

Betegséget okozó V2 vazopresszin receptor mutációk vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Erdélyi László Sándor

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Hunyady László, az MTA levelező tagja, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Zelena Dóra, Ph. D., tudományos főmunkatárs

Dr. Osváth Szabolcs Ph. D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Falus András, az MTA rendes tagja, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sármay Gabriella, az MTA doktora, egyetemi tanár

Dr. Zsembery Ákos, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2015.

Bevezetés

A G-fehérje kapcsolt receptorok (GFKR)

A GFKR-ok szupercsaládja az egyik legnagyobb fehérjecsalád az emlős genomban. Alapvető kommunikációs csatolók a sejten kívüli és sejten belüli tér információs egységének létrehozásában. Ezek a membránfehérjék közvetítik hormonok, parakrin faktorok és neurotranszmitterek sejtekre gyakorolt hatását, valamint a látás, szaglás és ízézés alapvető molekulái. A GFKR működésének alapja heterotrimer G-fehérje-függő jelátviteli utak aktiválása. A GFKR-ok ligand hiányában mutatott aktivitását nevezzük bazális vagy konstitutív aktivitásnak.

A deszenzitizáció (a GFKR szétkapcsolása a G-fehérjétől) és az internalizáció (a sejtfelszíni receptorszám csökkentése) alapvető szerepet játszanak a receptorok működésének szabályozásában. A homológ deszenzitizáció folyamata során G-fehérje receptor kinázok (GRK) foszforilálják a receptort, a következményes β -arresztin kötés sztérikusan gátolja a továbbiakban a G-fehérje kötést és aktiválást. Az aktivált arresztinek a receptor endocitózisához is vezetnek, valamint G-fehérje független jelátviteli utakat

aktiválnak a sejtekben. Az internalizáció azonban történhet β -arresztin független módon is: ebben az esetben az internalizáció érzéketlen domináns negatív β -arresztin jelenlétére, ugyanakkor domináns negatív dinamin hatékonyan gátolhatja.

A jelátvitel-szelektív agonizmus egyes receptor-ligand komplexek jellemzője, amelyek nem az adott sejtre jellemző jelátviteli kaszkádok teljes spektrumú kombinációit aktiválják (pl. G-fehérje aktiválás, deszenzitizáció-internalizáció, β -arresztin függő jelátvitel), hanem „elfogultak” egyes jelátviteli utak iránt, azokat szelektíven aktiválják. A receptorszekvenciában bekövetkező mutáció változtatja meg a fiziológias ligand kötésekor létrejövő konformációt (jelátvitel szelektív receptor), vagy a nem-természetes ligand kötése vezet ilyen konformációhoz.

A GFKR-ok által precízen szabályozott élettani folyamatokból következik, hogy e receptorok mutáció miatti funkcióváltozása betegségek kialakulásához vezethet. A mutációkat két csoportra oszthatjuk. Funkcióvesztő mutáció esetén a receptor bazális vagy ligand-indukált aktivitása csökken, illetve megszűnik. Funkciónyerők azok a mutációk, amelyek az egyébként alapaktivitással nem rendelkező

receptort konstitutív aktivitással ruházzák fel vagy a bazális aktivitást a vad típusú receptoréhoz képest növelik.

Az arginin-vazopresszin rendszer fiziológiája

A vízhomeosztázis szabályozásában kritikus szerepet játszik az arginin-vazopresszin (AVP) hormon. Az AVP fiziológiás és patofiziológiás hatásait GFKR-on hozza létre, a sejtélettani következményeket három receptor jelátviteli aktivitása biztosítja: az 1a típusú vazopresszin receptor (V1aR), 1b típusú vazopresszin receptor és 2-es típusú vazopresszin receptor (V2R) aktiválódhat.

Az erek falában kifejeződő V1aR hatására vazokonstrikció jön létre. A vese gyűjtőcsatornáiban található V2R alapvető szerepet játszik a vízhomeosztázis szabályozásában. A gyűjtőcsatorna epitél sejtjeinek vízpermeabilitását és így a koncentráls-hígítás szabályozását a V2R aquaporin (AQP) csatornák sejten belüli elhelyezkedésének regulációján keresztül végzi. A V2R AVP kötése adenilát-cikláz – cAMP (3'-5'-ciklikus adenosin-monofoszfát) – protein kináz A útvonalon keresztül az AQP2 plazmamembránon történő feldúsulásához vezet, a sejt vízpermeabilitása fokozódik.

Az arginin-vazopresszin rendszer patológiája

Az arginin-vazopresszin rendszer koncentrációs funkciójának alulműködési zavara a diabétesz inszpidusz (DI) betegségcsoport. Jellemzője a nagy mennyiségű napi vizelet, a hiposztenuria és a következményes polidipszia. Nefrogén diabétesz inszpidusz (NDI) betegségről beszélünk, ha a jelenlévő AVP hormon a vese célsejtek valamilyen defektusa miatt hatástalan. A veleszületett NDI genetikai alapja az *AVPR2* vagy *AQP2* génekben bekövetkezett mutáció. Az *AVPR2* gén mutációin alapuló NDI X-kromoszómához kötötten, recesszíven öröklődik (XNDI).

A V2R funkcióvesztésén alapuló XNDI háttérben álló mutációkat sejtelettani mechanizmus és funkció alapján csoportosítják. I. osztályúak azok a mutációk, amelyek esetén nincs effektív V2R protein szintézis. Ennek oka lehet a mRNS szintézisében, érésében és a transzlációjában is. A II. osztályra jellemző hogy az aminosav csere következtében a V2R nem képes felvenni a megfelelő konformációt, az ER (endoplazmás retikulum) minőségellenőrző rendszere a hibásan tekeredett V2R-t felismeri és visszatartja, az nem jut ki a plazmamembránra. A III. osztályra jellemző, hogy a receptor

csökkent funkciójú vagy funkcióképtelen. Egyik altípusában (IIIa.) a fiziológias hormon megkötését követően a mutáns receptor aktív konformációja csökkent G-fehérje kötéssel és/vagy aktiválási tulajdonsággal bír. A IIIb. altípus elégtelen funkciójú a csökkent ligandaffinitás következménye. Az R137H mutáció azonosítása szükségessé tette egy további (IV.) osztály létrehozását: a receptor agonista jelenléte nélkül, endocitózisra kerül és intracelluláris vezikulákban halmozódik.

Az arginin-vazopresszin rendszer túlműködési zavarát kóros antidiuretikus hormon szindrómának hívjuk (syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion- SIADH). A betegség hiponatrémiát okoz a túlzott AVP szekréció és a következményes vizeletkoncentráció miatt. A nefrogén kóros antidiurézis szindróma (nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis-NSIAD) egy közelmúltban feltárt betegség. A betegség kialakulásának a középpontjában a V2R funkciónyerő mutációja áll, a sejtekben jelentősen emelkedett a bazális (agonista stimulus nélküli) cAMP koncentráció. Az NSIAD-hoz vezető konstitutív aktivitás az R137C/L receptorok konstitutív β -arresztin kötésével és internalizációjával jár együtt. Jelenleg az R137C, R137L és F229V V2R mutációk ismertek, amely NSIAD-hoz vezetnek.

Célkitűzések

A V2R mutációk intenzív kutatásának ellenére létezhetnek ismeretlen és nem karakterizált mutációk. Mikroszkópos és funkcionális vizsgálatokkal a patológiás eltérés molekuláris mechanizmusa felderíthető, valamint az eredmények alapján terápiás stratégia is felvethető.

A dolgozatban bemutatott kísérletekben a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen genetikai eltérés mutatható ki a II. sz. Belgyógyászati Klinikán kezelt NDI-s betegben? Az eltérés milyen sejtélettani következményekkel jár, mi a betegség patomechanizmusa? Milyen terápiás stratégia lehet célravezető a konvencionális terápiára nem reagáló betegnél?
2. Van-e hatása a receptor funkcióra egy németországi családban azonosított, eddig nem ismert, NSIAD betegséghez vezető V2R mutációnak? Milyen tulajdonságokkal jellemezhető a mutáció miatt létrejövő receptor konformáció? Milyen terápiás módszer jöhet szóba a mutációt hordozó család esetében?

Módszerek

Genomiális DNS szekvenálás

A II. sz. Belgyógyászati klinika NDI-os betegének vizsgálatát írásos, tájékozott beleegyezését követően kezdtük el. A genomiális DNS izolálása perifériás vér fehérvérsejtjeiből történt DNS izolációs kit segítségével. A genomiális DNS-ből PCR-rel két részletben sokszorosítottuk az *AVPR2* gént. A PCR minták méretét agaróz gélen futtatással ellenőriztük. A PCR termékeket tisztítást követően mindkét irányba szekvenáltattuk.

Plazmid konstrukciók elkészítése

A jelöletlen, vad típusú V2R plazmidjának elkészítésekor a szekvenciáját pcDNA3.1 vektorba illesztettük. A HA-V2R (HA-jelölt V2 vazopresszin receptor) elkészítésekor hasonlóan jártunk el, azonban a PCR segítségével a receptortól 5' irányban elhelyeztük az influenza hemagglutinin antigénjét. A V2R-Sluc konstrukciók elkészítéséhez a receptor szekvenciáját a szuper *Renilla* luciferázt tartalmazó pEYFP-N1 vektorba illesztettük. A V2R-mVenus létrehozásakor az előzőekben foglaltak szerint jártunk el, a terméket azonban az mVenus

szekvenciát tartalmazó pEYFP-N1 vektorba jutattuk. A receptor konstrukciók N321K és I130N variánsait site directed mutagenézis segítségével hoztuk létre. A módszer során a mutáns receptor inzertet az eredeti plazmidba illesztettük vissza. A módszer segítségével csak a kívánt szakaszon következett be – ellenőrzött körülmények között - mutáció. Az Epac-BRET szenzorhoz kiindulásként az ^TEPAC^{vv}-konstrukciót használjuk. A mTurquoise szekvenciájának lecseréléséhez Sluc-ot használtunk fel. Valamennyi plazmidot elkészítését követően az automatizált szekvenálással ellenőriztük.

Sejtkultúra fenntartás és a sejtek transzfekciója

A kísérleteinkben használt HEK-293 (humán embrionális vese) sejteket inkubátorban tenyésztettük. A sejtek transzfekciója során poli-L-lizinnel előkezelt lemezekkel vagy fedőlemezekkel dolgoztunk. A transzfekciós oldatok a plazmid konstrukciókat, valamint Lipofectamine 2000TM transzfekciós reagenst tartalmazták. A protokoll szerint a méréseket 24 órával a transzfekciót követően végeztük.

Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések

Kísérleteinkben a cAMP szint monitorozására az Epac-BRET konstrukciót használtuk. A BRET hányados csökkenése ezekben a kísérletekben ezért a cAMP koncentrációjának emelkedésére utal. A sejtek transzfekciója során poli-L-lizinnel előkezelt 96-lyukú lemezzel dolgoztunk. A BRET kísérleteket Berthold Mithras LB 940 készülékkel. A mérés kezdetén a sejtekhez adtuk a cöclenterazin h-t.

A β -arresztin kötési vizsgálat során a receptorok mVenus, a β -arresztin2 Rluc jelölésekkel voltak ellátva. A BRET hányados emelkedése a β -arresztin receptorhoz történő kihelyeződésére utal.

Az internalizációt BRET-tel vizsgálatuk. Az MP-YFP konstrukció a plazmamembránt jelöli a sárga fluoreszcens fehérjével, a receptorok Sluc donort tartalmaztak. A BRET hányados a receptorok plazmamembrántól mérhető távolságától függ, internalizációkor csökken.

Konfokális lézermikroszkópia

A konfokális lézermikroszkópos vizsgálatokat eltérő módon végeztük a dolgozatban bemutatott két mutáns V2R esetében.

N321K: A sejteket a transzfekció előtt 24 órával poli-L-lizinnel előkezelt fedőlemezekre helyeztük. A transzfekció során HA-jelölt receptor konstruktot vagy üres pcDNA3.1 plazmidot adtunk a sejtekhez. A fixálást 4%-os paraformaldehid hozzáadásával végeztük. Mosást követően az immunfestéshez anti-HA-Alexa488 antitestet használtunk, amit szapponin jelenlétében vagy hiányában adtunk a sejtekhez. A jelölt receptorokat Zeiss LSM 510 konfokális lézermikroszkóppal vizsgáltuk.

I130N: Immunfestéshez történő transzfekció során NLS-mRFP-t, valamint HA-jelölt receptor konstruktot vagy üres pcDNA3.1 plazmidot adtunk a sejtekhez. Fixálás nélkül 4°C-on anti-HA-Alexa488 antitesttel festettük a sejteket. A kolokalizációs kísérletekben receptor-mVenus konstrukciót, NLS-mRFP és MP-Cerulean plazmidot használtunk. A sejteket szobahőmérsékleten, Krebs-Ringer oldatban vizsgáltuk.

Áramlási citometria

A sejteket a transzfekció előtt 24 órával fedőlemezekre helyeztük. A transzfekció során HA-jelölt receptor DNS-t vagy üres pcDNA3.1 plazmidot adtunk a sejtekhez. Jéghideg PBS oldattal mostuk a sejteket, majd anti-HA-Alexa488 antiesttel festettünk. Az áramlási citometria vizsgálatokat Beckman-

Coulter SC készüléssel végeztük. A fluoreszcencia intenzitás méréseket WinMDI v2.9 programmal értékeltük.

Miográfia

Az egerek mellkasi aortáját eltávolítottuk, majd Krebs oldatba helyeztük. Az aorta gyűrűket többszörös izometrikus miográf készüléken vizsgáltuk. Az aortaszegmentek integritását és funkcionalitását magas K^+ koncentrációjú Krebs oldattal-, az erek ellazulási képességét acetil-kolin hozzáadásával teszteltük.

A kísérletek során felhasznált programok és statisztikai elemzés

A plazmidok tervezéséhez Vector NTI szoftvert használtunk. A kísérletes eredmények ábrázolásához, dózis-hatás görbék nem-lineáris regressziójához, valamint a statisztikai analízishez GraphPad Prism 5 programot használtunk. Az áramlási citometriás mérések során egymintás t-próbát végeztünk. Az egyes agonisták pEC_{50} (félmaximális effektív koncentráció logaritmus) értékeit egyutas varianciaanalízissel és Tukey post hoc teszttel hasonlítottuk össze. A BRET mérések során kétutas varianciaanalízist, illetve Bonferroni post hoc tesztet végeztünk.

Eredmények

Az N321K mutáció azonosítása

A fiatal férfi beteg születésétől kezdve poliuriában és polidipsziában szenved, 18 hónapos korában felállították az NDI diagnózisát. Az *AVPR2* gén szekvenálása egy misszensz mutációt igazolt. A citozin-guanin szubsztitúció aszparagin-lizin cserét okoz (N321K). A DI tünetei legalább 3 generáción keresztül jelen voltak a családban.

Az N321K-V2R sejten belüli elhelyezkedése

Az N321K-V2R plazmamembránon való megjelenése a vad típuséhoz nagyon hasonló képet mutatott. A permeabilizált sejtekben markáns intracelluláris fluoreszcencia volt látható. Ezen adatok alapján az N321K-V2R kijut a sejtek plazmamembránjára. A sejtfelszíni receptorszám kvantifikálására áramlási citometria méréseket végeztünk. A vad típusú és a mutáns receptort kifejező sejtek relatív fluoreszcens intenzitása megerősíti, hogy az N321K-V2R plazmamembrán expressziója hasonló mértékű a vad típuséhoz.

Az N321K-V2R hatása a cAMP szintézisre

A cAMP koncentrációt Epac-BRET szenzorral mértük, a bazális BRET hányados magasabb volt az N321K-V2R-t kifejező sejtekben, mint a vad típusút kifejezőkben. Az AVP stimulusra bekövetkező cAMP szint emelkedésének amplitúdója a két receptor esetében hasonló, az aktivációs kinetika jelentősen különbözik.

Meghatároztuk az AVP hatás dózis-hatás görbáját vad típusú és N321K mutáns receptoron. A maximális BRET változás hasonló volt a két receptor esetében, azonban az AVP hatáserőssége jelentősen csökkent volt az N321K mutáns receptoron a vad típushoz képest. AVP analóg dDAVP stimulust követően nem volt mérhető cAMP termelődés a mutáns receptort kifejező sejtekben.

Az N321K-V2R internalizációs tulajdonságai

A vad típusú receptor β -arresztin 2-vel történő interakcióját AVP stimulus hatására az mVenus jelölt receptor és β -arresztin2-Rluc interakciójakor létrejövő BRET hányados emelkedése jelzi. A receptorok β -arresztin 2 kötésének dózis-hatás görbéjének felvétele során szuprafiziológiás AVP koncentrációk esetében sem tudunk β -arresztin 2 kötést mérni az N321K-V2R-mVenus konstrukciót kifejező sejtekben.

A receptorok internalizációs kinetikáját BRET technikával vizsgáltuk. A BRET hányados ebben az esetben a nem-specifikus rezonancia energiatranszfert mérte, amely a receptor és a plazmamembrán távolságától függ. A vad típusú V2R-t kifejező sejtek AVP-vel történő stimulációja sejtfelszíni receptorok internalizációját és endoszómális kompartmentekbe helyeződését mutatta. Az N321K mutáns esetében jelentősen kisebb mértékű internalizációt mértünk.

Az N321K-V2R agonista érzékenysége vizsgálata

Kereskedelmi forgalomban hozzáférhető, ismert V2R ligand peptideket vizsgáltunk kísérleteinkben. A dózis-hatás görbéket a receptorokat és a cAMP mérésére alkalmas Epac-BRET próbát tranziensen kifejező HEK-293 sejtekben vettük fel. A vizsgált peptidek közül a dVDAVP hatáserőssége volt a legnagyobb a mutáns receptoron a cAMP jel létrehozásában. A dVDAVP V1R-függő vazokonstriktor hatását miográfiával vizsgáltuk izolált egér artériákon. A dVDAVP még 10^{-5} M koncentrációban sem hozta létre ezt a hatást.

Az I130N-V2R sejten belüli elhelyezkedése

Egy korábban ismeretlen, nem karakterizált mutáns receptort vizsgáltunk. A konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy az

mVenus-jelölt mutáns receptort kifejező sejtek intracelluláris fluoreszcenciája a vad típust kifejező sejtekéhez hasonló. Azonban az I130N-V2R plazmamembrán elhelyezkedése kevésbé hangsúlyos a vad típushoz viszonyítva. Ugyanakkor a nem-permeabilizált, HA-I130N-V2R-t kifejező sejtek egyértelmű plazmamembrán festődést mutattak, jelezve, hogy a mutáns receptor kijut a sejtfelszínre.

Az I130N-V2R hatása a cAMP szintézisre

A BRET alapú cAMP monitorizálás során az I130N-V2R a vad típushoz képest emelkedett bazális cAMP koncentrációt mutatott, amely fokozott aktivitásra utal. Inverz agonista tolvaptan hozzáadása az I130N mutáns esetében csökkentette a cAMP koncentrációt. Ugyanezen receptorok az AVP stimulációra nagymértékű cAMP szintemelkedéssel válaszolnak.

Az I130N-V2R plazmamembrán elhelyezkedésének vizsgálata

Áramlási citometriás mérések során az I130N-V2R plazmamembrán jelenléte kisebb volt, mint a vad típusé.

A plazmamembrán jelenlét változásainak monitorizálásához a BRET technikát alkalmaztuk, amely során

receptor-plazmamembrán távolságot mértük. A bazális BRET hányados alacsonyabb volt az I130N-V2R-Sluc konstrukciót kifejező sejtekben. Tolvaptan adását követően az I130N-V2R növekvő plazmamembrán megjelenést mutatott. AVP adását követően az I130N-V2R plazmamembrán megjelenése csökkent.

Az I130N-V2R internalizációs tulajdonságai

Az I130N-V2R bazális és agonista-indukált β -arresztin2 kötését BRET módszerrel vizsgáltuk. A sejtek bazális BRET hányadosa között nem volt különbség. AVP kezelés hatására megnövekedett a BRET hányados, amely β -arresztin2 kötés azonban elmarad a vad típusétól.

Domináns negatív dinamin1 (DNdyn1) hatását vizsgáltuk a mutáns receptor plazmamembrán jelenlétére BRET technikával. A DNdyn1-et kifejező sejtek magasabb bazális BRET hányadost mutattak, mint a vad típusú dinamint kifejezők. Tolvaptan adását követően az I130N-V2R növekvő plazmamembrán megjelenést mutat, amely kevésbé jelenik meg a DNdyn1-et kifejező sejtekben.

A domináns negatív dinamin mutáns receptorok bazális cAMP termelésére kifejtett hatását is vizsgáltuk. Az Epac-BRET, I130N-V2R és DNdyn1 konstrukciókat kifejező sejtekben alacsonyabb cAMP koncentráció volt mérhető, mint

a kontroll sejtekben. A sejteket egymást követően tolvaptannal, majd AVP-vel kezelve azonban a dinamin konstrukciók nélküli sejtekben mért válaszhoz hasonló eredményeket kapunk

Következtetések

Genetikai vizsgálattal a V2R N321K aminosav cseréjét azonosítottunk. Vizsgálataink alapján az N321K-V2R kifejeződik a sejtek plazmamembránján, a vad típusú receptorhoz hasonló mennyiségben. A mutáns V2R bazális cAMP termelése elmarad a vad típusú receptorétól, AVP stimulus esetén jelentősen csökkent hatáserősséget mutatott. Az N321K-V2R internalizációs kinetikája a vad típusú receptorhoz képest csökkent mértékű. A mutáció a V2R eltérő agonista érzékenységéhez vezet. A dVDAVP képes a mutáns receptort olyan koncentrációban aktiválni, amely nem hoz létre V1R mediált vazokonstriktiót.

Az NSIAD betegség fenotípusát létrehozó I130N mutáció funkciónyerő mutáció. Az I130N-V2R kijut a sejtek felszínére, de kisebb mennyiségben, mint a vad típusú receptor. Funkcionális vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a mutáns receptor emelkedett bazális cAMP termeléshez vezet a

sejtekben, amely tolvaptannal gátolható, AVP adásával fokozható volt. Az emelkedett bazális aktivitás az I130N-V2R konstitutív internalizációjával jár együtt, amely β -arresztin2-független, de dinamin-függő. Eredményeink alapján a mutáció jelátvitel-szelektív konformációt hoz létre.

Saját közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Erdélyi LS, Mann WA, Morris-Rosendahl DJ, Groß U, Nagel M, Várnai P, Balla A, Hunyady L. Mutation in the V2 vasopressin receptor gene, AVPR2, causes nephrogenic syndrome of inappropriate diuresis KIDNEY INTERNATIONAL Article in Press: doi: 10.1038/ki.2015.181. (2015) **IF: 8,563** (*megosztott elsőszerezős közlemény*)

Erdelyi LS, Balla A, Patocs A, Toth M, Varnai P, Hunyady L. Altered agonist sensitivity of a mutant V2 receptor suggests a novel therapeutic strategy for nephrogenic diabetes insipidus. MOLECULAR ENDOCRINOLOGY 28:(5) pp. 634-643. (2014) **IF: 4,022**

Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények

Szakadati G, Toth AD, Olah I, **Erdelyi LS**, Balla T, Varnai P, Hunyady L, Balla A. Investigation of the fate of type I angiotensin receptor after biased activation MOLECULAR PHARMACOLOGY 87:(6) pp. 972-981. (2015) **IF: 4,128**

Szalai B, Hoffmann P, Prokop S, **Erdélyi LS**, Várnai P, Hunyady L. Improved methodical approach for quantitative BRET analysis of G protein coupled receptor dimerization PLOS ONE 9:(10) Paper e109503. (2014) **IF: 3,234**

Balla A, Toth D, Soltesz-Katona E, Szakadati G, **Erdelyi LS**, Varnai P, Hunyady L. Mapping of the localization of type I angiotensin receptor in membrane microdomains using bioluminescence resonance energy transfer-based sensors. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 287:(12) pp. 9090-9099. (2012) **IF: 4,651**

Balla A , **Erdelyi LS**, Soltesz-Katona E, Balla T, Varnai P, Hunyady L. Demonstration of angiotensin II-induced Ras activation in the trans-Golgi network and the endoplasmic reticulum using BRET-based biosensors. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 286:(7) pp. 5319-5327. (2011) **IF: 4,773**