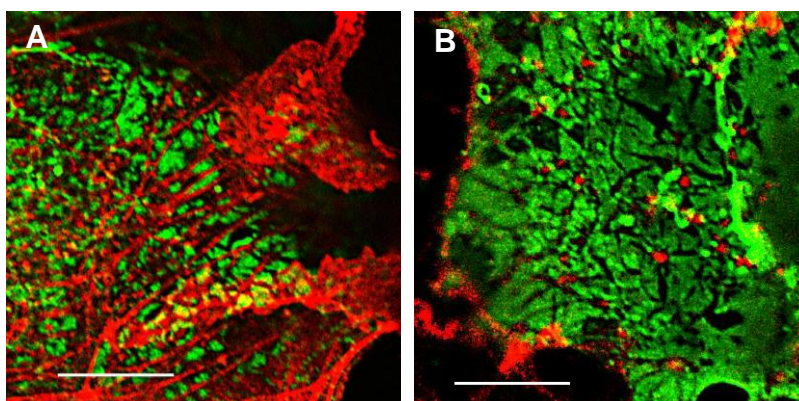
Az egyedül expresszált GFP-PMCA4b esetében a fluoreszcencia visszatérés nem volt teljes mértékű (az adatokból meghatározott mobilis frakció:  $0,81 \pm 0,06$ ). Ezenkívül a kísérleti adatokra nem illeszkedett egyszeres exponenciális függvény, kétszeres exponenciális függvényt kellett alkalmaznunk ( $\tau_1 = 5,43$  s,  $\tau_2 = 42,97$  s). A részleges fluoreszcencia visszatérés és a többkomponensű egyenlet szükségessége azt mutatja, hogy a GFP-PMCA4b molekulák mozgását nem egyszerű diffúzió határozza meg a plazmamembránban.

PSD-95 jelenlétében a FRAP adatokra az előzőekhez hasonlóan kétszeres exponenciális függvényt illesztettünk. Ahogy azt a 4. ábra is mutatja az eredeti fluoreszcens intenzitás még kevésbé tért vissza. Összehasonlítva, a ko-expresszált rendszerben a mobilis frakció:  $0,57 \pm 0,03$ , míg a PSD-95 nélkül expresszált PMCA4b esetén ez az érték  $0,81 \pm 0,06$ . Ennek ellenére az egyenlet időállandói nem különböztek lényegesen ( $\tau_1 = 3,78$  s,  $\tau_2 = 47,85$  s) a csak PMCA4b-t expresszáló sejtek vizsgálatából nyert kinetikai paraméterektől.

*Összefoglalva azt találtuk, hogy a GFP-PMCA4b molekula a PSD-95 jelenlétének köszönhetően szigetszerű csoportokba rendeződik és az immobilis frakciója jelentősen megemelkedik (~19%-ról ~43%-ra). Ez azt bizonyítja, hogy a PSD-95 részlegesen immobilizálja a PMCA4b molekulákat a sejt felszínen.*

## 7. A PMCA4b „szigetek” és az aktin citoskeleton kapcsolata

A „szigetekbe” szerveződött PMCA4b lassabb laterális mobilitása felvetette annak lehetőségét, hogy a plazmamembrán alatt található aktin citoskeleton befolyásolja a szigetszerű elrendeződésű PMCA4b molekulák mozgását. PSD-95-tel együtt kifejezett PMCA4b laterális mobilitását kétféle mechanizmussal lassíthatja az aktin hálózat. 1) Kihorgonyozhatja a fehérjét a sejt vázhoz vagy 2) főleg nagyobb multiprotein-komplexek kialakulásakor, kerítészerűen körbevéve („fence” modell [28]) akadályozhatja a mobilitást. A szigetszerű mintázat alapján úgy gondoljuk, hogy esetünkben az aktin hálózat kerítészerűen körbevéve gátolja a PMCA mozgását. Hogy megvizsgáljuk a PMCA4b és az aktin citoskeleton kapcsolatát, konfokális mikroszkóppal tanulmányoztuk a PMCA4b és az F-aktin lokalizációját PMCA4b-t és PSD-95 fehérjét együtt expresszáló COS-7 sejtek bazális felszínén. A PMCA4b-t 5F10 anti-PMCA ellenanyaggal és fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyaggal, az F-aktint TRITC-phalloidinnal jelöltük.



5. ábra

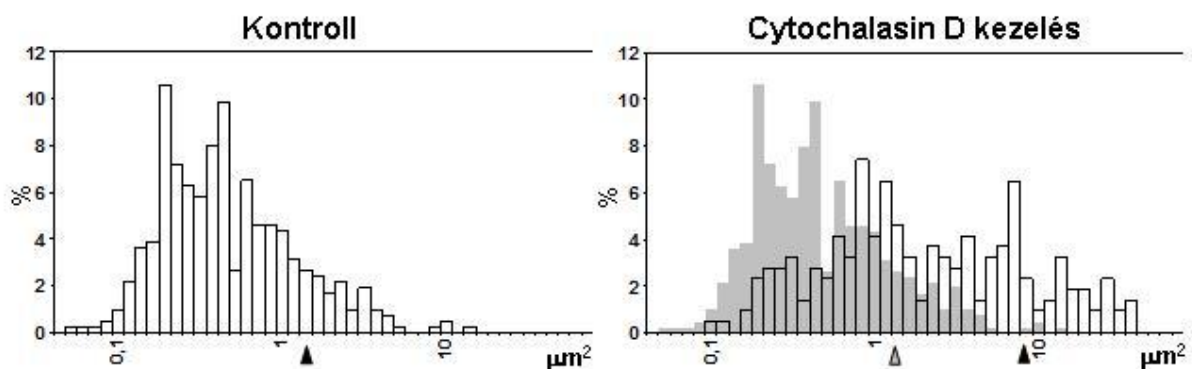
Aktinhálóval kerítészerűen körbevett PMCA4b csoportok COS-7 sejtekben, illetve megnövekedett méretű PMCA4b „szigetek” depolimerizált aktin citoskeleton mellett

*A PMCA4b „szigetek” (zöld) és az aktinháló (piros) elhelyezkedése bazális plazmamembránban kezeletlen (A) illetve Cytochalasin D-vel kezelt (B) COS-7 sejtekben.*

A PMCA4b „szigetek” és az F-aktin között nem figyeltünk meg kolokalizációt. A TRITC-phalloidin fluoreszcencia hiányzott a PMCA4b „szigetek” területéről. Csak a szigetek körül – kerítésszerűen elhelyezkedve – detektáltunk aktin filamentumokat. *Ez a tipikus elrendeződés alátámasztotta feltevésünket, hogy az aktin citoskeleton kerítésszerűen körbevéve gátolja a PMCA4b molekulák mozgását a plazmamembránban, és részt vesz a speciális PMCA4b csoportok kialakításában.*

Tovább vizsgáltuk az aktin citoskeleton hatását a PMCA4b szigetek stabilizálásában, ezért a PMCA4b /PSD-95 fehérjéket koexpresszáló COS-7 sejteket – aktin polimerizációt gátló – cytochalasin D-vel (végleges koncentráció: 2,5  $\mu\text{M}$ ) kezeltük. Az 5. ábrán látható, hogy a kezelés hatására a PMCA4b „szigetek” mérete jelentősen megnőtt. 500-500 sziget méretét határoztuk meg nem kezelt és cytochalasin D-vel kezelt sejtekben, majd az így kapott adatokat hisztogramon ábráztuk (6. ábra). Az aktin citoskeleton szétesésének hatására az átlag sziget méret mintegy 6-szorosára megnőtt. Cytochalasin D kezelés után a szigetek kb. 80%-a, míg a kezelés nélkül csak kb. 40%-a volt nagyobb mint 1  $\mu\text{m}^2$ . Az aktinháló szétesése valószínűleg lehetővé teszi kisebb „szigetek” összeolvadását, illetve hogy a PMCA4b molekulák szabadabb mozgásának következtében az egyes PMCA4b csoportok nagyobb területen helyezkedjenek el a plazmamembránban. *Ezek az adatok megerősítik, hogy az ép aktinháló jelentős szerepet játszik a PMCA4b szigetszerű elrendeződésének stabilizálásában.*

*A PDZ-kölcsönhatásoknak a PMCA4b izoforma irányításában játszott szerepéről jelenleg állítunk össze egy közlésre alkalmas anyagot, amelyet a közeljövőben publikálunk.*



6.ábra

A PMCA4b „szigetek” mérete kezeletlen és Cytochalasin D-vel kezelt COS-7 sejtek plazmamembránjában

*A hisztogramok a PMCA4b szigetek méretének változását mutatják Cytochalasin D kezelést követően (A, kezelés előtt; B, 10 perc 2,5 mM Cytochalasin D kezelés után). A nyílfejek az átlagértéket jelölik (kezeletlen sejtekben: 1,48  $\mu\text{m}^2$ , kezelt sejtekben: 8,93  $\mu\text{m}^2$ ). A „B” ábrán a szürke oszlopok és a szürke nyílfej a kezeletlen sejtekből nyert adatokat mutatják (megegyezik a kontroll „A” ábrával). A hisztogramok elkészítéséhez 3 kísérlet során 500-500 „sziget” területét határoztuk meg.*

## ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a PMCA4b sejten belüli mozgását a C-terminálison található összetett szabályozási rendszer befolyásolja: az intracelluláris kompartmentek felé irányító (savanyú régió, retenciós/internalizációs szignál) és a fehérje plazmamembránba való kijutását elősegítő (PDZ-kötő szekvencia) motívumok. A PDZ-kötő szekvencia szerepe meghatározónak bizonyult a PMCA4b plazmamembránon belüli eloszlásának szempontjából is. PDZ-fehérjék ezen a motívumon keresztül befolyásolhatják, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz mely speciális membrandoménben helyezkedjen el. Speciálisan vörsejtekben és egyéb nem polarizált sejtekben a PMCA4b elsődleges szerkezetének megváltozásával – a C-terminális lehasadásával – átalakul e szabályozási rendszer összetétele. Ennek eredményeképpen polarizált és nem polarizált sejtekben a PMCA4b variáns sejten belüli mozgása, eloszlása a plazmamembránban és ezáltal részvétele a  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitelben nagy mértékben különbözhet egymástól.

Ezek az eredmények új irányt adtak kutatásainknak. A hagyományos felfogás szerint a PMCA  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitelben betöltött aktuális szerepét komplexen szabályozott aktivitása határozza meg. Ezzel szemben az általunk javasolt új szemlélet szerint a megfelelő  $\text{Ca}^{2+}$  jel kialakításához a PMCA aktivitásának közvetlen szabályozásán túl a PMCA lokalizációjának finom szabályozására is szükség van. Bár a legújabb irodalmi adatok sorra bizonyítják, hogy a PMCA fehérjék speciális membránkompartmentben találhatóak, – amely lehetővé teszi, hogy adott  $\text{Ca}^{2+}$  szignalizációs doménen belül fejtsék ki hatásukat –, a PMCA lokalizációjának finom szabályozása, és ezen belül a C-terminális régióknak a fehérje sejten belüli irányításában játszott szerepe egy még igen kevésbé vizsgált terület. További kutatásaink során szeretnénk erre a területre összpontosítani, és feltárni, hogy az igen variábilis C-terminális régió egyes motívumai milyen szerepet játszanak a PMCA fehérjék dinamikus lokalizációjának szabályozásában.

Eredményeinket rövid időn belül (max. 2 év) tervezzük publikálni (kutatási anyagunk egy részét már elfogadták közlésre ([29], PSD-95 hatása a PMCA4b eloszlására)), ezért kérjük, hogy a jelentésben foglaltak alapján születtett minősítést az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa, figyelembe véve a később megjelent közleményeket.

## IRODALOMJEGYZÉK

1. Wang, K.K., A. Villalobo, and B.D. Roufogalis, *The plasma membrane calcium pump: a multiregulated transporter*. Trends Cell Biol, 1992. **2**(2): p. 46-52.
2. Penniston, J.T. and A. Enyedi, *Modulation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump*. J Membr Biol, 1998. **165**(2): p. 101-9.
3. Strehler, E.E., et al., *Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1099**: p. 226-36.
4. Strehler, E.E. and D.A. Zacharias, *Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 21-50.
5. Kim, E., et al., *Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase isoform 4b binds to membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins via their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domains*. J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1591-5.
6. DeMarco, S.J. and E.E. Strehler, *Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -atpase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21594-600.
7. Strehler, E.E., et al., *Peptide sequence analysis and molecular cloning reveal two calcium pump isoforms in the human erythrocyte membrane*. J Biol Chem, 1990. **265**(5): p. 2835-42.
8. Nakatsu, F. and H. Ohno, *Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network*. Cell Struct Funct, 2003. **28**(5): p. 419-29.

9. Crump, C.M., et al., *PACS-1 binding to adaptors is required for acidic cluster motif-mediated protein traffic*. *Embo J*, 2001. **20**(9): p. 2191-201.
10. Kottgen, M., et al., *Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation*. *Embo J*, 2005. **24**(4): p. 705-16.
11. Johnson, A.O., M.A. Lampson, and T.E. McGraw, *A di-leucine sequence and a cluster of acidic amino acids are required for dynamic retention in the endosomal recycling compartment of fibroblasts*. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**(2): p. 367-81.
12. Heilker, R., M. Spiess, and P. Crottet, *Recognition of sorting signals by clathrin adaptors*. *Bioessays*, 1999. **21**(7): p. 558-67.
13. Lavezzari, G., et al., *Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression*. *Neuropharmacology*, 2003. **45**(6): p. 729-37.
14. Goellner, G.M., S.J. DeMarco, and E.E. Strehler, *Characterization of PISP, a novel single-PDZ protein that binds to all plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase b-splice variants*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **986**: p. 461-71.
15. Sheng, M., *PDZs and receptor/channel clustering: rounding up the latest suspects*. *Neuron*, 1996. **17**(4): p. 575-8.
16. Kim, E., et al., *Clustering of Shaker-type K<sup>+</sup> channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases*. *Nature*, 1995. **378**(6552): p. 85-8.
17. Gomperts, S.N., *Clustering membrane proteins: It's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family*. *Cell*, 1996. **84**(5): p. 659-62.
18. Bats, C., L. Groc, and D. Choquet, *The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking*. *Neuron*, 2007. **53**(5): p. 719-34.
19. Ko, J. and E. Kim, *Clustering assay for studying the interaction of membrane proteins with PDZ domain proteins*. *Methods Mol Biol*, 2006. **332**: p. 245-53.
20. Kim, E., et al., *GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules*. *J Cell Biol*, 1997. **136**(3): p. 669-78.
21. Naisbitt, S., et al., *Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin*. *Neuron*, 1999. **23**(3): p. 569-82.
22. Sans, N., et al., *mPins modulates PSD-95 and SAP102 trafficking and influences NMDA receptor surface expression*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(12): p. 1179-90.
23. Kim, E. and M. Sheng, *Differential K<sup>+</sup> channel clustering activity of PSD-95 and SAP97, two related membrane-associated putative guanylate kinases*. *Neuropharmacology*, 1996. **35**(7): p. 993-1000.
24. Tiffany, A.M., et al., *PSD-95 and SAP97 exhibit distinct mechanisms for regulating K(+) channel surface expression and clustering*. *J Cell Biol*, 2000. **148**(1): p. 147-58.
25. Imamura, F., et al., *Ligand binding of the second PDZ domain regulates clustering of PSD-95 with the Kv1.4 potassium channel*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(5): p. 3640-6.
26. Wong, W., et al., *Cell surface targeting and clustering interactions between heterologously expressed PSD-95 and the Shal voltage-gated potassium channel, Kv4.2*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(23): p. 20423-30.
27. Phair, R.D., S.A. Gorski, and T. Misteli, *Measurement of dynamic protein binding to chromatin in vivo, using photobleaching microscopy*. *Methods Enzymol*, 2004. **375**: p. 393-414.
28. Kusumi, A., et al., *Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2005. **34**: p. 351-78.
29. Padányi, R., et al., *PSD-95 mediates membrane clustering of the human plasma membrane Ca(2+) pump isoform 4b*. *Biochim Biophys Acta. - Molecular Cell Research*, 2008 [Epub ahead of print], doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.11.007