

# A plazmamembrán foszfoinozitidek szerepének vizsgálata Ras fehérjék plazmamembrán lokalizációjának és működésének szabályozásában

Doktori értekezés

**Dr. Gulyás Gergő**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Kenessey István, Ph.D., klinikai szakorvos  
Dr. Czifra Gabriella, Ph.D., tudományos munkatárs

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

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

Budapest  
2017.

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
1 Rövidítések jegyzéke .....	5
2 Bevezetés .....	11
2.1 A perifériás plazmamembrán (PM) fehérjék lokalizációjának biztosításában szerepet játszó tényezők .....	11
2.2 A foszfoinozítidek anyagcseréje emlős sejtekben .....	15
2.2.1 A foszfoinozítidek szerkezete.....	15
2.2.2 A foszfoinozítidek általános funkciói.....	16
2.2.3 Az egyszeresen foszforilált foszfoinozítidek metabolizmusa, sejten belüli elhelyezkedése és szerepe a sejtek működésében.....	17
2.2.4 A kétszeresen foszforilált foszfoinozítidek metabolizmusa, sejten belüli elhelyezkedése és szerepe a sejtek működésében.....	19
2.2.5 A háromszorosan foszforilált foszfoinozítidek metabolizmusa, sejten belüli elhelyezkedése és szerepe a sejtek működésében.....	22
2.2.6 A G <sub>q</sub> -fehérjéhez kapcsolt 7-TM receptorok aktivációja során bekövetkező változások a PM PPIns-ek anyagcseréjében.....	24
2.2.7 A tirozin-kináz receptorok aktivációja során bekövetkező változások a PM PPIns-ek anyagcseréjében .....	25
2.3 A Ras fehérjék szerepe a sejtek működésében .....	26
2.3.1 A Ras fehérjék általános jellemzése .....	26
2.3.2 A Ras fehérjék membrán-lokalizációjának kialakulása.....	27
2.3.3 A Ras fehérjék által elindított jelátviteli útvonalak.....	30
2.4 A kapacitatív kalcium-beáramlás (SOCE) szerepe és szabályozása emlős sejtekben .....	32
3 Célkitűzések .....	35
4 Módszerek .....	36
4.1 A kísérletek során használt anyagok .....	36
4.2 Plazmidkonstrukciók .....	36
4.3 Alkalmazott sejtvonalak .....	38
4.4 Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések .....	39

4.5	Konfokális mikroszkópia.....	41
4.6	Sejtpermeabilizációs kísérletek .....	42
4.7	[ <sup>3</sup> H]-Leucin beépülési vizsgálat .....	42
4.8	Statisztikai analízis .....	43
5	Eredmények.....	44
5.1	A plazmamembránhoz kötődő fehérjék sejten belüli mozgásának követésére használt energiatranszfer alapú módszer beállítása .....	44
5.2	A PM PPIs tartalmának akut manipulálása .....	47
5.3	A PM foszfoinozítid-depléciója után bekövetkező változások a perifériás PM fehérjék intracelluláris elhelyezkedésében .....	51
5.4	A Venus-K-Ras-CAAX fehérje útvonalának vizsgálata a PM-ről a Golgi membránjára történő áthelyeződés során .....	55
5.5	A Golgi PtdIns4P tartalmának szerepe a Venus-K-Ras-CAAX fehérje lokalizációjának szabályozásában .....	58
5.6	A Venus-K-Ras-CAAX fehérje PM kötésének további vizsgálata: az elektrosztatikus interakció, vagy egyes lipidek a fontosak?.....	60
5.7	A PM lipid-deplécióját követően kialakuló változások a teljes hosszúságú K- és H-Ras fehérje intracelluláris elhelyezkedésében.....	62
5.8	A K-Ras fehérje sejten belüli elhelyezkedésének változása G <sub>q</sub> -fehérjét aktiváló muszkarinos M <sub>3</sub> -as acetilkolin és EGF receptorok stimulációja esetén .....	64
5.9	A PM lipid-depléciójának hatása a K- és H-Ras fehérjék által indukált fokozott sejtproliferációra.....	68
5.10	A PM lipid-depléciójának hatása a sejtek Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> - és Ca <sup>2+</sup> -válaszára G <sub>q</sub> -fehérjét aktiváló AT <sub>1</sub> -es angiotenzin II receptor stimulálását követően.....	70
5.11	A PM lipid-depléciójának hatása a sejtek thapsigarginnal kiváltott Ca <sup>2+</sup> -válaszára .....	74
6	Megbeszélés.....	77
7	Következtetések.....	87
8	Összefoglalás .....	88
9	Summary.....	89
10	Irodalomjegyzék .....	90

11	Saját publikációk jegyzéke .....	111
12	Köszönetnyilvánítás .....	112

## 1 Rövidítések jegyzéke

7-TM	7-transzmembrán (7-transmembrane)
AngII	angiotenzin II (angiotensin II)
AP2	adaptor protein 2
APT	acil-protein tioészteráz
Arf	ADP-ribozilációs faktor
Arf1	ADP-ribozilációs faktor 1
Arp2	aktinnal összefüggő fehérje 2 (aktin-related protein 2)
Arp3	aktinnal összefüggő fehérje 3 (aktin-related protein 3)
AT1R	1-es típusú angiotenzin II receptor
Bad	Bcl-2 asszociált halál promóter (Bcl-2-associated dead promoter)
Bcl-X <sub>L</sub>	B-sejt limfoma-extra nagy (B-cell lymphoma-extra large)
BRET	biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer
Btk	bruton tirozin kináz
CAD	CRAC aktivációs domén (CRAC activation domain)
CC1	coiled-coil régió 1 (coiled coil region-1)
Cdc42	sejtosztódást irányító protein 42 (cell division control protein 42)
CPD-DAG	citidin-difoszfát-diacilglicerol
CRAC	kalcium felszabadulás aktivált csatorna (calcium-release activated channel)
DAG	diacilglicerol
DMSO	dimetil-sulfoxid
EE	korai endoszóma (early endosome)
EEA1	korai endoszóma antigén 1 (early endosome antigen 1)
EGF	epidermális növekedésifaktor (epidermal growth factor)
EGFR	epidermális növekedésifaktor-receptor (epidermal growth factor receptor)
ER	endoplazmás retikulum
Erk	extracelluláris szignál szabályozott kináz (extracellular signal-regulated kinase)
Erk1	extracelluláris szignál szabályozott kináz 1
Erk2	extracelluláris szignál szabályozott kináz 2

FKBP	FK506 kötő fehérje (FK506 binding protein)
FRB	FKBP-rapamycin-kötő domén(FKBP-rapamycin-binding domain)
FOXO	Forkhead box fehérje O (Forkhead box protein O)
FTASE	farnezil-transzferáz
FYVE	<b>F</b> ab1, <b>Y</b> OTB, <b>V</b> ac1, <b>E</b> EA1-domén
GAP	GTP-áz aktiváló fehérje (GTPase activating protein)
GEF	guanin nukleotid kicserélő faktor (guanine nucleotid exchange factor)
GDP	guanozin-difoszfát
GGTASE-I	geranylgeranyl-transzferáz I
GPCR	G-fehérje kapcsolt receptor (G-protein coupled receptor)
Grb2	növekedési faktor receptor kötő fehérje 2 (growth factor receptor-bound protein 2)
GSK3	glikogén szintáz kináz 3 (glycogen synthase kinase 3)
GTP	guanozin-trifoszfát
H-Ras	Harvey patkány szarkóma (Harvey Rat sarcoma)
hVPS34	humán III-as típusú foszfatidil-inozitol 3-kináz (human type-III phosphatidylinositol 3-kinase)
ICMT	izoprenilcisztein-karboxil metiltranszferáz
ING2	növekedést gátló fehérje 2 (inhibitor of growth protein 2)
INPP4A	inozitol polifoszfát 4-foszfátáz A (inositol polyphosphate 4-phosphatase A)
INPP4B	inozitol polifoszfát 4-foszfátáz B (inositol polyphosphate 4-phosphatase B)
INPP5B	inozitol polifoszfát 5-foszfátáz B (inositol polyphosphate 5-phosphatase B)
INPP5E	inozitol polifoszfát 5-foszfátáz E (inositol polyphosphate 5-phosphatase E)
INPP5J	inozitol polifoszfát 5-foszfátáz J (inositol polyphosphate 5-phosphatase J)
INPP5K	inozitol polifoszfát 5-foszfátáz K (inositol polyphosphate 5-phosphatase K)

Ins(1,4,5) $P_3$	inozitol 1,4,5-triszfoszfát
I $\kappa$ k	interleukin-2-indukált T-sejt kináz (interleukin-2 induced T-cell kinase)
K-Ras	Kirsten patkány szarkóma (Kirsten Rat sarcoma)
KSR-1	a Ras kináz szupresszora 1 (kinase supressor of Ras 1)
LactC2	lactadherin C2 domén
Lck	limfocita-specifikus protein tirozin-kináz (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase)
M3R	3-as típusú muszkarinos acetilkolin-receptor
M-Ras	izom típusú Ras homológ (muscle Ras oncogen homolog)
MAPK	mitogén aktivált protein kináz (mitogen activated protein kinase)
MARCKS	mirisztoilált alanin-gazdag C-kináz szubsztrát (myristoylated-alanine-rich C-kinase substrate)
MEK1	MAPK/ERK kináz 1
MEK2	MAPK/ERK kináz 2
MTM3	miotubularin-függő protein 3 (myotubularin-related protein 3)
mTOR	a rapamycin emlős célpontja domén (mammalian target of rapamycin domain)
N-Ras	neuroblasztóma patkány szarkóma (neuroblastoma Rat sarcoma)
OCRL1	Lowe okulocerebrorenális szindróma fehérje 1 (Lowe oculocerebrorenal syndrome protein 1)
Opy1	túlprodukción indukált feromon-ellenálló élesztő fehérje 1 (Overproduction-induced pheromone-resistant yeast protein 1)
ORD	OSBP-függő domén (OSBP-related domain)
OSBP	oxiszterol-kötő fehérje (oxysterol-binding protein)
ORP	OSBP-függő fehérje (OSBP-related protein)
ORP5	OSBP-függő fehérje 5
ORP8	OSBP-függő fehérje 8
PAT	palmitoil-aciltranszferáz
PBD	polibázikus domén
PDE $\delta$	foszfodiesteráz $\delta$
PDK1	foszfoinozítid-dependens kináz-1

PDZ	PSD95, Dlg1, zo-1 domén
PH	pleckstrin homológia
PI3K	foszfatidil-inozitol 3-kináz (phosphatidylinositol 3-kinase)
PI4KA	III-as típusú foszfatidil-inozitol 4-kináz $\alpha$ (type-III phosphatidylinositol 4-kinase $\alpha$ )
PI4KB	III-as típusú foszfatidil-inozitol 4-kináz $\beta$ (type-III phosphatidylinositol 4-kinase $\beta$ )
PI4KII $\alpha$	II-es típusú foszfatidil-inozitol 4-kináz $\alpha$ (type-II phosphatidylinositol 4-kinase $\alpha$ )
PI4KII $\beta$	II-es típusú foszfatidil-inozitol 4-kináz $\beta$ (type-II phosphatidylinositol 4-kinase $\beta$ )
PIKfyve	FYVE ujjat-tartalmazó foszfoinozítid-kináz
PIP5K $\alpha$	foszfatidil-inozitol 4-foszfát 5-kináz $\alpha$ (phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase $\alpha$ )
PIP5K $\beta$	foszfatidil-inozitol 4-foszfát 5-kináz $\beta$ (phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase $\beta$ )
PIP5K $\gamma$	foszfatidil-inozitol 4-foszfát 5-kináz $\gamma$ (phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase $\gamma$ )
PJ	Pseudojanin
PKB	protein kináz B
PKC	protein kináz C
PLC	foszfolipáz C
PLC $\beta$	foszfolipáz C $\beta$
PLC $\delta$ 1-PH	foszfolipáz C $\delta$ 1 pleckstrin homológia domén
PLC $\gamma$	foszfolipáz C $\gamma$
PLD	foszfolipáz D
PM	plazmamembrán
PMA	forbol 12-mirosztát 13-acetát
PPIns	foszfoinozítid
PtdIns	foszfatidil-inozitol
PtdIns3P	foszfatidil-inozitol 3-foszfát (phosphatidylinositol 3-phosphate)
PtdIns4P	foszfatidil-inozitol 4-foszfát (phosphatidylinositol 4-phosphate)



PtdIns5 <i>P</i>	foszfatidil-inozitol 5-foszfát (phosphatidylinositol 5-phosphate)
PtdIns(3,4) <i>P</i> <sub>2</sub>	foszfatidil-inozitol 3,4-biszfoszfát (phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate)
PtdIns(3,5) <i>P</i> <sub>2</sub>	foszfatidil-inozitol 3,5-biszfoszfát (phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate)
PtdIns(4,5) <i>P</i> <sub>2</sub>	foszfatidil-inozitol 4,5-biszfoszfát (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)
PtdIns(3,4,5) <i>P</i> <sub>3</sub>	foszfatidil-inozitol 3,4,5-triszfoszfát (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate)
PtdSer	foszfatidil-szerin (phosphatidylserine)
PTEN	foszfatáz és tensin homológ fehérje (phosphatase and tensin homology protein)
PX	phox homológ domén
R-Ras	Ras-függő protein R-Ras (Ras-related protein R-Ras)
Rac	Ras-függő C3 botulinum toxin szubsztrát (Ras-related C3 botulinum toxin substrate)
Ral	Ras-függő protein Ral (Ras-related protein Ral)
RalGEF	Ral guanin-nukleotid kicserélő faktor (Ral guanin-nucleotide exchange factor)
Rap	Ras-függő protein (Ras-related protein)
Ras	patkány szarkóma (Rat sarcoma)
RasGRP	Ras guanil-felszabadító protein (Ras guanil-releasing protein)
RCE1	Ras konvertáló CAAX-endopeptidáz 1 (Ras converting CAAX-endopeptidase 1)
RFP	piros fluoreszcens fehérje (red fluorescent protein)
Rheb	agyban dúsuló Ras homológ (Ras homolog enriched in brain)
Rho	Ras homológ géncsalád
RTK	receptor tirozin-kináz (receptor tyrosin-kinase)
S6K1	riboszómális S6 kináz 1
SAC1	aktin mutáció szupresszor 1 (supressor of actin mutation 1)
SAC3	aktin mutáció szupresszor 3 (supressor of actin mutation 3)
SAM	steril alfa motívum

SH2	Src homológia 2 domén
SHIP	SH2 domént tartalmazó inozitol polifoszfát 5 foszfátáz
SOAR	STIM-Orai aktiváló régió
SOCE	raktár-szabályozott kalcium-beáramlás (store operated calcium entry)
SOS	Son of Sevenless
STIM1	kötőszövevel interakciót létesítő molekula 1 (stromal interacting molecule 1)
STIM2	kötőszövevel interakciót létesítő molekula 2 (stromal interacting molecule 2)
TAPP	tandem PH-domént tartalmazó protein (tandem PH-domain containing protein)
TBK1	TANK köt kináz 1 (TANK binding kinase 1)
TGN38	transz-Golgi hálózat 38 (trans-Golgi network 38)
TMEM110	transzmembrán fehérje 110 (transmembrane protein 110)
TOM70	külső membrán transzlokáz 70 (translocase of outer membrane 70)
TOR	a rapamycin célpontja (target of rapamycin)
TRP	tranziens recptor potenciál
TRPML1	tranziens recptor potenciál kationcsatorna, mucolipin alcsalád 1

## 2 Bevezetés

A dolgozatom alapjául szolgáló kísérletes munka során a perifériás plazmamembrán (PM) fehérjék, elsősorban a Ras fehérjék sejten belüli elhelyezkedésében bekövetkező változásokat vizsgáltam a PM foszfoinozítid (PPIIns) tartalmának csökkentése után. Ezen túlmenően a kapacitatív kalcium-beáramlás (SOCE) folyamatának PPIIns-függő szabályozását is tanulmányoztam. A PM PPIIns tartalma mindkét folyamatban kritikus szerepet tölt be. A téma jelentőségét a szakirodalomban megjelent számos közlemény is mutatja, azonban még mindig nem teljesen tisztázott a lipidek pontos szerepe az említett folyamatok szabályozásában. Ennek egyik oka, hogy a pontos és nagy időbeli felbontással rendelkező mérési technikák, specifikus gátlószerek, illetve a PM PPIIns tartalmának specifikus változtatására lehetőséget kínáló molekuláris eszköztár korábban nem álltak rendelkezésre. Ennek megfelelően az eredmények részletes ismertetése előtt, szeretném áttekinteni az adatok és kísérletek megértéséhez nélkülözhetetlen témákat, beleértve a fehérjék PM lokalizációjában szerepet játszó tényezőket; a sejtek PPIIns metabolizmusát, különös tekintettel a PM-on megtalálható formákra; a Ras fehérjékről és a SOCE-ről rendelkezésre álló általános ismeretanyagot; illetve szeretnék kitérni a kísérletekben használt módszerek bemutatására is.

### 2.1 A perifériás plazmamembrán (PM) fehérjék lokalizációjának biztosításában szerepet játszó tényezők

A fehérjék működése szempontjából a megfelelő sejten belüli elhelyezkedés kulcsfontosságú tényező. Különösen igaz ez abból a szempontból nézve, hogy a fehérjék többnyire molekuláris komplexekben működnek, így akár egy fehérje kiesése is jelentheti a komplexek által szabályozott folyamatok teljes vagy részleges károsodását, amely végzetes következményekkel járhat egy sejt életében. Éppen ezért, a fehérjék megfelelő intracelluláris lokalizációjának biztosítását végző folyamatok minden esetben szigorúan szabályozottak. A membránkötött fehérjék esetében a legnagyobb leküzdendő akadályt az ellentétes viselkedésű hidrofil fehérjék és a hidrofób jellegű membránok egymáshoz kapcsolása jelenti. A PM belső felszínéhez kötődő fehérjék esetében ennek az ellentétnek a feloldására számos mechanizmus alakult ki (1). Ezek közül a legegyszerűbb, amikor a fehérjék szekvenciáján belül hidrofób és hidrofil aminosavak egy amfipatikus  $\alpha$ -

hélixeket alkotnak, melyek hidrofób felszínüknel fogva könnyedén beépülhetnek a PM lipid környezetébe. További lehetőség, hogy a fehérjék további, már PM lokalizációjú proteinekhez kapcsolódnak közvetlenül.

Azoknál a fehérjéknél, melyek nem rendelkeznek a korábban említett amfipatikus  $\alpha$ -hélixekkel, illetve nem képesek más fehérjékkel erős kapcsolatot kialakítani, más mechanizmus alakult ki a membránokhoz való kapcsolódás elősegítése céljából. Ezeknél a fehérjéknél a transzláció során, vagy azt követően egyes aminosav-oldalláncok lipidmódosításokon esnek át, melyek során hidrofób karakterű zsírsavláncok, vagy csoportok kovalens kapcsolódása figyelhető meg. Ezáltal a fehérjék lipofil karaktere erősödik (2,3). A folyamat különösen a kisméretű fehérjék PM kötésében játszik kiemelkedő szerepet, ugyanis ezek méretükből fakadóan kisebb eséllyel tartalmaznak a direkt hidrofób kötéshez szükséges, korábban említett amfipatikus  $\alpha$ -hélixeket. Ide tartoznak a kis G-fehérjék, például a Ras, Rac és Rho fehérjék, illetve az Src családba tartozó tirozin-kináz fehérjék is, mint például az Lck, a c-Src, vagy a Lyn (4-6).

Az említett poszttranszlációs lipidmódosításoknak öt formáját ismerjük, azonban ezek közül csak három típus vesz részt a PM belső felszínéhez kapcsolódó perifériás fehérjék lokalizációjának biztosításában: a palmitoiláció, a mirisztoiláció, illetve a két eltérő módosítást is magában foglaló izopreniláció. Az eltérő típusok a legtöbb esetben nem egyedüli módosításként, hanem többszörösen fordulnak elő a fehérjék szekvenciáján belül. Ezen kívül az is nagyon gyakori, hogy a már PM lokalizációt mutató integráns membránfehérjék esetében a nem integráns szakaszoknak csak egy részlete horgonyozódik ki lipidmódosítást követően a PM-hoz, biztosítva a megfelelő konformáció elérését a partnerfehérjékkel való kapcsolathoz. Ez utóbbira jó példa a  $\mu$ -opioid receptor, melynek lipidmódosításán keresztül a receptor jelátvitel-szelektív működése is megváltozhat (7).

A palmitoiláció során a fehérjék meghatározott cisztein aminosavaihoz egy 16 szénatomból álló telített palmitinsav kapcsolódik tioészter kötéssel (8). Nagyon fontos tulajdonsága ennek a módosításnak, hogy ellentétben a mirisztoiláció és az izopreniláció folyamataival, itt bizonyítottan egy reverzibilis reakció zajlik le, melyet a citoplazmában és a sejt membránrendszerében található palmitoil-transzferázok katalizálnak. A reverzibilitásnak köszönhetően a folyamat alkalmas a fehérjék membránkötésének dinamikus változtatására, ezáltal az így módosított fehérjékre egy jól nyomon követhető palmitoilációs-depalmitoilációs ciklus jellemző (9).

A mirisztoilációs módosítás minden esetben a fehérjék N-terminálisán történik a metionint követő, második pozícióban található glicin aminosavakon. A folyamatot a citoplazmában elhelyezkedő N-mirisztoil-transzferázok katalizálják, melyek egy amidkötésen keresztül összekapcsolják a 14 szénatomos mirisztoilsav carboxi- és a glicin amino-csoportját, miután a metionin eltávolításra kerül a transzlációs folyamat során (10).

Az izoprenilációs folyamat esetében tulajdonképpen két eltérő módosításról beszélhetünk, ugyanis ide soroljuk a farnezilációt és a geranilgeranilációt is. Az előbbi során egy 15 szénatomból álló farnezil-csoport míg az utóbbinál egy 20 szénatomos geranilgeranil-csoport kapcsolódása történik meg. Mindkét lipid-csoport a koleszterinszintézis közterméke, és abban is megegyezik a két folyamat, hogy csak kitüntetett helyeken, a fehérjék CAAX-doménjének cisztein aminosavain következhet be. A folyamatot citoplazmatikus protein-prenil transzferáz enzimek katalizálják a láncevégi CAAX-motívum felismerése után. A lipidmódosítás létrejötte a fehérje továbbalakulása szempontjából is elengedhetetlen, ugyanis ennek köszönhetően a fehérjék az ER-hoz kötődhetnek és ily módon hozzáférhetővé válnak az RCE1 és az ICMT fehérjék számára, melyek a fehérjék végleges szerkezetét hozzák létre az AAX részlet levágása és egy metil-csoport addíciója révén (11).

A bemutatott poszttranszlációs lipidmódosítások közül egyedül a palmitoiláció képes a módosított fehérjék stabil membránkötését létrehozni (12). A csak mirisztoilált vagy prenilált fehérjék esetében a membránnal kialakított kapcsolat gyenge kölcsönhatást mutat, ezért az ilyen módosításon átesett fehérjék csak tranzien membránasszociációra képesek. Ezen fehérjék stabil membránkötése csak további kölcsönhatások létrejötte után lehetséges. Az esetek többségében ez egy további palmitoiláción keresztül valósul meg a fehérjék láncközi cisztein molekuláin belül, amelynek az első módosításhoz képest közeli pozícióban kell megtörténnie a membránasszociáció biztosításához (13,14). A másik, ugyancsak gyakori folyamat a nagyobb affinitású kötés létrejöttében az elektrosztatikus interakciók kialakulása a PM negatívan töltött foszfolipidjei és a fehérjék pozitívan töltött aminosavai között (15,16).

A PM citoszolikus felszínén több olyan foszfolipidet is találunk, melyek feji része a kompartmentre jellemző pH tartományban negatívan töltött, így részt vehetnek a bázikus aminosavakkal rendelkező fehérjék elektrosztatikus interakciók általi stabilizálásában a

PM-on (2). Ezek közül legnagyobb mennyiségben a foszfatidil-szerin (PtdSer) található meg a PM-ban, amely a sejtek foszfolipid készletének a 3-10%-át teszi ki és egy negatív töltést hordoz (17). A sorban a foszfatidil-inozitol (PPIIns) származékok következnek, melyek több eltérő mértékben foszforilált származékot foglalnak magukban és a sejt foszfolipid készletének kevesebb, mint 1%-át adják (18). A különböző mértékben foszforilált PPIIns molekulák eltérő mértékű negatív töltést hordoznak, melyek száma a foszforiláltsági fokkal arányosan változik. Az általánosan elfogadott elmélet szerint a PM belső felszínének általános negatív töltését a PtdSer biztosítja (19); míg a PPIIns származékok, elősorban a kétszeresen foszforilált PtdIns(4,5) $P_2$  lokálisan nagyobb elektromos erőteret képez, így elősegíti az elektrosztatikus interakción keresztül a fehérjék PM-hoz való irányítását és stabilizálását (20). A PM belső felszínén találhatunk még egy negatív töltéssel rendelkező foszfolipidet, a foszfatidsavat. Ez a lipid fontos prekuzora a membránlipidek bioszintézisének ezért nagyon rövid féléletidővel rendelkezik, így tartósan nem képes elektrosztatikus kölcsönhatások kialakításával stabilizálni a fehérjék helyzetét (21).

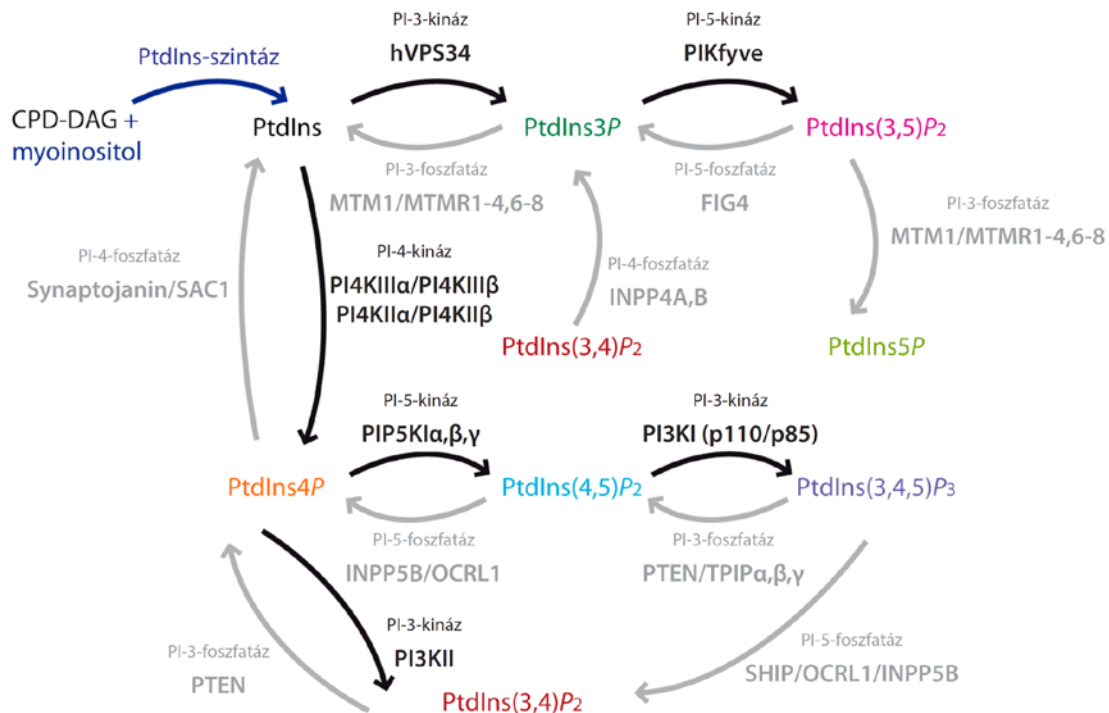
Az eddig említett általános mechanizmusok mellett léteznek specifikus membrán-fehérje interakciók is, melyek a fehérjék membránlokalizációját biztosíthatják. Ezekben a kapcsolatokban meghatározott foszfolipidek, illetve az ezeket specifikusan felismerő lipid-kötő domének vesznek részt, melyek a kihorgonyozódó fehérjék specifikus alegységeként vannak jelen. Az így kialakuló kötések során a fehérjék lipidkötő doménjei kezdetben elektrosztatikus interakciókon keresztül ismerik fel a lipideket (22,23), melynek következtében a membránhoz irányítódnak, és egy gyenge kölcsönhatást hoznak létre. A folyamat előrehaladtával a gyenge lipidkötésnek köszönhetően a domén és a membrán egymáshoz viszonyított helyzete ideálissá válik, majd a kötés erőssége növekszik, melyben a domén és a membrán között létrejövő további másodlagos kötések kialakulása játszik szerepet (24,25). A kötés mechanizmusát tekintve nem meglepő, hogy manapság már szinte az összes töltéssel rendelkező foszfolipid esetében sikerült többé-kevésbé specifikus kötődoméneket azonosítani (18,19,26).

Munkánk során a PM PPIIns tartalmának szerepét vizsgáltuk több eltérő biológiai folyamatban, így ennek a molekulacsaládnak a bemutatására egy külön fejezetet szentelek a továbbiakban.

## 2.2 A foszfoinozítidek anyagcseréje emlős sejtekben

### 2.2.1 A foszfoinozítidek szerkezete

Foszfoinozítidek (PPIs-ek) alatt a glicerofoszfolipidek családjába tartozó azon molekulák összességét értjük, melyek a foszfatidil-inozitol eltérően foszforilált származékai közül kerülnek ki. A sejtek teljes foszfolipid tartalmának nagyon kis mennyiségét, mintegy 1%-át teszik ki, ellentétben a kiindulási vegyületnek tekinthető foszfatidil-inozitollal, melynek mennyisége 10% körüli (27). A molekulák felépítését tekintve általánosan elmondhatjuk, hogy humán sejtekben a glicerol váz első pozíciójában általában egy 18 szénatomos sztearinsav, míg a másodikban az esetek többségében arachidonsav kapcsolódik észterkötéssel keresztül (28). A harmadik pozícióban található a foszfodiészter kötéssel csatlakozó inozitolgyűrű, amelynek foszforiláltsági mintázata alapján összesen hét típust különböztethetünk meg, melyek egymásba alakulása szigorúan szabályozott folyamatokon keresztül kinázok és foszfatázok részvételével jön létre (29) (1. ábra).

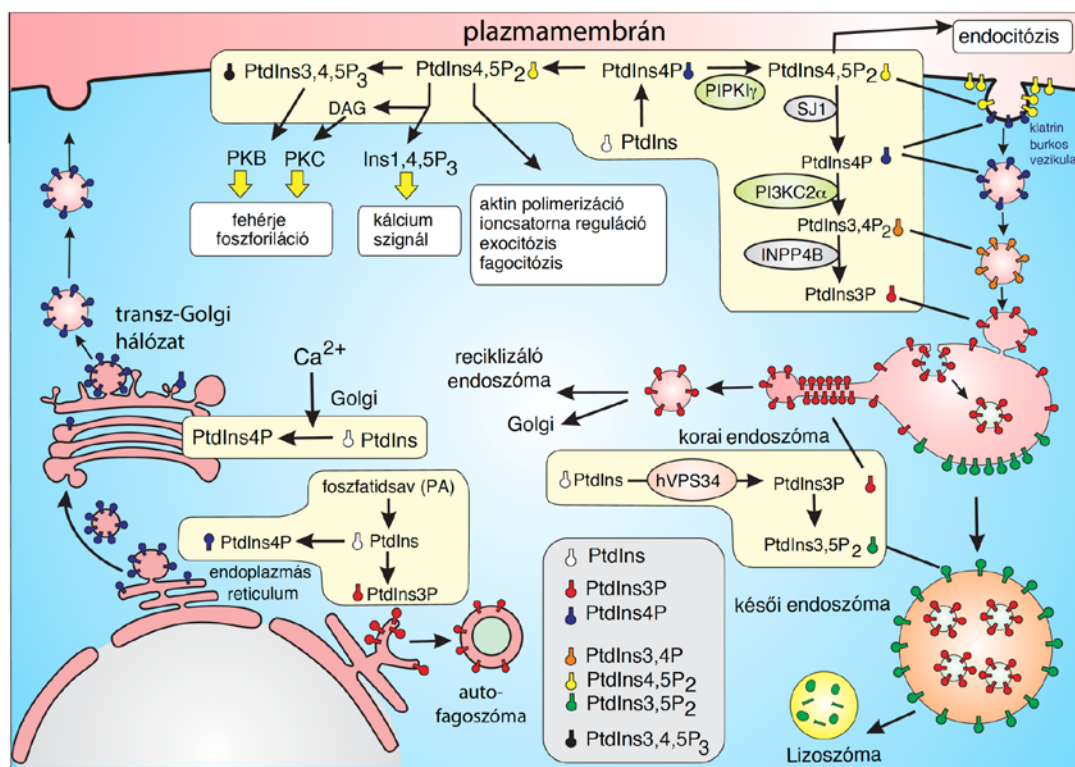


**1. ábra** – A foszfoinozítidek metabolizmusa, és az abban szereplő enzimek, forrás (29). Foszfoinozítideknek a foszfatidil-inozitol (PtdIns) molekula származékait nevezzük, melyek a hat szénatomos inozitolgyűrű eltérő mértékű és lokalizációjú foszforilációja során jönnek létre. A reakciók során a foszfátcsoportok a gyűrű 3., 4. és 5. pozíciójára kerülhetnek. Az ábrán a fekete nyilak a foszforilációs lépéseket végző kinázok reakcióit, míg a szürke nyilak a defoszforilációs lépéseket végző foszfatázok reakcióit jelölik. A folyamatokban szereplő enzimek neve a nyilak felett található. Az enzimek neve felett az enzim által katalizált reakció szerepel. (CPD-DAG: citidin-difoszfát-diacilglicerol, PI: foszfatidil-inozitol, az enzimek neveinek rövidítését ld. a rövidítések jegyzékében, illetve a szövegben)

Az ábrán is jól látható, hogy a reakciók során egyszeresen, kétszeresen és háromszorosan foszforilált származékok alakulhatnak ki, melyek metabolizmusát az egyes lipideknél mutatom be.

## 2.2.2 A foszfoinozitidek általános funkciói

A PPIs-ek lipid természetüknél fogva a sejtek membránjaiban helyezkednek el és szerteágazó funkcióval rendelkeznek. A sejtek membránnal körülhatárolt sejtalkotóinak szigorúan szabályozott lipidösszetétele van, azokban nem fordulhat elő minden PPIs. Ennek felborulása akár a membránnal határolt sejtalkotók megszűnését, egymásba olvadását is okozhatja (30,31). Fontos szerepük van tehát a sejtorganelumok membránjainak kijelölésében, melyeket mintegy „felcímkézve” lehetőséget teremtenek az őket felismerő fehérjéknek ahhoz, hogy a funkciójuk ellátásához a megfelelő sejtalkotót válasszák (2. ábra).



**2. ábra – A különböző sejtalkotók felszínére jellemző foszfoinozitidek, illetve egymásba alakulásuk, forrás (32).** A plazmamembrán jellemző foszfoinozitidjei közé a PtdIns4P, a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> és a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> tartoznak, melyek fő funkcióit az ábra is szemlélteti. Az endocitózis során a lipidek gyors egymásba alakulását figyelhetjük meg. A folyamatban szereplő enzimeket és lipidátalakulásokat az ábra is jelöli, melynek során elérjük a korai endoszómákra jellemző PtdIns3P lipidösszetételt. Ez a későbbiekben továbbalakulhat késői endoszómákká, majd lizoszómákká is. Ezekben a struktúrákban már a PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> az organelum felszínére jellemző lipidszármazék. A Golgi membránjának felszíne PtdIns4P-ot tartalmaz, amely az organelumról, a transz-Golgi hálózaton keresztül leszakadó szekréciós vezikulák membránjában is mindvégig megtalálható.



A foszfoinozítideknek ezen működése az adaptor funkciójuknak köszönhetően valósul meg, melyet a fehérjék specifikus lipidfelismerő doménjei (pl.: PH, PX, PDZ, FYVE stb.) tesznek lehetővé (18). Ezen kívül az inozitolgyűrű töltéssel rendelkező foszfátcsoportjainak jóvoltából ezek a molekulák segítenek a PM belső felszínén található negatív töltésű mikro környezet kialakításában, amely ugyancsak fontos lehet az aspecifikus, elektrosztatikus kölcsönhatással létrejövő membrán-fehérje kapcsolatok létrehozásában (33-35). A dolgozatom alapjául szolgáló kísérletes munkákban ezt a témakört jártam körül a PM PPIns-ek szempontjából, így ennek részletes bemutatását egyrészt az ide tartozó lipidek ismertetésénél, másrészt az eredmények fejezetben teszem meg.

További funkcióknak tekinthető, hogy a PPIns-ek központi szerepet töltenek be a sejt számos jelátviteli útvonalában, melyek közül a fontosabbakat az egyes lipidek leírásánál mutatom be.

### *2.2.3 Az egyszeresen foszforilált foszfoinozítidek metabolizmusa, sejten belüli elhelyezkedése és szerepe a sejtek működésében*

Az egyszeresen foszforilált PPIns csoportjába három molekula tartozik: a PtdIns3P, a PtdIns4P és a PtdIns5P (**1. ábra**).

A PtdIns3P az egyszeresen foszforilált formák össz mennyiségének hozzávetőlegesen 15%-át teszi ki (27). Képződése három útvonalon valósulhat meg: egyrészt a PtdIns inozitolgyűrűjének 3-as pozíciójában történő foszforilálás útján, melyet a III-as típusú PtdIns3-kináz (hVPS34) katalizál (36), másrészt a többszörösen foszforilált változatok defoszforilálását követően, melyet a 4- és 5-foszfátáz aktivitással rendelkező enzimek végeznek (37) (**1. ábra**). A lipid lebontásában a korai endoszómákban elhelyezkedő myotubularin nevű enzim játsza a kulcsszerepet, melynek fontos szerepét a sejtek működésében az enzim mutációjakor megfigyelhető betegségek manifesztációja is mutatja (38-40). A lipid legnagyobb mennyiségben az intracelluláris vezikulák membránjában található meg (41). Részt vesz az endoszómák és a korai endoszómák fúziójában, a korai endoszómák PM-hoz és Golgi-hoz történő transzportjában, illetve fontos a fagoszómák érésében és az autofágia folyamatának iniciációjában. A molekula felismerésére azon fehérjék képesek, melyek a lipidet specifikusan felismerő FYVE vagy PX doménnel rendelkeznek (42).

A PtdIns4P a sejtekben legnagyobb mennyiségben előforduló egyszeresen foszforilált származék, melynek arányát 45%-ra teszik a sejtek foszfoinozítidjeit tekintve (27). Szintézise legnagyobb mértékben a PtdIns-ból történik az inozitolgyűrű 4-es pozíciójának foszforilálásán keresztül (**1. ábra**), melyet a két csoportba sorolható, négy tagot számláló PtdIns4-kináz család enzimeit katalizálnak. Az első csoport enzimeire jellemző, hogy szerkezetileg homológiát mutatnak az I-es típusú PtdIns3-kinázokkal, ezért nem meglepő, hogy aktivitásuk gátolható – nagyobb dózisban ugyan – wortmaninnal, egy széles körben alkalmazott PtdIns3-kináz gátlószerrel. Ebbe a csoportba a III-as típusú PtdIns4-kinázok közül az  $\alpha$ - és  $\beta$ -izoenzim tartozik (újabb nomenklatura szerint PI4KA és PI4KB), melyek közül az első a PM, míg a második a Golgi-organellum lipidfrakciójának szintéziséért felelős. A másik enzimesoprotot a II-es típusú PtdIns4-kinázok alkotják (PI4KII $\alpha$  és PI4KII $\beta$ ), melyek szerepét ugyancsak leírták a Golgi membránjának PtdIns4P szintézisében, azonban elsődleges funkciójuk a sejtek vezikuláris kompartmentjeinek, a korai és késői endoszómáknak a PtdIns4P szintézise (43). Az említett kinázokon kívül, ez a lipid is képződhet a polifoszforilált formák defoszforilációja útján 3- és 5-foszfátázok közreműködésével, melyek közül a PTEN valamint az INPP5B és az OCRL1 fehérjék tűnnek a legfontosabbnak (44). A lipid degradációjában a Synaptojanin és a Sac1 fehérjék vesznek részt, melyek közül az utóbbi nagy aktivitású működése elengedhetetlen az ER és a PM között kialakuló nem-vezikuláris lipid-transzport megfelelő működéséhez (45,46).

A lipid legnagyobb mennyiségben a Golgi, illetve a PM intracelluláris oldalán található meg. Szerepe szerteágazó, bizonyítottan részt vesz a sejten belüli membrán, lipid és fehérje transzportban (28). A Golgi és az ER közötti vezikuláris anterográd és retrográd transzportokban is kiemelt jelentőséggel bír, ugyanis a folyamatban szereplő fehérjéket az Arf1-gyel közösen a vezikula képződésének helyére lokalizálja (47). Részt vesz az ER és a PM, illetve az ER és a Golgi között végbemenő kétirányú nem-vezikuláris lipid-transzportban is, ahol egy kapcsolt reakció keretein belül a PM-ről, illetve a Golgiról PtdIns4P, míg az ER-ről koleszterin, vagy PtdSer kerül át a szomszédos membránba a kialakult ER-PM, illetve ER-Golgi kontaktpontokon keresztül (48,49). Ezeknek a membránkapcsolatoknak a jelentősége emlős sejtekben csak az utóbbi időben került a figyelem középpontjába, ennek megfelelően számos közlemény jelent meg a témában a közelmúltban. A transzportot végző fehérjék mindegyikére igaz, hogy nagyfokú

homológiát mutatnak egymással, és rendelkeznek egy koleszterin származékok kötésére és transzportjára alkalmas doménnel (ORD), amely a PPIIns-ek kötésére is alkalmas (50,51). Emlős sejtekben a fehérjék első karakterizált tagja az OSBP fehérje volt, amely a Golgi és az ER közötti kontaktpontokban működik. A további, összesen 16 rokon fehérje (52) működésének tisztázására csak ezek után került sor, és még napjainkban is tart. A transzporterek által katalizált transzportfolyamatok esetében a hajtóerőt minden esetben a két membrán között kialakuló PtdIns4P grádiens szolgáltatja, melynek fenntartásáért az ER rezidens fehérjéje, a korábban már említett Sac1 enzim tehető felelőssé, melynek hatalmas aktivitását az is jól mutatja, hogy a lipid mennyisége az ER-on gyakorlatilag kimutathatatlan.

A PtdIns5P szintje rendkívül alacsony az emlős sejtekben, kevesebb, mint 10%-át adja az egyszeresen foszforilált PPIIns mennyiségének. Szintézise a PtdIns inozitolgyűrűjének 5-ös pozícióban történő foszforilálása útján a PIKfyve enzim közreműködésével történhet, azonban ennél sokkal fontosabbnak tűnik az a reakcióút, melynek során a PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> defoszforilálódik a PtdIns3P lebomlásánál már említett myotubularin-foszfátázok közvetítésével (53) (**1. ábra**). Eliminációja során nem ismerünk olyan útvonalat, amely a lipidet defoszforilálva PtdIns-t eredményezne (54), valószínűbb, hogy ebben a folyamatban a II-es típusú PtdIns4-kinázok játszanak fontosabb szerepet, melyek a lipid inozitolgyűrűjének 4-es pozíciójában létrehozott foszforilációval a molekulát PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-tá alakítják (55). Hatásai nem nagyon ismertek, a sejtmagban található meg számottevő mennyiségben. Itt a kromatinon helyezkedik el és feltehetően adaptorként szolgál az ING2 fehérjének, amely a p53 acetilációját váltja ki (56).

#### 2.2.4 A kétszeresen foszforilált foszfoinozitidek metabolizmusa, sejten belüli elhelyezkedése és szerepe a sejtek működésében

A kétszeresen foszforilált PPIIns csoportjába szintén három molekulát sorolhatunk: a PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>-t, a PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>-t és a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-t.

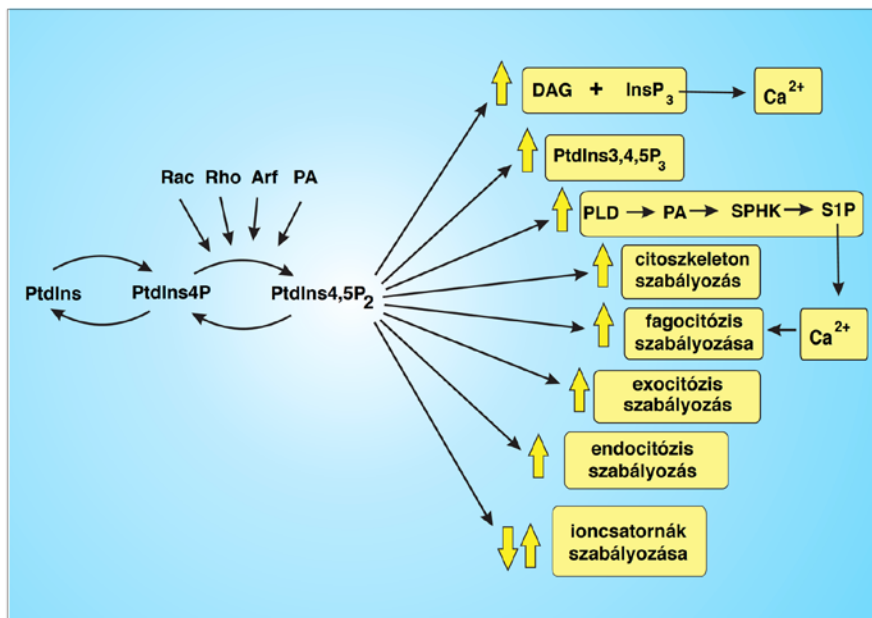
A PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> szintje meglehetősen alacsonynak mondható, a sejtek PPIIns készletének kevesebb, mint 10%-át teszi ki. A sejtek nyugalmi állapotában főleg a PM-on található (57), azonban kimutatható a klatrin-burkos vezikulákban (58), illetve az endoszómális kompartmentekben, köztük a multivezikuláris testekben is (59).

Mennyisége átmenetileg, de nagymértékben emelkedhet a PM-on növekedési faktorok, illetve citokinekkal történő kezelés hatására (27). Szintézise két útvonalon keresztül valósulhat meg, egyrészt a PtdIns4*P* inozitol-gyűrűjének 3-as pozíciójában történő foszforiláció által, melyet a II-es típusú PtdIns3-kinázok katalizálnak (60), másrészt a PtdIns(3,4,5)*P*<sub>3</sub> defoszforilációján keresztül, melyben a SHIP1/2 enzimek tűnnek a legfontosabbnak (44). Eliminációját az INPP4A és INPP4B enzimek végzik, melyek a 4-es pozícióban defoszforilálják a molekulát, melynek során PtdIns3*P* képződik (61) (**1. ábra**). A lipidhez számos fehérje képes kötődni, majd a rájuk jellemző szignalizációs útvonalakat aktiválni. Ezek közül a legfontosabbak az Akt/PKB, és a TAPP1/TAPP2 fehérjék, melyek szignalizációjára még kitérek egy későbbi fejezetben, ahol a PM-receptorok aktivációjának hatására bekövetkező PM-lipidváltozásokat, illetve az ezek során aktiválódó jelpályákat mutatom be részletesebben.

A PtdIns(3,5)*P*<sub>2</sub> intracelluláris mennyisége is viszonylag alacsony, a sejtek PPIns tartalmának kevesebb, mint 5%-át adják (62,63). A késői endoszómák és a lizoszómák membránjának jellemző lipidalkotója, ahol a korai endoszómák érését követően jelenik meg. Szintézisében ezidáig csak egy útvonalat sikerült bizonyítani, melynek során a molekula a korai endoszómák membránjára jellemző PtdIns3*P*-ből képződik foszforilációval a PIKfyve kináz hatására, mely enzim egyedülként képes ezt a reakcióutat katalizálni (64). Bontásában két enzim, a Sac3 5-foszfataz és az MTM 3-foszfataz játszik szerepet (54) (**1. ábra**). A lipid szerepét a membrán és fehérjetranszportban írták le (65), illetve részt vesz a TRPML1 csatorna szabályozásában, ami a vezikulák felszínén működve a korai endoszómák lizoszómákkal való fúziójában segít a szükséges Ca<sup>2+</sup> ion ellátásával (66).

Az emlős sejtekben a PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> molekula található meg a legnagyobb mennyiségben, aránya mintegy 45% az összes PPIns-re vetítve, illetve közel 90% a kétszeresen foszforilált származékokat tekintve (62). Legnagyobb mennyiségben a PM-on található, azonban elenyésző mértékben megfigyelhető a Golgi, az ER és az endoszómák membránjában is (67). Szintézisében a legfontosabb reakcióút a PtdIns4*P* inozitol-gyűrűjének 5-ös pozíciójában bekövetkező foszforiláció, melyet az I-es típusú PIP5K-ok katalizálnak (68). Az enzimesaládba három izoenzim (PIP5K $\alpha$ , PIP5K $\beta$  és a PIP5K $\gamma$ ) tartozik, melyek mindegyike a PM-on található (**1. ábra**). Képződésében szerepet játszhatnak még a II-es típusú PI4K-ok, melyek a Golgin található csekély

mennyiségű PtdIns5P-ot foszforilálják a 4-es pozícióban (69,70). A lipid szintjének csökkentésében három útvonal játszik szerepet, melyek közül kettő összefügg a molekula szignalizációs szerepével, amely a PtdIns(4,5) $P_2$  legismertebb funkciója. Előanyagként ugyanis esszenciális szerepet játszik a  $G_{q/11}$ -heterotrimer G-fehérjékhez kapcsolt receptorok aktiválódása során megfigyelhető Ins(1,4,5) $P_3$ /DAG jelpályában, illetve a tirozin-kináz jelpályában is. Ezeket a folyamatokat egy későbbi fejezetben bővebben is ismertetem, ahol a PM-receptorok aktivációjának hatására bekövetkező PM-lipidváltozásokat, illetve az ezek során aktiválódó jelpályákat részletezem. A lipid eltávolításának harmadik útvonalában azok a foszfatázok vesznek részt, melyek 4- és 5-foszfatáz aktivitással rendelkeznek. Ide tartoznak a OCRL, INPP5B/E/J/K enzimek, illetve a synaptojanin 1 és 2 fehérjék is (71).



**3. ábra** – A PtdIns(4,5) $P_2$  hatásainak összefoglalása a sejtélettani folyamatokban, forrás (32). A PtdIns(4,5) $P_2$  számos sejtélettani folyamatban központi szabályozó szereppel bír. Szignalizációs molekulaként előnyaga a további szignalizációs szereppel bíró vegyületeknek, mint a DAG, Ins(1,4,5) $P_3$  és PtdIns(3,4,5) $P_3$  molekulák. Ezen kívül modulátorként részt vesz a citoskeleton átrendeződés, a fagocitózis, az excitózis folyamatában, illetve képes ion-csatornák regulációjára is.

A lipid szignalizációs útvonalakban betöltött szerepe mellett számos egyéb funkcióval is rendelkezik a sejtek életében. **(3. ábra)** Részt vesz az aktin átrendeződés szabályozásában, ahol az aktin-polimerizációban fontos fehérjéket (Rho, Arf, Cdc42, Arp2/3) lokalizálja (72). Fontos szerepe van a fokális adhéziók létrehozásában, ahol a vinculin és talin fehérjék kapcsolódását segíti elő (73). A lipid jelenléte fontos az endocitózis folyamatában is, ahol az AP2 és a klatrin-asszociált fehérjéket a formálódó

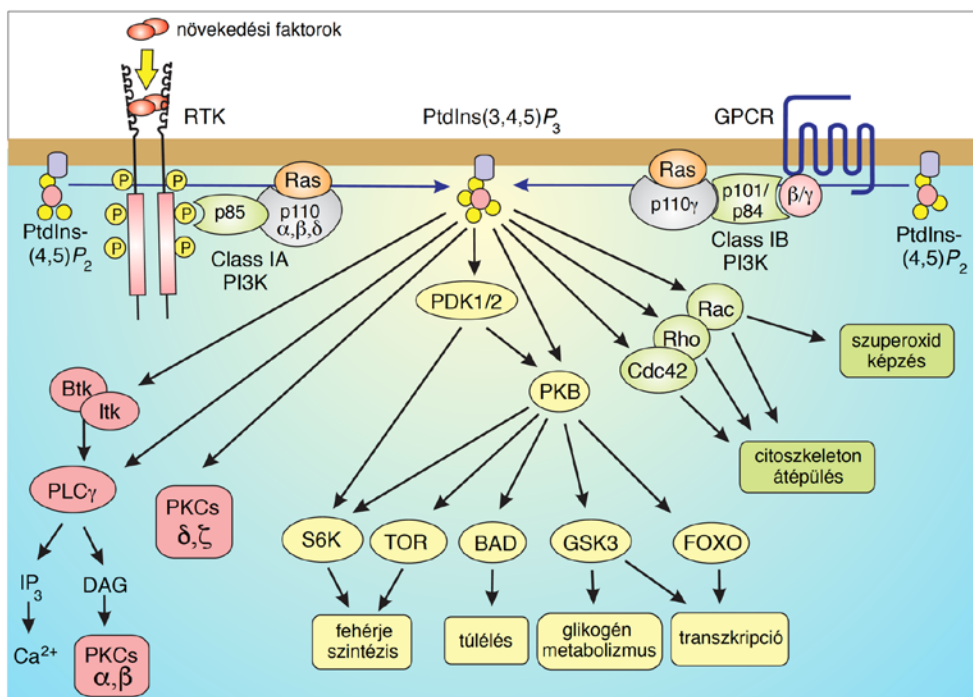
vezikulákhoz irányítja, ezáltal elősegíti a clathrin burkos vezikulák létrehozását (74). Az endocitózis folyamatában betöltött szerepét munkacsoportunk is tanulmányozta korábban, és sikerült kimutatni, hogy a lipid szintjének csökkentése gátolja a receptorok klatrin-mediált endocitózisát (75). A lipid szerepét leírták a PLD enzim aktivációjában is, amely foszfatidil-kolinból foszfatidsav képzését teszi lehetővé a PM-on (76). Ezen kívül több csatornánál, például a TRP csatornák számos típusánál is leírták már a lipid szabályozó szerepét (28). A lipid hidrolízise képes befelé rektifikáló  $K^+$ -csatornák nyitását is előidézni (77), azonban a feszültségfüggő  $K^+$  csatornák esetében a hatás fordított, tehát a lipid szintjének esése a csatornák aktivitását csökkenti (78).

Az eddig felsorolt szabályozási mechanizmusok a lipid adaptorfunkcióján keresztül valósulnak meg. Azonban, a lipid nagy PM-mennyiségének és kétszeresen foszforilált inozitolgyűrűjének köszönhetően hozzájárul a korábbi fejezetekben már említett, illetve a dolgozatom alapjául szolgáló kísérletes munkában vizsgált elektrosztatikus interakciók létrejöttéhez is, melyen keresztül fontos szereppel bír a pozitívan töltött fehérjék PM-lokalizációjának kialakításában (20).

### *2.2.5 A háromszorosan foszforilált foszfoinozitidek metabolizmusa, sejten belüli elhelyezkedése és szerepe a sejtek működésében*

A háromszorosan foszforilált PPIs-ek csoportjának egyedüli képviselője a  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ . Emlős sejtekben az aránya kisebb, mint 5%-a a teljes PPIs tartalomnak, azonban nyugvó, minden növekedési ingertől mentes sejtekben gyakorlatilag kimutathatatlan a mennyisége (79). Szintézise a PM-on történik, annak  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  molekuláiból, melyet döntően az I-es típusú PI3K-ok katalizálnak (27) (**1. ábra**). Az enzimek négy izoformáját különböztetjük meg ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) melyek közös jellemzője, hogy egy regulátoros (p85 az  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  izoformáknál, illetve p101 vagy p84 a  $\gamma$ -izoforma esetén) és egy katalitikus (p110) alegységből állnak. Aktivációjuk több útvonalon is megvalósulhat: a tirozin-kináz receptorok és a nem-receptor tirozin-kinázok működése révén a regulátoros alegység SH2 doménje révén felismeri a foszfortirozin molekulákat és ez vezet az enzimek aktivációjához ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  izoformáknál), vagy a heterotrimer G-fehérjéhez kapcsolódó receptorok aktiválódása után a G-fehérje  $\beta\gamma$  alegységének regulátor alegységhez történő kapcsolódása indítja be a folyamatot ( $\gamma$ -izoformánál). A GTP-t kötő Ras fehérjék mind a négy izoforma esetén képesek önállóan is az enzim

aktiválására, illetve fontos szerepük van a maximális enzimaktivitás elérésében (28). A lipid eliminációjában a SHIP és a PTEN foszfatázok játszanak fontos szerepet, melyek az inozitol-gyűrű 5-ös pozíciójában található foszfát hidrolízise következtében  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ -ot képeznek.



**4. ábra** – A PM  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  szintjének emelkedéséhez vezető, illetve a foszfolipid által szabályozott sejtéleti folyamatok bemutatása, forrás (32). A lipid szintézisében különböző típusú PI3K enzimek vesznek részt, melyek aktivációját a GPCR-ok, illetve a RTK-ok ligandkötése hozza létre. Szintézise után a lipid számos jelátviteli útvonalban szerepelhet. Kis G-fehérjék működését fokozva szerepet játszik a sejtek szuperoxid-anyagcseréjében, illetve a citoskeleton átrendeződésében, a BTK és PKC izoformák aktiválásán keresztül további, gyors szignalizációs lépéseket hozhat létre, míg a PKB/Akt jelpálya aktivációján keresztül a sejtek fehérjeszintézisét, túlélését, glikogén-metabolizmusát és transzkripciósi folyamatait szabályozza.

A lipid funkciója nagyon szerteágazó (**4. ábra**). Az egyik legfontosabb szerepe a PKB/Akt jelpálya aktiválása, melynek során egyrészt magát az Akt fehérjét köti a PM-hoz, másrészt a fehérje foszforilációját előidéző PDK1 enzimet is a membránhoz irányítja. Ezzel elősegíti az Akt fehérje foszforilációját, amely a jelpálya iniciációs lépése (80). Ez az útvonal rendkívül fontos szerepet tölt be a sejtek működésében, ugyanis számos metabolikus hatás közvetítése mellett a sejtek növekedésének és az apoptózisának irányításában is szerepel (81).

Az Akt útvonalon létrehozott hatásokon kívül, a Btk és Itk-jelpályákat is aktiválja, amely immunsejtekben játszik kiemelkedően fontos szerepet, ugyanis B- és T-sejtekben a  $\text{PLC}\gamma$  működését serkenti (82,83), míg hízosejtekben az  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  szignalizációjához szükséges (84). Az irodalomban számos példát találhatunk arra, hogy

a lipid elektrosztatikus interakciók révén képes elősegíteni a kis G-fehérjék plazmamembrán lokalizációját, melyen keresztül részt vesz a sejtek szuperoxid képzésében (85), illetve a citoskeleton átrendeződésében is (86). Munkánk során mi is megvizsgáltuk a lipidnek ezt a hatását a Ras fehérjék PM-lokalizációjának szabályozásában, azonban nekünk nem sikerült kimutatni a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> szerepét ebben a folyamatban.

### 2.2.6 A G<sub>q</sub>-fehérjéhez kapcsolt 7-TM receptorok aktivációja során bekövetkező változások a PM PPIIns-ek anyagcseréjében

A 7-TM receptorok agonistakötése során a receptor konformációja megváltozik, ami a hozzájuk kapcsolódó heterotrimer G-fehérje aktivációját vonja maga után. Ennek során a G-fehérje alegységei szétválnak és kezdetét veszi az  $\alpha$ , illetve a  $\beta\gamma$  alegységek által regulált jelátviteli utak beindítása. Abban az esetben, ha a receptor a G $\alpha_{q/11}$  családba tartozó fehérjékhez köt, akkor a jelátvitel során főleg az  $\alpha$ , de a  $\beta\gamma$  alegységen keresztül is létrejön a foszfolipáz C $\beta$  enzim aktivációja. Az enzim által katalizált reakcióban a PM PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-szintje csökken, belőle ekvimoláris mennyiségben Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> és DAG keletkezik (87). Ezek után az Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> a citoplazmában diffúzióval jut el az ER felszínén található receptorához, melynek aktivációja az organelum Ca<sup>2+</sup>-raktárainak ürüléséhez és ezzel párhuzamosan a citoplazmatikus Ca<sup>2+</sup>-koncentráció emelkedéséhez vezet. A DAG a PM-ban marad és aktiválja a PKC enzimet. Egyes formák esetében ebben a párhuzamosan emelkedő Ca<sup>2+</sup>-koncentrációnak is szerepe van. A PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> PM-szintjének csökkenése során a lipid reszintézise pillanatszerűen beindul, melynek szabályozása emlős sejtekben nem ismert, élesztőben az Opy1 fehérje funkciójához kötik (88). A folyamat során a nagy aktivitással rendelkező I-es típusú PIP5K-ok fokozott működésének köszönhetően a lipid előanyagának, a PtdIns4P-nak a mennyisége is gyorsan csökkenni kezd. Ezzel párhuzamosan megindul a PtdIns4P-nak az újraképződése, amely a PI4KA enzim részvételével zajlik (89). Munkacsoportunk korábbi munkája a PKC szerepére világított rá az enzim aktivációjában (90), melynek fokozott működése ugyancsak a jelpályához köthető az előzőekben részletezett módon. Korábbi enzimkinetikai vizsgálatok alapján a PM-ban található PIP5K enzimek aktivitása jóval meghaladja a PI4KA-ét, így a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> reszintézisében a sebességmeghatározó lépésének a PtdIns4P újraképződésének ütemét tekinthetjük (91). A PIP5K enzimeknek



nem ismert széleskörűen alkalmazott gátlószere, azonban PI4KA enzim érzékeny a wortmanninra, melyet már régóta alkalmaznak az enzim szerepét elemző kutatásokban (43). Sajnos ez a gátlószert nem specifikus a PI4K-ok ezen izoformájára, sőt a PI3K-ok aktivitását már jóval alacsonyabb koncentrációban is gátolja, így nem tekinthető specifikus gátlószertnek a vizsgálatokban. Az utóbbi időben megjelent egy új vegyület, az A1 (92), amely már sokkal specifikusabb az enzim gátlása tekintetében, ugyanis az előbb említett PI3K-ra abszolút nincs hatással, míg az enzimmel rokon PI4KB fehérje működését is csak kismértékben befolyásolja.

### *2.2.7 A tirozin-kináz receptorok aktivációja során bekövetkező változások a PM PPIns-ek anyagcseréjében*

A tirozin-kináz receptorok működése során a PM PPIns-ek anyagcseréjében bekövetkező változások szempontjából a PI3K enzimek aktivációja játsza a központi szerepet. A fehérje működésének következtében a PM PtdIns(4,5) $P_2$  molekuláiból PtdIns(3,4,5) $P_3$  képződik, amely a korábban már említett szignalizációs útvonalakat aktiválja. A PI3K enzimek mellett a receptoraktivációt követően az 5-foszfátáz aktivitással rendelkező SHIP fehérjék működése is fokozódik, amely a PtdIns(3,4,5) $P_3$ -ból történő PtdIns(3,4) $P_2$  átalakulást katalizálja. A PM PPIns-ek szempontjából további fontos tényező, hogy a receptor aktivációja a PLC $\gamma$  enzim működését is serkenti, melyhez a PM emelkedett PtdIns(3,4,5) $P_3$  tartalma is hozzájárul. A lipid emelkedett koncentrációjának direkt aktiváló hatása van egyes PKC izoformákra (93), azonban a PLC $\gamma$  által katalizált reakciót során, ahol a PtdIns(4,5) $P_2$  hasítása révén Ins(1,4,5) $P_3$  és DAG keletkezik a következményes PKC aktiváció ugyancsak megvalósul. Munkacsoportunk korábbi munkája során bemutattuk (90), hogy ez az útvonal a PI4KA-n keresztül szignifikáns mértékben emelheti a PM PtdIns4 $P$  tartalmát, amelyre feltehetően a PtdIns(4,5) $P_2$  szintjének biztosítása miatt van szükség a folyamat során. Összefoglalva tehát, a receptorok aktivációja esetén a PM PtdIns4 $P$  tartalma emelkedik, a PtdIns(4,5) $P_2$  színje nem, vagy csak kismértékben változik, míg a PtdIns(3,4) $P_2$  és a PtdIns(3,4,5) $P_3$  egyaránt növekszik a PM-ban.

## 2.3 A Ras fehérjék szerepe a sejtek működésében

### 2.3.1 A Ras fehérjék általános jellemzése

A Ras fehérjék a kis G-fehérjék azonos elnevezésű családjába tartoznak. Legfontosabb képviselői a K-, N- és H-Ras fehérjetípusok, azonban a család több eltérő izofomát, vagy más elnevezésű tagot számlál, ilyenek az R-Ras, az M-Ras, a Ral, a Rap1/2 és a Rheb fehérjék (94). Ez utóbbiak működéséről és szerepéről jóval kevesebb információ áll rendelkezésre, mint a család kitüntetett szereplőiről. A fehérjék funkciója nagyon szerteágazó, de elmondható, hogy egyik legfontosabb feladatuk a sejtek növekedésének szabályozásában rejlik, ugyanis kiemelt jelentőséggel bírnak a transzkripció, a sejtciklus szabályozás, illetve a fehérjeszintézis folyamataiban is. Ennek megfelelően protoonkogénként a sejtek daganatos elfajulásának hátterében is sokszor ezeknek a fehérjéknek a megváltozott működése érhető tetten, melyet a COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) adatbázisban fellelhető adatok is alátámasztanak. A humán daganatok 25%-ában megtalálható a Ras fehérjék mutációja, melyek közül a K-Ras mutációs rátája a legnagyobb 85%-kal, ezt követi az N-Ras 12%-kal, végül a H-Ras 3%-kal. Találhatunk számos olyan daganatot is, melyekben a Ras mutáció incidenciája kiugróan magas, ilyen például a pancreas ductális adenocarcinómája (95 %), vagy a colorectális adenocarcinómák (52%) (95).

A Ras fehérjék aktivációjában a tirozin-kináz receptorok játszanak kiemelkedő szerepet a Grb2 és a SOS fehérjéken keresztül (96,97), de egyéb útvonalakat is ismerünk, melyek képesek a fehérjék aktivitásának fokozására (98,99). A monomer kis G-fehérjék működésére általánosan igaz, hogy nyugalmi állapotukban GDP-t kötött formában találhatók meg a sejtekben. Aktivációjuk során a GDP disszociál a fehérjékről, majd spontán megtörténik a fehérje GTP kötése, mivel ennek mennyisége legalább egy nagyságrenddel meghaladja a citoplazma GDP tartalmát. Ezt a folyamatot egy GEF-fehérje katalizálja, az említett jelátviteli útvonalon a SOS is ennek tekinthető. A GTP-t kötött formák tekinthetők a fehérje aktív, „bekapcsolt” állapotának, melyek aztán további fehérjék működését befolyásolják a saját jelátviteli útvonalaiknak és interakciós partnereiknek megfelelően. A fehérjék „kikapcsolása” is további fehérjék funkcióját követeli meg, ugyanis a kis G-fehérjék GTP-t bontó aktivitása alacsony. A GTP-hasítást elősegítő fehérjék, tehát a GAP-ok közreműködése akár öt nagyságrenddel is növelheti a hasítás sebességét (100). A Ras fehérjék működésével és jelátvitelével foglalkozó

kutatásokban széleskörűen alkalmaznak olyan daganatok kialakulását előidéző mutánsokat, melyeknek az endogén GDP, vagy GTP kötése, illetve a GAP vagy GEF fehérjékkel való kapcsolata károsodott. Ezen tulajdonságok alapján számos olyan pontmutáció ismert (G12V, G12D, G13V, Q61A), melyek a fehérjék csökkent GTP-t bontó képességét eredményezik, sőt a GAP fehérjékkel való kapcsolódást is nagymértékben gátolják (101,102). Ennek eredményeként konstitutívan aktív proteinek jönnek létre, fokozott onkogén képességgel. Ezzel ellentétes hatású mutációk is ismertek, melyek közül a legszélesebb körben az S17N aminosavcserét alkalmazzák (103). Ebben az esetben a Ras GDP-t kötött formában stabilizálódik, amely domináns negatív jelleget kölcsönöz a fehérjének. Ez a pontmutáció a fehérjék endogén GTP kötési zavarán kívül a vad típusú, sőt a konstitutívan aktív mutációk hatását is csökkenteni képes, ugyanis lekötik a sejtek Ras specifikus GEF fehérjéinek kapacitását, ezáltal gátolják a többi fehérje esetében a GTP kötés kialakulását és az aktív állapot létrejöttét (104).

### 2.3.2 *A Ras fehérjék membrán-lokalizációjának kialakulása*

A Ras fehérjéket alapvetően a kisméretű perifériás plazmamembrán fehérjék közé soroljuk. Ennek megfelelően a bevezetőben is részletezett módon a Ras fehérjék membrán-asszociációjának kialakításában posztranszlációs lipidmódosítás játszik szerepet. A Ras fehérjék esetében a legjelentősebb szereppel bíró variánsoknak a K-, a H-, illetve az N-Ras formákat tekintjük. A K-Ras esetében két eltérően működő izoformát is elkülöníthetünk: a K-Ras 4A-t és a K-Ras 4B-t. A két izoforma közötti különbséget a membránhoz való kapcsolatukban kell keresnünk. Mint ahogyan ennél a két izoformánál is, a családba tartozó fehérjék mind a négy képviselőjéről elmondható, hogy a szekvenciájuk nagyfokú homológiát mutat, abban lényegi eltérés csak a C-terminális régiónak megfelelő irányító-szekvenciában található, melyet nem teljesen helyesen sokszor csak CAAX doménként jellemeznek. CAAX doménnek szigorúan csak a molekula utolsó négy aminosavából álló motívumot nevezzük, ahol a C ciszteint, az A alifás aminosavat jelöl, míg az X a lipidmódosítást végző enzimek felismerése miatt fontos: ha ebben a pozícióban metionin, szerin, glutamin, alanin, vagy cisztein található, akkor farneziláció, ha leucin vagy glutamát, akkor geranylgeraniláció történik. A szakasz első cisztein aminosaván jön létre a bevezetésben bemutatott módon a preniláció a posztranszlációs módosítás során, így biztosítva a fehérje kezdeti lipidkötését az ER-on

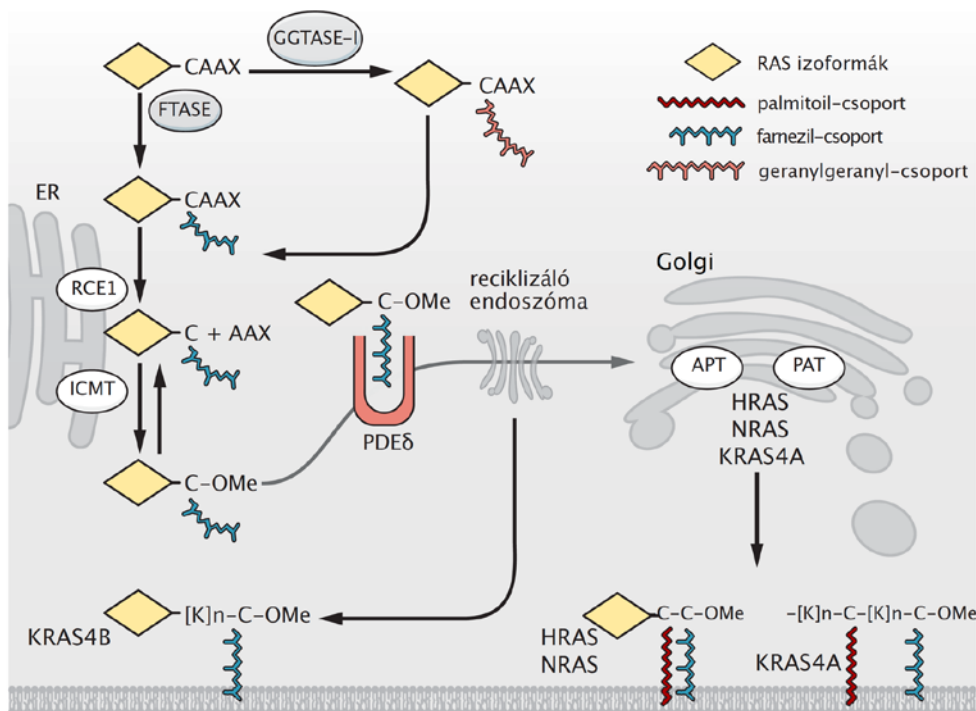
a szintézisük után (**5. ábra**). Fontos megemlíteni, hogy a Ras fehérjék mutációs szekvencia-analízise során nyert adatokból egyértelműen látható, hogy mutáció az esetek túlnyomó többségében a fehérjék N-terminális részén, a GTP kötésért és a további interakciók létrehozásáért felelős szakaszon fordul elő (102). Ez a tény is mutatja a szakasz kiemelt jelentőségét és nagyfokú konzerváltságát a sejtéletti folyamatokban.

A fehérjéknek mind a négy típusa farneziláción esik át a poszttranszlációs folyamat során, azonban a H- és N-Ras, illetve a K-Ras 4A izoforma esetében további lipidmódosítás is történik, melynek során az irányítószakaszokon belül található cisztein oldalláncokon palmitoiláció történik (**5. ábra**). Ez a H-Ras fehérje esetében ráadásul két pozícióban is bekövetkezik (105). A K-Ras 4B esetében nem találhatóak további helyek, ahol lipidmódosítás történik, azonban a fehérje irányító-szekvenciájában számos pozitív töltéssel rendelkező aminosav található, melyek a plazmamembrán negatív töltésű foszfolipidjeivel elektrosztatikus interakciókat hoznak létre, így képesek a további lipidmódosítások hiányát kompenzálni és a fehérjét a negatív töltésekben bővelkedő membránokhoz irányítani (106). A K-Ras 4A izoforma esetében a palmitoiláción kívül ugyancsak megtalálhatóak pozitív töltésű aminosavak az irányító-szekvenciában, melyek az elektrosztatikus interakciókon keresztül a membránasszociáció stabilitását tovább növelhetik (107). Az irodalomból ismert, hogy a preniláció hiánya esetén a fehérjék citoplazmatikus elhelyezkedésűvé válnak és képtelenek lesznek a szignalizációra (108). Azonban azt is bebizonyították, hogy a csak prenilált származékok diffúz endomembrán elhelyezkedést mutatnak (109,110).

A lipidmódosításoknak megfelelően a Ras fehérjék a lipidmódosításoknak felületet biztosító endomembránokon is megtalálhatóak a PM-on kívül (**5. ábra**). Ezen kívül, a lipidmódosításaik, illetve a pozitív töltéseik révén elfogultak lehetnek egyes membránrendszerek irányába, melyet jól mutatnak a fehérjék irányító-szekvenciáival végzett kísérletek is (110,111). Ezek alapján mindegyik izoforma megtalálható az ER-on, ahol a farneziláció által kihorgonyozódva várják a módosításuk utolsó lépéseit, tehát a CAAX doménjük utolsó három aminosavának levágását és a lánc végének metilációját, melyet az RCE1 és az ICMT enzimek katalizálnak (112). A további történéseket tekintve a K-Ras 4B sorsa elválik társaitól, ugyanis itt nem történik további módosítás a fehérje készen áll funkciója ellátására. A másik három Ras esetében palmitoiláció következik be,

amely főleg Golgi lokalizált enzimek által katalizált (113), így a fehérjék ennek a membránnak a felszínén is megtalálhatóak.

A fehérjék a módosítások végeztével a PM felé veszik az irányt, azonban az útvonalak esetében különbségeket találunk. A palmitoilált származékok a sejt vezikuláris transzportrendszerét használva kijutnak a Golgiból a PM-ra (111), tehát a szekretoros vezikulák felszínén is megtalálhatóak. Fontos azonban megjegyezni, hogy a palmitoilációs folyamat reverzibilis a fehérjék esetében, amelyet a Ras esetében is sikerült kimutatni. Ennek köszönhetően csökken a fehérjék PM kötésének erőssége, így a depalmitoilált származékok ismét visszatérnek a Golgi felszínére, ahol újfent megtörtnik a palmitoilációs folyamat, amely egy új ciklus kezdetét jelenti a PM és a Golgi között. A folyamat vizsgálata során arra is fény derült, hogy a fehérje PM-ról történő visszatérése nem igényli a sejt vezikuláris membránrendszerét, hanem egy ettől független útvonalon jön létre (114).



**5. ábra – A Ras fehérjék subcelluláris lokalizációjának és membránkötésének szabályozása, forrás (95).** A fehérjeszintézis után a CAAX domént geranylgeranyl-transzferáz (GGTASE-I) és farnesil-transzferáz (FTASE) enzimek ismerik fel, ezáltal megtörténik az első lipidmódosítás az endoplazmás retikulum (ER) felszínén. Ezek után a fehérjék további átalakítása is létrejön az RCE1 és az ICMT fehérjék által, melyek először a CAAX domén AAX motívumát távolítják el, majd egy metilcsoportot kapcsolnak (-OMe) a fehérjék C-terminálisához. Ezek után a folyamat elválk, és a K-Ras 4B (KRAS4B) izoforma szolubilizáló faktorok és reciklizáló endoszómák közvetítésével a PM-ra kerül, és a pozitív töltéseinek köszönhetően (-[K]n-) stabilizálódik. A többi izoforma a Golgi membránján palmitoilálódik acil-protein tioészteráz (APT) és palmitoil-aciltranszferáz (PAT) enzimek közreműködésével, majd vezikuláris transzporttal a PM-hoz jutnak, ahol stabil kötés kialakítására képesek.

A K-Ras 4B esetében egy másik útvonalon következik be a fehérje PM-hoz jutása, ugyanis itt hiányzik a palmitoilációs lépés a molekula poszttranszlációs módosítása során. Ebben az esetben olyan fehérjéket azonosítottak, melyek szolubilizációs faktorként működve a kapcsolódó lipidláncok következtében lipofil természetűvé vált molekulát átsegítik a hidrofíl természetű citoplazmán a célmembrán eléréséig tartó úton. A fehérjék közös jellemzője, hogy a harmadlagos szerkezetükben egy olyan hasadék található, amely a farnezilcsoport befogadására képes, így elzárva a Ras fehérjék lipidmódosításait a hidrofíl környezetben. Ily módon a K-Ras 4B fehérje intracelluláris mozgását a szintézis és a lebontás közötti életében mindvégig segíteni tudják, míg a H-, illetve N-Ras fehérjéknél az említett PM-Golgi ciklus során a PM-ről disszociáló, depalmitoilált formák transzportját végzik. A K-Ras 4B esetében ezt a szerepet a galectin-3 fehérje végzi (115), míg a H-, illetve N-Ras formáknál a galectin-1 fehérjéről írták le ezt a funkciót (116,117). Ezekon kívül ismert még egy fehérje, a PDE $\delta$  amely mind a három fehérje esetében képes betölteni ezt a szolubilizáló funkciót (118,119). A K-Ras 4B transzportjában a szolubilizáló faktorként működő fehérjéken kívül még szerepet tulajdonítanak a reciklizáló endoszómáknak is, melyek szabályozott módon átvehetik a farnezilált K-Ras 4B molekulákat a PDE $\delta$  fehérjékről, és segítik azok PM-hoz történő szállítását (179).

### 2.3.3 *A Ras fehérjék által elindított jelátviteli útvonalak*

A Ras fehérjék aktivációjának mechanizmusát a fejezet bevezetőjében már ismertettem. Arról is volt szó, hogy az egyes Ras izoformák a sejtek eltérő membrán-rendszereihez kapcsolódhatnak, arról azonban még nem tettem említést, hogy a fehérjék aktivációja milyen következményekkel járhat, illetve, hogy ez kapcsolatban áll-e a fehérjék sejten belüli elhelyezkedésével. A PI3K jelpályában a Ras fehérjék szerepvállalása egyértelműen bizonyított, molekuláris háttere jól feltérképezett. A GTP-t kötött aktív Ras fehérjék a PI3K-ok katalitikus p110-es alegységét kötik, majd aktiválják az enzimet. A kináz aktivációjához vezető másik gyakori útvonal a regulátoros alegységeken keresztül valósul meg, melyet a PPIIns-ek fejezetben már bemutattam a PtdIns(3,4,5) $P_3$  szintézisének leírásakor (**4. ábra**). Mind a két útvonal a tirozin-kináz receptorok aktiválódásához köthető, a két folyamat erősíti egymást a maximális enzimaktivitás elérése céljából (120). A jelpálya során a Ras protooncogén szerepének közvetítésében az mTOR-t tartalmazó fehérjekomplex aktiválása és a Bad proapoptotikus

hatású fehérje gátlása játszik kiemelt jelentőségű szerepet, ami a sejtek apoptózisának csökkenéséhez és a sejtek fokozott túléléséhez vezet (121). Az mTOR a továbbiakban az S6 kinase 1 (S6K1) fehérje működését fokozza, míg a eukarióta iniciációs faktor 4E gátlását csökkenti, mely folyamatok végeredményeként a sejt fehérjeszintézisét fokozza (122). A PI3K jelpálya részeként aktiválódik a Rac kis G-fehérje, melyen keresztül a citoskeleton-átépülés szabályozása figyelhető meg, amely a sejtek migrációjában tölt be fontos szerepet (123). A jelátviteli utat részletesen bemutató ábrát (**4. ábra**) a PPIIns-eket ismertető részben, a PtdIns(3,4,5) $P_3$ -nál már bemutattam.

A MAPK kaszkád aktiválása ugyancsak fontos a Ras fehérjék protoonkogén működésének létrehozásában. A jelpálya kezdeti lépéseként az aktív Ras fehérje a p21-Raf-kináz fehérje PM kihorgonyzódását és működését is fokozza (124). A következő lépésben az aktív Raf fehérje a MEK1 és MEK2 kinázokat serkenti (125), melyek folytatva a kaszkádot az Erk1/2 fehérjék foszforilációját katalizálják (126). A folyamat zárásaként a foszforilált Erk proteinek a sejtmagba transzlokálódnak és transzkripciós faktorokat aktiválnak, többek között a c-Myc, c-Jun, c-Fos és Elk-1 faktorokat, melyek a sejtek proliferációs, differenciációs és transzkripciós válaszait hozzák létre (127). A folyamatban állványfehérjék szerepét is leírták, melyek a jelpálya során aktiválódó fehérjéket a PM-on egy komplexbe tömörítik, elősegítve ezzel a folyamat minél gyorsabb végbemenetelét (128).

A Ras jelpálya harmadik fő útvonala a RalGEF családba tartozó fehérjék aktivációja, melynek során a Ral kis G-fehérje jelátvitelle fokozódik (129,130). A Ral fehérjék felépítésüket tekintve nagyfokú hasonlóságot mutatnak a Ras fehérjékkel, ugyanis hasonlóan a Rasokhoz, itt is egy N-terminális GTP-kötő és interakciós doménre és a C-terminális irányító-szekvenciára osztható fel a fehérje. A Ral irányító-szekvenciája ráadásul nagyfokú hasonlóságot mutat a K-Ras 4B-vel, hiszen itt is több pozitívan töltött aminosavat találunk a szekvenciában. Azonban van egy fontos különbség, mégpedig az, hogy ennél a fehérjénél a CAAX domén aminosavainak köszönhetően nem farneziláció, hanem geranilgeraniláció történik (131). Ezen túlmenően egy újabb közlemény arról számolt be, hogy a fehérje poszttranszlációs lépéseiben a már ismertetett RCE1 és ICMT fehérjék által katalizált módosításokon kívül egy járulékos palmitoiláció is létrejöhet a CAAX-doménen belül (132). A Ral fehérjék jelátvitelét tanulmányozva elmondható, hogy nagyon szerteágazó funkciókkal bírnak, részt vesznek az exo- és endocitózis

folyamataiban (133,134), az aktin citoszkeleton regulációjában (135), de fontos szerepet tulajdonítanak nekik a transzkripció, a sejtproliferáció és a sejtek túlélési jelpályáiban is (136). Ezeken kívül szerepüket leírták már másodlagos hírvivők képzésében is (137,138).

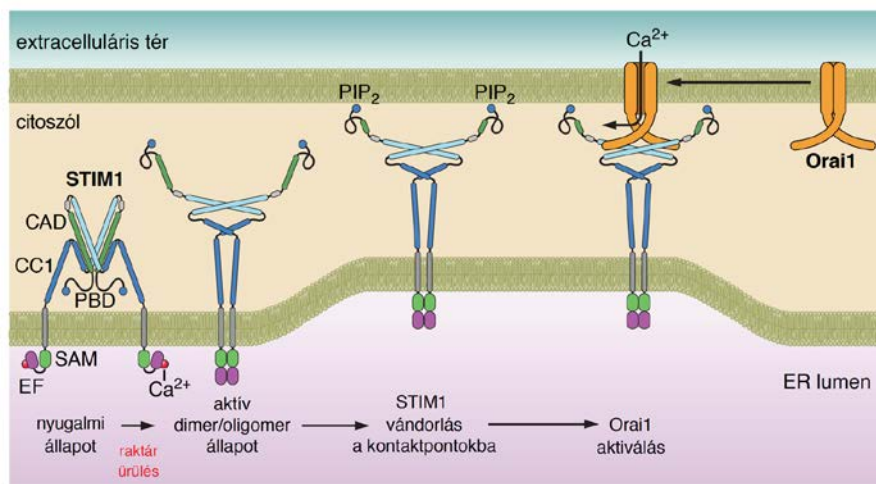
#### **2.4 A kapacitatív kalcium-beáramlás (SOCE) szerepe és szabályozása emlős sejtekben**

A SOCE során az extracelluláris térből egy csatornán keresztül  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok lépnek be a citoplazmába. A  $\text{Ca}^{2+}$ -áramot két fehérje, az ER-ban található STIM (-1 és -2) (139) és a PM-ban található Orai (1, 2 és 3) (140-142) fehérjék kapcsolódása indítja be, melynek kezdeti lépése a sejt kalciumraktárának, az ER-nak a  $\text{Ca}^{2+}$ -depléciója. Az ER típusosan a PLC enzimek aktivációját követően, a citoplazmatikus  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -koncentráció emelkedésekor tesz szert olyan mértékű permeabilitásra, amely az ionok nagyfokú vesztéséhez vezet a nyitott  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -receptorokon keresztül. Ilyen mértékű PLC aktiváció a Gq-fehérjéhez kapcsolt 7-TM receptorok, a tirozin-kináz receptorok, illetve a nem receptor tirozin-kinázok aktivációjakor figyelhető meg (143).

A folyamat során az ER  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmának csökkenését a STIM-1 és -2 fehérjék érzékelik. Szerkezetüket tekintve a STIM fehérjék három részből állnak: egy citoplazmába nyúló C-terminális régióból, egy egyszeres transzmembrán-domémből, melyekkel a protein az ER membránjába ágyazódik, és az N-terminális  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő domémből, amely az ion megkötésére alkalmas, jellegzetes EF-kéz motívumokat tartalmaz (144). A STIM fehérjék két izoformájánál, tehát a STIM-1-nél és a STIM-2-nél a legnagyobb különbség ebben az utóbbi régióban van. A STIM-2 molekula azonos régiója jóval kisebb affinitással köti a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionokat, ezért jóval kisebb raktárürülést is érzékelni képesek, mint ahogyan azt a STIM-1-nél tapasztalható (145). Ennek a jelentősége a két fehérje eltérő működésében is megnyilvánul, ugyanis a STIM-2 fehérje a sejtek nyugalmi  $\text{Ca}^{2+}$ -háztartásának (146), és a raktárak töltöttségi állapotának fenntartásáért felel, míg a STIM-1 fehérje fő funkciója a jelentős  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulással járó állapotok után a raktár újratöltésében rejlik, tehát a klasszikus értelemben vett SOCE mechanizmusa sokkal inkább ehhez az izoformához köthető. További érdekesség, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékelést végző luminális domének az EF-kéz motívumon kívül még tartalmaznak egy hidrofób aminosavakból álló  $\alpha$ -hélix struktúrát is, melyeken keresztül a fehérjék oligomerizálódhatnak az EF-kéz domén  $\text{Ca}^{2+}$ -kötésének megszűnésekor



létrejövő konformációváltozást követően (147). Ennek az oligomer-képzésnek ugyancsak fontos szerepet tulajdonítanak, mivel ilyenkor jön létre a molekula citoplazmatikus C-terminális részének a konformációváltozása, amely később a PM-ban található Orai fehérjékkel alakít ki interakciót (148). A folyamat során a STIM fehérjék a tubuláris ER-szakaszokról az ER-PM között kialakuló kontaktpontokba vándorolnak, ahol a két organelum között lévő hozzávetőlegesen 13 nm-es távolság áthidalása után (149), megtörténik az Orai és STIM1 fehérjék kapcsolata (**6. ábra**).



**6. ábra** A STIM1 és Orai1 fehérjék kapcsolódásának folyamata a SOCE aktiválódása esetén, forrás (150) A SOCE folyamata az ER-nak, mint raktárnak az ürülésével veszi kezdetét, melyet a STIM1 fehérje luminális EF-doménjei regisztrálnak. Ezek után elkezdődik a STIM1 fehérjék dimerizációja majd oligomerizációja, melyben az ugyancsak luminális SAM doménnek van kiemelt jelentősége. Ezzel párhuzamosan a fehérje citoplazmatikus része „kinyílik”, így szabaddá válnak a CAD doménjei, amely később az Orai1-hez kapcsolódik és aktiválja a fehérjét. A SOCE aktiválódásának további feltétele a STIM1 fehérjék kontaktpontokba való vándorlása és stabilizálása, melyben a fehérje PBD doménjei vesznek részt a PM negatív töltésű lipidjeinek, például a PIP<sub>2</sub>-nek a kötésével. A folyamat végén a hasonlóan besűrűsödött Orai1 fehérje és a STIM1 között kialakul a direkt kapcsolat és létrejön kalcium-áram.

Az Orai fehérjék 4 transzmembrándoménnel rendelkeznek, és mind az N-, mind a C-terminális szakaszuk intracellulárisan helyezkedik el (151). A két fehérje kapcsolódásában szerepet játszó molekularészleteket mindkét fehérje esetében többen, részletesen vizsgálták. Úgy tűnik, hogy mind a két fehérje részéről a C-terminális szakaszoknak van kiemelt jelentősége a molekulák kezdeti kapcsolódásában, míg az Orai fehérjék N-terminális részének pontos szerepét még nem ismerik, de feltételezik, hogy a kapcsolat stabilitásának erősítéséért, vagy a csatorna kapuzási mechanizmusáért felel (152-154). A két fehérje kapcsolódási mechanizmusának részletesebb megismerése érdekében, illetve a minimálisan elegendő molekularészletek meghatározásához, amely még elégséges a két molekula kapcsolódásához számos vizsgálat készült. Ezekben mutációkat, és trunkált szakaszokat tartalmazó STIM1 fehérjéket használtak. Az

eredmények alapján egyértelműen látszik, hogy a fehérje C-terminális SOAR doménjének megléte szükséges, és elégséges feltétele a funkcionálisan aktív csatornaműködéshez, ugyanis a fehérjedarab tranzien expressziója esetén konstitutívan aktív  $\text{Ca}^{2+}$ -áramot tapasztaltak (152,155). Fontos azonban megjegyezni, hogy sem az Orai fehérje, sem az ily módon megrövidített STIM1 fehérje nem képes a PM-ER kontaktpontokban felhalmozódni, habár oligomerizációra így is képes, ami bizonyítja, hogy a folyamathoz ez a molekulárszlet nem járul hozzá (156). Abban az esetben, ha a STIM1 fehérjék tartalmazzák a C-terminális végen elhelyezkedő polibázikus fehérjeszakaszt (PBD, **6. ábra**), akkor lehetővé válik a fehérje dúsulása önmagában is, amely a domén kiemelt jelentőségére mutat rá (157). Feltehetően a STIM fehérjék ennek a segítségével képesek a kontaktpontok megtalálására, ugyanis, ha a PM közel helyezkedik el az ER-ban történő diffúziójuk során, akkor a polibázikus részek megkötik a PM negatívan töltött foszfolipidjeit és stabilizálják a fehérjét, míg az Orai-val történő kapcsolat be nem következik.

Ennek a folyamatnak a valószínűségét növelik azok a vizsgálatok, melyekben a polibázikus régiók lipidkötését vizsgálták liposzómák segítségével. A kísérletek során azt tapasztalták, hogy a STIM1 fehérje polibázikus régiója csak dimer, vagy tetramer formában kötötte a PM-ban nagy mennyiségben megtalálható  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -ot, míg a STIM2 fehérje azonos szakasza már egyedi molekulaként is nagy kötéserősséggel bírt (158). Egy további vizsgálatban élő sejteken is vizsgálták a PM  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  és  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  tartalmát a SOCE működésével összefüggésben, és a lipidek csökkentésekor nem jött létre a fehérjék dúsulása kontaktpontoknak megfelelően, illetve a csatornán keresztüli áram is megszűnt (159). Ezekon kívül a PM  $\text{PtdIns}4\text{P}$  tartalmának szerepére utaló közleményt is találhatunk az irodalomban (160). A felsoroltakból is jól látható, hogy a PM töltéseit biztosító lipideknek a szerepe még nem egyértelműen bizonyított a folyamatban, ezért munkám egyik céljaként a folyamatban szereplő lipidek vizsgálatát tűztem ki, melyek eredményeit az Eredmények c. fejezetben mutatom be részletesen.

### 3 Célkitűzések

Dolgozatom korábbi részeiben bemutattam, hogy a fehérjék PM lokalizációjában fontos tényező lehet a fehérjék pozitív töltésű aminosavai és a PM negatívan töltött foszfolipidjei között kialakuló elektrosztatikus interakció. Továbbá ismertettem a foszfoinozítid molekulák családját, mint szerteágazó funkciókkal bíró lipideket, melyek feltehetően hozzájárulnak az ilyen jellegű interakciók kialakulásához a PM-on.

Munkám során két témakörrel foglalkoztam, melyekben a közös pontot a PM PPIIns-frakciói, illetve ezek szabályozó szerepe szolgáltatta. Az első részben a perifériás PM fehérjék, azon belül elsősorban a Ras fehérjecsalád sejten belüli elhelyezkedésében és funkciójában bekövetkező változásokat vizsgáltam a PM PPIIns lipidjeinek csökkentése során. A második részben ugyancsak a lipidek szerepét vizsgáltam egy másik folyamat, a kapacitatív kalcium-beáramlás (SOCE) szabályozásában.

A vizsgálatok előtt, a munkaterv megvalósításához az alábbi célokat és feladatokat tűztem ki magam elé:

- A perifériás plazmamembrán-fehérjék, különös tekintettel a Ras fehérjék mozgásának követésére alkalmas kvantitatív módszer kifejlesztése
- A perifériás plazmamembrán-fehérjék, illetve a Ras fehérjék lokalizációjának és a mozgásuk útvonalának vizsgálata a PM PPIIns depléciója során
- Az egyes PM PPIIns molekulák szerepének vizsgálata a fehérjék lokalizációjában
- A Ras fehérjék gyors intracelluláris mozgását eredményező fiziológiás folyamatok vizsgálata
- A Ras fehérjék PPIIns függő mozgásából eredő funkcionális következmények feltérképezése
- A PM PPIIns molekulák szabályozó szerepének vizsgálata a SOCE folyamatában

## 4 Módszerek

### 4.1 A kísérletek során használt anyagok

A molekuláris biológiai reagenseket, beleértve a restrikciós enzimeket, a Fermentas cégtől (Vilnius, Litvánia) rendeltük. A polimeráz-lánreakcióhoz használt Pfu Turbo Hotstart polimerázt az Agilent Technologies cégtől (Santa Clara, CA, USA) szereztük be. A sejtvonalak fenntartásához szükséges szövetkultúra edényeket, illetve a kísérletekhez használt 24-, illetve 96-lyukú lemezeket a Greiner Bio-One GmbH-től (Kremsmunster, Ausztria), míg a konfokális mikroszkópos vizsgálatoknál alkalmazott 8-lyukú  $\mu$ -Slide-okat az IBIDI GmbH-től (Martinsried, Germany) vásároltuk. A sejtek transzfekciójához használt Lipofectamine 2000-et az Invitrogen (Carlsbad, Kalifornia, USA), a GeneCellin reagenst pedig a BioCellChallenge vállalatától (Toulon, Franciaország) rendeltük. A cölenterazin h szubsztrát a Regis Technologies cég (Morton Grove, Illinois, USA) terméke. A kísérletek során alkalmazott rapamycint a Selleckchem-től (Houston, Texas, USA), az ionomycint az Abcam-től (Cambridge, UK), a deltarasin-t a Cayman Chemicals-től (Ann Arbor, MI) vásároltuk. Az A1 vegyület Balla Tamás (NICHD, NIH, Bethesda, Maryland, USA) kollaborációs partnerünk munkacsoportja által szintetizált vegyület, melyet rendelkezésünkre bocsájtott. Az összes többi, nem részletezett vegyületet és anyagot a Sigma-Aldrich cégtől (St. Louis, Missouri, USA) szereztük be.

### 4.2 Plazmidkonstrukciók

A vad-típusú M3 muszkarinos acetilkolin receptort (M3R) (N-terminálisan 3x-os HA epitóp jelölést tartalmaz) az S&T cDNS Resource Center-től (Rolla, Missouri, USA) rendeltük. A vad típusú, humán epidermális növekedési faktor receptort (EGFR) (90), és a nem internalizálódó, mutáns 1A típusú patkány angiotenzin II receptort (AT1R- $\Delta$ 319) (161) munkacsoportunk már korábban is használta.

A különböző plazmamembránhoz irányított Venus konstrukciók elkészítéséhez a jelölt fehérjék rövid irányító-szekvenciáit kódoló DNS-szakaszokat DNS-oligo formájában a Sigma-Aldrich cégnél (St. Louis, Missouri, USA) szintetizáltattuk meg: a Lyn fehérje N-terminális 14 aminosavát (Lyn<sub>1-14</sub>, Genebank elérési szám: NM\_002350.3) (162), az Lck fehérje N-terminális 10 aminosavát (Lck<sub>1-10</sub>, Genebank elérési szám: NM\_005356.4) (163), a c-Src fehérje N-terminális 15 aminosavát (c-Src<sub>1-15</sub>, Genebank

elérési szám: NM\_005417.4) (163), illetve a K-Ras és a H-Ras fehérjék C-terminális 22 aminosavát (K-Ras-CAAX és H-Ras-CAAX, Genebank elérési számok: NM\_004985 és NM\_005343) (164). Ezek után a rövid DNS-szekvencia darabokat az N-terminális irányítószakaszok esetében N1-es (Clontech Laboratories, Mountain View, Kalifornia, USA), míg a C-terminálisok esetében C1-es (Clontech Laboratories, Mountain View, Kalifornia, USA) plazmidba helyeztük be a monomer Venus (tartalmazta az A206K mutációt (162)) fluoreszcens fehérjeét kódoló DNS-szakasz elejére, illetve végére az NheI és BglII, illetve EcoRI és BamHI restrikciós enzimek segítségével. A fúziós fehérjék létrehozásakor az alábbi aminosavakból álló összekötő szakaszokat használtuk: a Lyn<sub>1-14</sub>-Venus esetében a DPTRSRAQASNSDPPVAT, az Lck<sub>1-10</sub>-Venus és a c-Src<sub>1-15</sub>-Venus esetében a NNNNDPTRSRAQASNSDPPVAT, míg a Venus-K-, és Venus-H-Ras-CAAX konstrukciónál a NEQRSRAQASNS szakasz került beépítésre. A teljes hosszúságú, konstitutívan aktív mutáns Citrine-K-Ras G12V fehérjét (Genebank elérési szám: NM\_004985), illetve a teljes hosszúságú vad típusú és konstitutívan aktív mutáns YFP-H-Ras WT és YFP-H-Ras G12V konstrukciókat John F Hancock professzor bocsájtotta rendelkezésünkre. A kapott konstrukciókban lecseréltük a fluoreszcens fehérjéket az irányító-szekvenciáknál is használt monomer Venus fehérjére, melyhez a Ras fehérjék DNS-szekvenciáját polimeráz-lánreakció (PCR) segítségével sokszorosítottuk, majd a monomer Venus DNS-szekvenciáját tartalmazó C3-as plazmidba ligáltuk SacI és KpnI restrikciós enzimek segítségével. Az így kapott konstrukciókban a fluoreszcens fehérje és a Ras fehérje DNS-szekvenciája közötti összekötő szakasz aminosav-szekvenciája a YSDLELTTMYPYDVPDYA volt. A hiányzó domináns negatív mutánsok (K-Ras S17N és H-Ras S17N), illetve a vad típusú K-Ras (K-Ras WT) fehérje DNS-szekvenciáját a konstitutívan aktív mutáns DNS-szekvenciájának felhasználásával, irányított mutagenézissel hoztuk létre.

A különböző endomembránokhoz irányított luciferáz konstrukciók elkészítéséhez a következő fehérjék teljes hosszúságú formájának, vagy azok irányítószakaszainak DNS-szekvenciáit használtuk fel: a mitokondrium esetében a TOM 70 fehérje első 30 aminosavát (Genebank elérési szám: X05585.1), a Golgi-hoz történő irányításnál a TGN38 fehérjét (Genebank elérési szám: BC008461), az endoplazmás retikulum (ER) esetében a Sac1 fehérje C-terminális szakaszát (Genebank elérési szám: NM\_001179777), míg a korai endoszómáknál (EE) az EEA1 fehérje Fyve-doménjét

(Genebank elérési szám: BX648463). A TOM 70 fehérje első harminc aminosavának DNS-szekvenciáját megszingetizáltattuk, majd super Renilla luciferáz DNS-szekvenciáját (165) tartalmazó N1 plazmidba helyeztük az NheI és BglII enzimek segítségével. A TGN38 (166), SacI (149), illetve EEA1 (167) fehérjék említett fragmentumait már korábban használtuk. A fehérjék megfelelő darabjait kódoló DNS-szakaszokat PCR segítségével sokszorosítottuk, majd a super Renilla luciferáz DNS-szekvenciáját tartalmazó N1-es plazmidba helyeztük az NheI és BglII enzimek segítségével a TGN38-Luciferáz konstrukció esetében, vagy super Renilla luciferáz DNS-szekvenciáját tartalmazó C1-es plazmidba helyeztük az EcoRI és BamHI restriktív enzimek használatával a Luciferáz-ER és a Luciferáz-EE fehérjék szekvenciáinak elkészítésekor. A konstrukciók létrehozása után az alábbi aminosavakból álló összekötő szakaszok voltak a luciferáz enzim és az endomembrán rendszerekre jellemző specifikus fehérje(darabok) között: DPTRSRAQASNSDPPVAT a Golgihoz és a mitokondriumhoz irányított konstrukció esetében, míg SGLRSRAQASNSRV és RSRAQASNSRV az ER-hoz és az EE-hoz irányított enzim esetében.

A rapamicinnel indukálható plazmamembrán lipid-depléciós rendszer tagjait, beleértve a mikroszkópos méréseknél használt T2A-szakasszal összekötött formát (90), a TGN38-FRB-mRFP konstrukciót (166), melyet a citoplazmatikus foszfatáz Golgira történő irányítására használtunk, illetve a munkában szereplő plazmamembrán lipid-,  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -(R265K) és  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzorok készítésének lépéseit korábbi munkánkban már részletesen bemutattuk(90,168).

### 4.3 Alkalmazott sejtvonalak

A kísérleteket HEK 293T, COS-7 és HeLa sejteken végeztem, melyeket az ATCC (Masassas, Virginia, USA) cégtől vásároltunk. A sejtek tenyésztését 10cm-es petricsészékben végeztük 10%-os főtális borjúsérumot (Lonza, Bázél, Svájc), valamint penicillint (50 U/ml) és sztreptomocint (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's médiumban (DMEM; Lonza, Bázél, Svájc), egy 37°C-os, 5%  $\text{CO}_2$ -os párás levegőt biztosító inkubátorban.

#### 4.4 Biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) mérések

A biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer módszer két fehérje közötti interakció mértésére alkalmas. A technika alapja, hogy egy luciferáz enzim, a szubsztrátjának, a cölienterazinnak a bontása során cölienteramidot képez. Ezzel párhuzamosan fényemisszió történik melynek spektruma 480 nm-es csúccsal rendelkezik. Abban az esetben, ha molekuláris közelségben (<10 nm) egy olyan fluoreszcens fehérje foglal helyet, amely képes az említett enzimatis reakció során keletkezett energia befogására, akkor maga is gerjesztődik, illetve fényt bocsájt ki a rá jellemző hullámhossz-tartományában. Ezzel párhuzamosan, a 480 nm-es luciferázra jellemző hullámhossz-tartományban az emittált fényintenzitás csökkenését tapasztalhatjuk. Akzeptorként kísérleteinkben a Venus fluoreszcens fehérjét használtuk, melynek emissziós értékeit 530 nm-en mértük. Tehát, ha a donor és az akceptor fehérjék közelednek egymáshoz, akkor az 530/480 nm-en mérhető intenzitások hányadosában emelkedést, ha távolodnak egymástól, akkor csökkenést tapasztalhatunk.

A BRET mérések elvégzéséhez HEK 293T sejteket használtam. A mérés előtti napon a 10 cm-es sejttenyésztő petricsészékben tenyésztett adherens sejteket tripszin segítségével leválasztottam a felszínről, majd centrifugálás után  $7 \times 10^5$ /ml koncentrációban, Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) csökkentett szérums tartalmú oldatban reszuszpendáltam őket. Ezek után a sejtszuspenzióhoz 100  $\mu$ l-ként 50  $\mu$ l transzfekeiós elegyet pipettáztam, amely 1,5  $\mu$ l GeneCellin reagenst és 0,15-0,2  $\mu$ g DNS-t tartalmazott a jelölt konstrukciókból. Az összekeverés után a sejteket is tartalmazó keverékből 150  $\mu$ l-t osztottam szét poli-L-lizinnel előkezelt (0,001%, 1 óra) 96 lyukú lemezekre lyukanként. Hat óra elteltével a sejtekhez lyukanként 100  $\mu$ l szérums tartalmú DMEM oldatot pipettáztam. A kísérleteket 25 órával a transzfekeiós vége után végeztem, melyek kezdete előtt fél órával a sejteken található médiums tartalmú DMEM oldatot a mérésekhez használt 50  $\mu$ l módosított Krebs-Ringer pufferoldatra (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,7 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM glucose, and 10 mM Na-HEPES, pH 7,4) cseréltem le. A mérések kivitelezése 37°C-on, Thermoscientific Varioskan Flash Reader (PerkinElmer) szövetkultúra-edény leolvasó készülék segítségével történt. A BRET mérések során a luciferáz enzim szubsztrátjával szolgáló cölienterazine h-t tartalmazó Krebs-Ringer pufferoldatot 40  $\mu$ l térfogatban, 5  $\mu$ M-os végkoncentrációban adtam a sejtekhez. A mérések során a donor és akceptor

fehérjére jellemző emittált fényintenzitásokat egy 485, illetve egy 530 nm-es emissziós filter közbeiktatásával mértem egyenként 0,5 másodpercig, pontonként. A mérések során használt vegyületeket a már említett módosított Krebs-Ringer pufferoldatban hígítottam ki a szükséges koncentrációra és 10 µl-es térfogatban pipettáztam a sejtekre. A kezelések hatásának kimutatásához minden esetben használtunk olyan kontroll mérési pontokat is, melyek ingerlése az adott vegyület oldószerével történt, természetesen ezeket is a már említett módon hígítottuk és adagoltuk a sejtekhez 10 µl-es térfogatban. Az ingerlések idején a mérést felfüggesztettük, ugyanis a sejteket tartalmazó edény ilyenkor a műszer mérési teréből az ingerlés idejéig kiadásra került. Az összes mérésnél 2-4 párhuzamosan mért pont átlagértékei adták az egy kísérlet során kapott eredményt. A kísérleteket legalább háromszor megismételtem. A BRET-hányadosok kiszámolásánál az 530, illetve a 485 nm-en mért intenzitások hányadosát számítottam ki. A plazmamembránhoz irányított Venus konstrukciók és a különböző endomembrán rendszerekhez irányított luciferáz enzim közötti interakció mérésénél a rapamycinnel (300 nM), illetve carbachollal (10 µM) stimulált és a kontroll (DMSO, illetve desztillált víz) pontok közötti BRET-hányados értékek különbségével jellemeztük az interakció növekedését, illetve csökkenését. A plazmamembrán lipid szintjeinek mérésekor normalizálást végeztünk, a kiindulási BRET-hányados értékeket tekintettük 100%-nak, míg 0%-nak azt az értéket, melyet csak citoplazmatikus luciferáz enzimet tartalmazó sejteknél mérhetünk. Erre a korrekcióra azért volt szükség, mert a BRET mérések során a kiindulási BRET-hányados értéke nem csak a lipidek abszolút mennyiségétől függ, hanem a mérésükre szolgáló intermolekuláris szenzor fehérjepárjának expressziójától is, amely mérésről-mérésre változhat. A citoplazmatikusan elhelyezkedő intramolekuláris szenzorok, tehát az  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$  és a  $\text{Ca}^{2+}$  szenzorok esetén a nem stimulált kontrollpontok spontán változásaira korrigáltam a stimulált pontok adatait, majd a stimulálás előtti utolsó három pont átlagértékére normalizáltam a görbéket. Ezt a műveletet az  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szenzor esetén egy reciprokra történő átváltás követte, amely az adatok egyértelműbb prezentálását segíti, mivel a szenzor a működéséből adódóan az  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$  koncentráció emelkedésére csökkenő BRET-hányadossal reagál.



## 4.5 Konfokális mikroszkópia

A konfokális mikroszkópos mérésekhez HEK 293T és COS-7 sejteket használtam, melyeket a mérést megelőző második napon poli-L-lizinnel előkezelt (0,001%, 1 óra) 8 lyukú IBIDI  $\mu$ -Slide-okra helyeztem  $3 \times 10^4$ , illetve  $2 \times 10^4$  sejt/lyuk denzitásban 300  $\mu$ l 10%-os főtális borjúsérumot, valamint penicillint (50 U/ml) és sztreptomicint (50  $\mu$ g/ml) tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) médiumban. A mérés előtt 24 órával a sejtek transzfekciója során, a médiumot 200  $\mu$ l transzfekciós elegyre cseréltem, amely tartalmazta a szükséges DNS konstrukciókat 0,1  $\mu$ g/100  $\mu$ l, illetve a transzfekciós reagensként használt Lipofectamine 2000-et 0,165  $\mu$ l/100  $\mu$ l koncentrációban, Opti-MEM médiumban. A transzfekció után 6 órával a sejteken található transzfekciós elegyet ismét 300  $\mu$ l, 10%-os főtális borjúsérumot, valamint penicillint (50 U/ml) és sztreptomicint (50  $\mu$ g/ml) tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) médiumra cseréltem. A mérések előtt közvetlenül a sejteken található médiumot 300  $\mu$ l módosított Krebs-Ringer pufferoldatra (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,7 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM glucose, and 10 mM Na-HEPES, pH 7,4) cseréltem. A különböző vegyületekkel történő stimulációkor azokat 100  $\mu$ l pufferoldatban hígítottam a szükséges koncentrációban, majd a sejtekre pipettáztam. A kísérletek során a felvételek készítéséhez egy Zeiss LSM 710-es típusú pásztázó konfokális mikroszkópot (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) és egy 63-szoros nagyítású, 1.4-es numerikus apertúrájú Plan-Apochromat (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) immerziós olajos objektívet használtam. A képeket multi-track frame-scan módban, 1  $\mu$ m-es optikai szeletvastagsággal készítettem. A képek rögzítése Zeiss Zen Black (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) szoftverrel történt. A mérések során a sejtek által expresszált fluoreszcens fehérjével jelölt konstrukciókat egy 458 nm-es (Cerulean fluoreszcens fehérje) és egy 514 nm-es (mVenus fluoreszcens fehérje) hullámhosszúságú argonlézer, illetve egy 543 nm-es (mRFP) hullámhosszúságú fényt emittáló hélium-neon lézer segítségével gerjesztettem. Az emittált fényintenzitások detektálása az alábbi hullámhossz-tartományokban történt: Cerulean: 465-480 nm, mVenus: 520-560 nm és mRFP: 612-680 nm. A képek feldolgozásához Fiji és Photoshop (Adobe, San Jose, CA, USA) szoftvereket használtam.

#### 4.6 Sejtpermeabilizációs kísérletek

A sejtpermeabilizációs kísérletekhez HeLa sejteket használtam, melyeket 25 mm átmérőjű fedőlemezekre helyeztem a mérést megelőző második napon 2 ml 10%-os főtális borjúsérumot, valamint penicillint (50 U/ml) és sztreptomicint (50 µg/ml) tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) médiumban,  $2 \times 10^5$ /fedőlemez denzitásban. A sejtek transzfekeciója során hasonlóan a konfokális méréseknél leírtakhoz, a médiumot transzfekeciós elegyre cseréltem, amely tartalmazta a szükséges DNS konstrukciókat 0,5 µg/ml, illetve a transzfekeciós reagensként használt Lipofectamine 2000-et 2 µl/ml koncentrációban, Opti-MEM médiumban. A transzfekeció után 6 órával a sejtekre 1 ml, 10%-os főtális borjúsérumot, valamint penicillint (50 U/ml) és sztreptomicint (50 µg/ml) tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) médiumot pipettáztam. A kísérletek előtt közvetlenül a sejteken található médiumot 800 µl intracelluláris médiumra cseréltem (117 mM KCl, 6 mM NaCl, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM K<sup>+</sup>-MOPS, 2 mM EGTA, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> and 100 nM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,1). A permeabilizálás során a digitonint 25 µg/ml végkoncentrációban alkalmaztam, és 200 µl térfogatban mértem a sejtekhez. A képek rögzítése a konfokális mikroszkópia címnél leírtaknak megfelelően, azonos műszerrel, beállításokkal és szoftverekkel történt.

#### 4.7 [<sup>3</sup>H]-Leucin beépülési vizsgálat

A különböző Ras mutánsok és a plazmamembrán lipid-depléciójának hatását a sejtek proteinszintézisére COS-7 sejteken, [<sup>3</sup>H]-Leucin beépülési módszerrel vizsgáltuk. Ehhez a sejteket  $5 \times 10^4$ /lyuk denzitásban poli-L-lizinnel előkezelt (0,001%, 1 óra) 24 lyukú sejttenyésztő edényekbe osztottam. Egy nappal később a sejteken található médiumot transzfekeciós elegyre cseréltem, amely tartalmazta a jelölt DNS konstrukciókat és a transzfekeciós reagensként használt Lipofectamine 2000-t 500 µl Opti-MEM médiumban. 6 óra elteltével a sejteken található transzfekeciós elegyet 500 µl, 10%-os főtális borjúsérumot, valamint penicillint (50 U/ml) és sztreptomicint (50 µg/ml) tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) médiumra cseréltem le. Egy nap (24 óra) elteltével a sejteken ismét médiumcsere történt, sérumot nem tartalmazó DMEM oldatra. Ezt követően, 6 óra múlva a sérummegvonás alatt álló sejtekre friss, sérumot nem tartalmazó DMEM oldatot pipettáztunk, amely már tartalmazott 1 µCi/ml aktivitású [<sup>3</sup>H]-

mal jelzett leucin izotópot (American Radiolabeled Chemicals, Saint Louis, MO, USA) és a lipid-depléciós rendszer aktiválásához szükséges 100 nM rapamycint is. A sejtek ingerlését nyolc óránként megismételtük, a rapamycint 10 µl-es térfogatban adtuk a sejtekhez. Egy nappal (24 órával) az első ingerlés után a sejteket jégre helyeztük, és kétszer átmostuk jéghideg PBS oldattal, hogy a nem adherens sejtektől megszabaduljunk. Ezek után a sejteket 30 percig 5%-os triklór-ecetsav oldatban tartottuk, majd PBS-sel történő mosást követően a fixált sejteket 0,5 M NaOH oldattal szolubilizáltuk szintén harminc percig. Végezetül a lizált sejteket tartalmazó szuszpenziót 10 ml OptiPhase HiSafe3 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) szcintillációs folyadékot tartalmazó csövekbe pipettáztuk és az aktivitást Beckman LS5000 TD típusú műszerrel regisztráltuk. A kísérletek során a pontokat triplikátumokban mértünk le minden egyes konstrukció esetén, és a kapott eredményeket átlagoltuk.

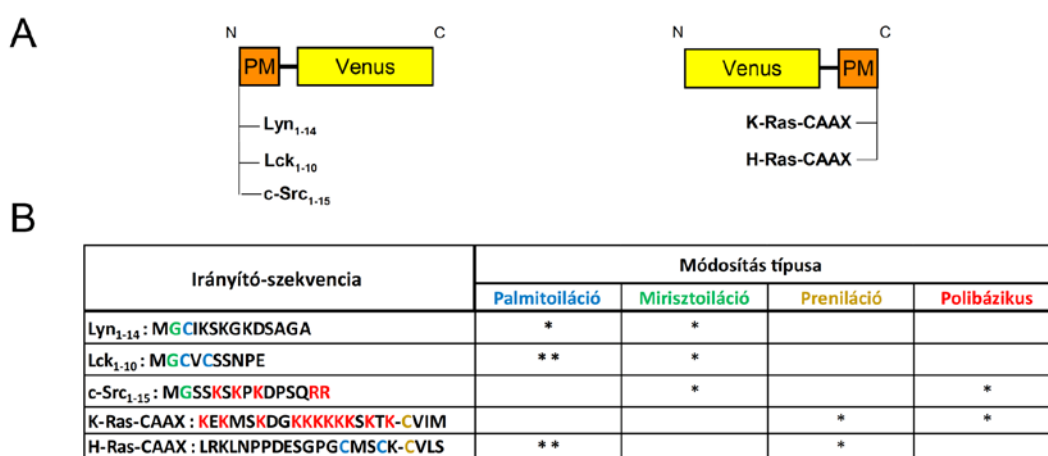
#### 4.8 Statisztikai analízis

A mérési adatokat a Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) program segítségével dolgoztuk fel. Az ábrák készítéséhez és a statisztikai számításokhoz a SigmaPlot 10.0 programot használtam (Systat Software Inc, Chicago, IL, USA). A plazmamembránhoz irányított Venus konstrukciók és a különböző endomembrán rendszerekhez irányított luciferáz enzimek közötti interakció mérésénél az ingerlés előtti, illetve utáni utolsó három mérési pontok átlagát párosított t-teszt segítségével hasonlítottuk össze. A különböző csoportok összehasonlításánál a görbék utolsó három pontjaiból átlagot képeztünk és ezeket hasonlítottuk össze két görbe esetén kétmintás t-próba, illetve három görbe esetén egyutas varianciaanalízis (ANOVA) segítségével. Az izotóppal jelölt leucin beépülési kísérleteknél a különböző csoportok összehasonlítása kétutas ANOVA-val történt. Az egy-, illetve kétutas varianciaanalíziseknél a csoportok egyenkénti összehasonlításához Holm-Sidak post hoc tesztet végeztünk el. Az Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- és a Ca<sup>2+</sup>-válaszok kinetikájának karakterizálása során, a csökkenő-fázis féléletidejének ( $\tau$ ) meghatározásához, minden egyes kísérletnél görbeillesztés történt egy 3 változós exponenciális függvény alapján ( $y=y_0+ae^{-bx}$ ). Az így kapott  $\tau$ -értékeket leátlagoltuk, majd az átlagokat kétmintás t-próbának vetettük alá.

## 5 Eredmények

### 5.1 A plazmamembránhoz kötődő fehérjék sejten belüli mozgásának követésére használt energiatranszfer alapú módszer beállítása

Kísérleteink során számos plazmamembránhoz (PM) irányított Venus fehérjét készítettünk perifériás PM fehérjék irányító-szekvenciájának felhasználásával (169). A konstrukciók létrehozásakor maximálisan figyelembe vettük az irányítószakaszoknak az eredeti fehérjékben elfoglalt helyzetét, tehát azokat a Venus fehérje megfelelő oldalaihoz kapcsoltuk (7. A ábra).

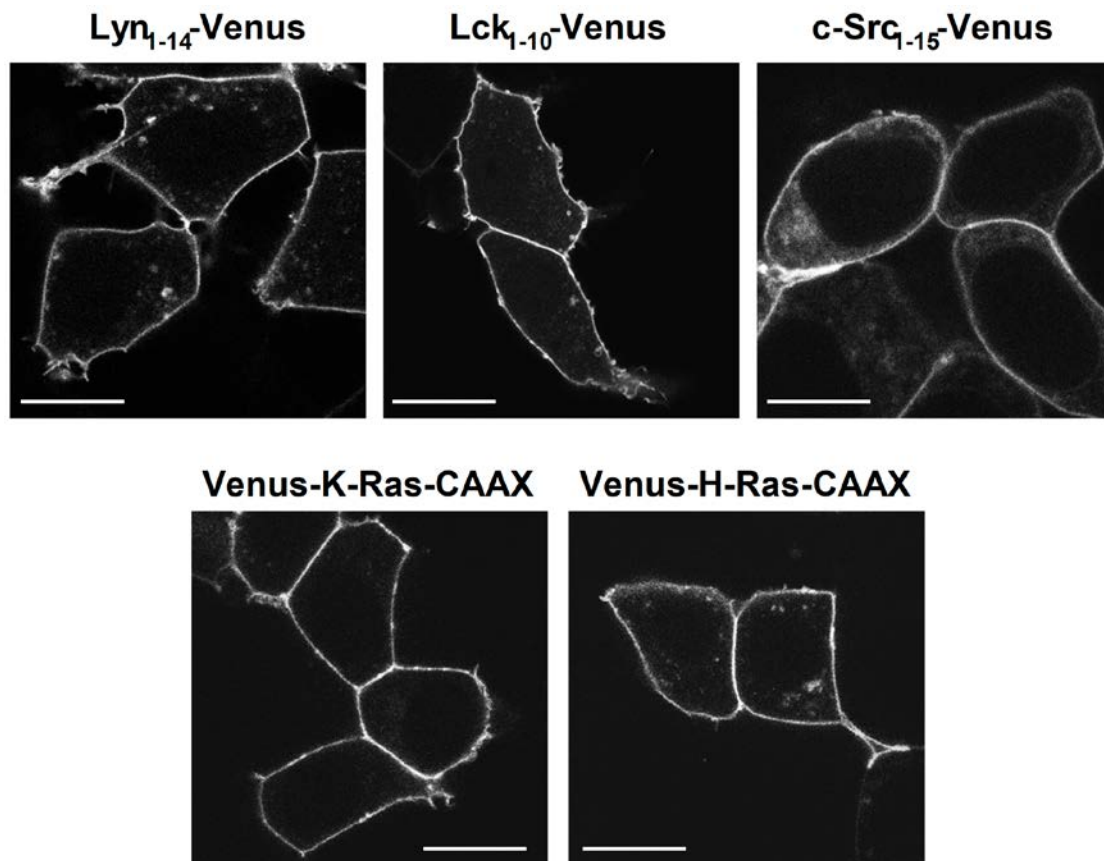


**7. ábra** – A kísérleteinkben használt konstrukciók felépítése és PM-kötésének mechanizmusa (A) Az általunk használt konstrukciók felépítésének sematikus ábrázolása. A Venus fehérje módosításához a jelölt perifériás PM fehérjék N- és C-terminálisan elhelyezkedő irányító-szekvenciáit használtuk fel. (B) Az alkalmazott irányító-szekvenciák részletes aminosavsorrendjének és a szakaszokon belül létrejövő poszttranszlációs lipidmódosítások bemutatása. A színek a módosítás helyéül szolgáló aminosavakat jelölik: kék – palmitoiláció, zöld – mirisztoiláció, barna – preniláció, piros – polibázikus aminosavak a szekvencián belül. A táblázat lipidmódosítást jelző oszlopában \*-ok a módosítások számát jelöli.

A fúziós fehérjék tervezésekor olyan perifériás PM fehérjéket választottunk, melyek irányító-szekvenciái más típusú PM kötődést tesznek lehetővé az eltérő poszttranszlációs módosításoknak megfelelően. A Lyn fehérje N-terminálisának első 14 aminosava (Lyn<sub>1-14</sub>-Venus) egyszeresen mirisztoilálódik és egyszeresen palmitoilálódik, az Lck kináz N-terminálisának első 10 aminosava (Lck<sub>1-10</sub>-Venus) egyszeresen mirisztoilálódik és kétszeresen palmitoilálódik, a c-Src N-terminális első 15 aminosava (c-Src<sub>1-15</sub>-Venus) csak egy szimpla mirisztoiláción esik át. A K- és H-Ras fehérjék esetében a fehérjék PM-hoz való irányításában a fehérjék C-terminális szakasza játszik szerepet. Ennek megfelelően a Venus fehérje C-terminális oldalához kapcsoltuk a két izoforma utolsó 22 aminosavából álló szakaszt (Venus-K-Ras-CAAX és Venus-H-Ras-CAAX), amely a K-Ras esetében prenilálódik, míg a H-Ras esetében a prenil-csoporton kívül két palmitoil-

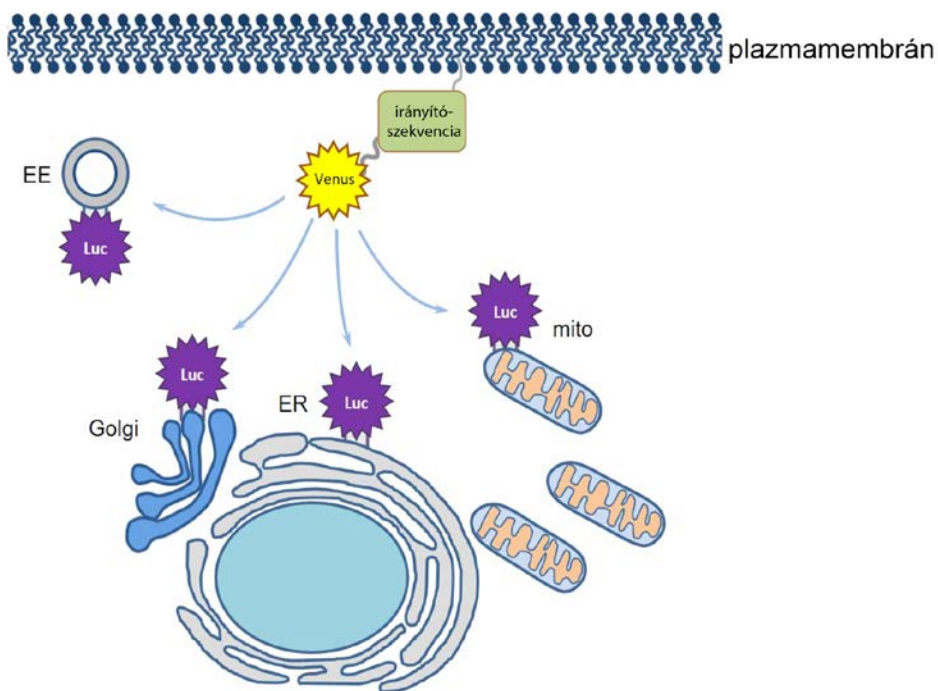
csoporthoz is kap a poszttranszlációs módosítások során (**7. B ábra**). Fontos megjegyezni azonban, hogy a c-Src és a K-Ras fehérjék irányító-szekvenciáiban számos pozitív töltésű aminosavat is találhatunk, melyek fontos szerepet töltenek be a fehérjék megfelelő PM lokalizációjának létrehozásában a PM negatív töltésű foszfolipidjei és az említett szakaszok között kialakuló elektrosztatikus interakció által.

Az irányító-szekvenciákat tartalmazó fúziós fehérjék létrehozása után arra voltunk kíváncsiak, hogy a vártaknak, illetve az irodalmi adatoknak megfelelően (162,163,170) a PM-on helyezkednek-e el. Ehhez a konstrukciókat HEK 293T sejtekben fejeztük ki, és megvizsgáltuk azok sejten belüli elhelyezkedését konfokális mikroszkóp segítségével. A **8. ábrán** is szépen látható, hogy a fehérjék szépen kirajzolták a sejtek plazmamembránját, azonban a legtöbb esetben intracellulárisan is láthatunk fluoreszcens jelet, melynek mennyisége azonban elmaradt a PM intenzitásához képest.



**8. ábra** – A PM-hoz irányított Venus konstrukciók sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata Az irányító-szekvenciákkal módosított Venus fehérjék intracelluláris lokalizációja, a fehérjéket transziensen kifejező HEK 293T sejtekben, konfokális mikroszkóppal készült reprezentatív képeken. Lépték: 20  $\mu$ m.

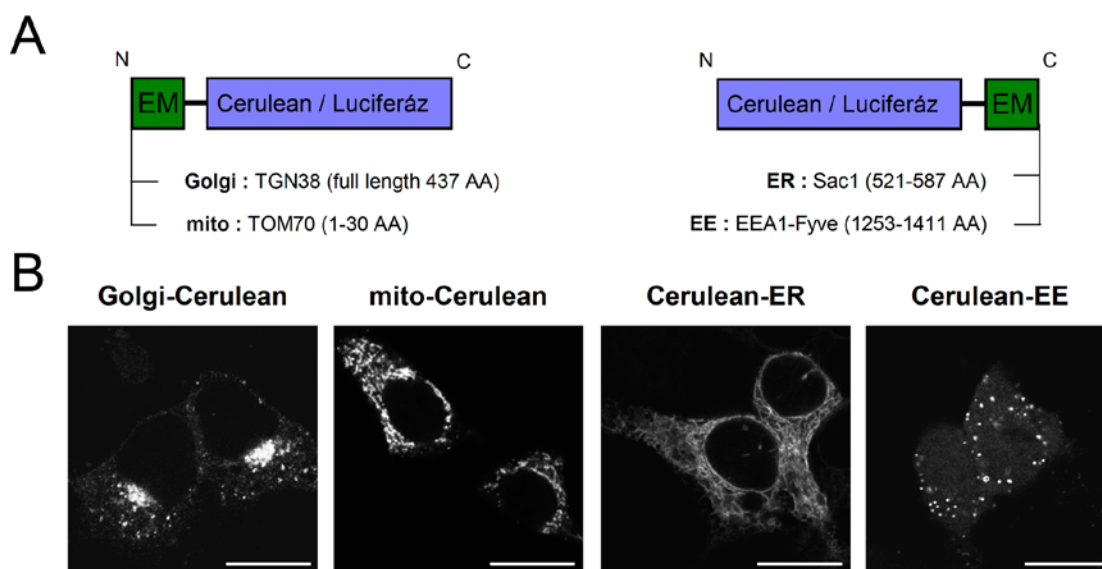
Munkacsoportunk korábban kifejlesztett egy olyan biolumineszcencia rezonancia energiáttranszfer (BRET) alapú módszert, mellyel sikeresen követhető volt egy luciferáz enzimmel jelölt receptor sorsa és útvonala az ingerlése és az azt követő internalizálódása után a Venus fluoreszcens fehérjével jelölt endomembrán-rendszereken keresztül (75,171). Munkám során a korábban kidolgozott rendszerhez képest a legfontosabb módosítás az volt, hogy az endomembrán rendszereket jelöltem luciferáz enzimmel, míg a PM-hoz irányított fehérjéket, melyek mozgását vizsgálni akartam, Venus fluoreszcens fehérjéhez kapcsoltam (**9. ábra**). Erre azért volt szükség, mert az előzetes kísérletek szerint az endomembrán rendszerekhez irányított fehérjéink sejten belüli elhelyezkedése specifikusabb volt, mint a PM-hoz irányított konstrukcióké. Ez azért fontos, mert a BRET mérések során a jel nagyságát az interakcióban szereplő donormolekulák száma szabja meg, így a mérések során nagyobb jel-zaj aránnyal számolhattunk.



**9. ábra – A PM-hoz irányított Venus konstrukciók követésükre kidolgozott módszer vázlatos bemutatása** A PM-t elhagyó fehérjék mozgásának nyomon követésére kidolgozott BRET-módszer működésének elve. A kísérletek során az interakció változását a sejt endomembrán rendszereit jelölő luciferáz enzim, és a PM fehérjék irányító-szekvenciával módosított Venus között mértük. (mito: mitokondrium, ER: endoplazmás retikulum, EE: early endosome – korai endoszóma, Luc: luciferáz)

Munkacsoportunk korábbi munkáihoz képest további változás volt, hogy a luciferáz enzim egy újabb, továbbfejlesztett verzióját használtam. Az endomembránokhoz történő irányításhoz, hasonlóan ahhoz, ahogy a PM-hoz történő irányítást végeztem, rezidens

fehérjék irányító-szekvenciáit, illetve teljes hosszúságú fehérjéket használtam fel (**10. A ábra**).



**10. ábra – Az endomembránokhoz irányított luciferáz konstrukciók felépítése és sejteken belüli elhelyezkedése** (A) A BRET kísérletekben használt luciferáz konstrukciók vázlatos felépítése, az endomembránokhoz (EM) történő irányításban használt fehérjék, vagy irányító-szekvenciáik jelölésével. (AA: aminosav) (B) Az endomembránokhoz irányított luciferáz konstrukciók intracelluláris lokalizációjának ellenőrzéséhez a luciferáz enzimet Cerulean fluoreszcens fehérjével helyettesítettük, és megvizsgáltuk a sejten belüli elhelyezkedésüket a konstrukciókat tranzitensen kifejező HEK 293T sejteken. Lépték: 20  $\mu\text{m}$ . (mito: mitokondrium, ER: endoplazmás retikulum, EE: early endosome – korai endoszóma)

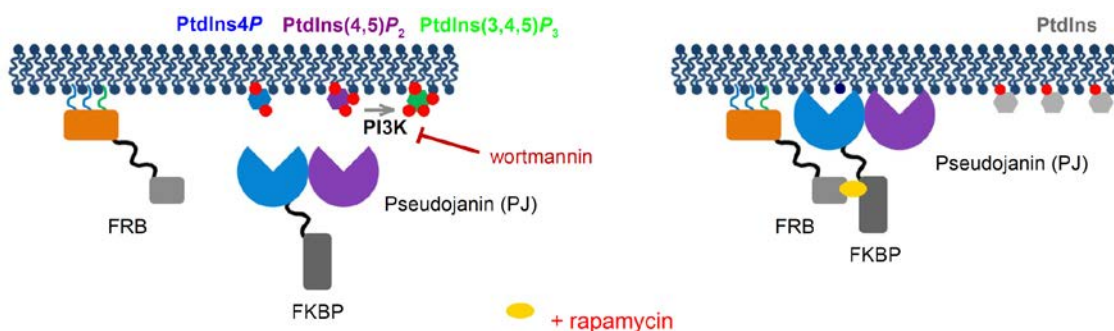
A Golgihoz való irányításban a TGN38 fehérjének a teljes szakaszát, a mitokondriumok esetén a TOM70 fehérje irányító-szekvenciáját (N-terminális első 30 aminosav), az endoplazmás retikulumnál (ER) a Sac1 fehérje C-terminális (527-587 aminosav) darabját, míg akorai endoszómákhoz történő irányításhoz az EEA1 fehérje C-terminális irányító-szekvenciáját (1253-1411 aminosav, ami a FYVE-doménnek felel meg) használtam (**10. A ábra**). A fehérjék megfelelő lokalizációjának megállapításához elkészítettem a fúziós fehérjék Cerulean fluoreszcens fehérjével jelölt változatait is, és konfokális mikroszkóp segítségével ellenőriztem sejten belüli elhelyezkedésüket (**10. B ábra**).

## 5.2 A PM PPIs tartalmának akut manipulálása

A bevezetésben bemutattam, hogy a PM-ban a foszfoinozitidek két formája található meg nagy mennyiségben: a PtdIns4P és a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. Ezek mellett kis mennyiségben megtalálható még a fontos jelátviteli szereppel bíró háromszorosan foszforilált forma, a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>.

A PM PPI<sub>ns</sub> tartalmának akut csökkentéséhez két módszert alkalmaztam. Egyfelől, a munkacsoportunk által széleskörűen használt és bemutatott rapamycin-függő heterodimerizációs rendszert (172), másrészt, alacsony (100 nM) koncentrációjú wortmannin kezelést használtam, amely hatásos gátlószer a PM PtdIns(3,4,5)*P*<sub>3</sub> szintjének fenntartásáért felelős I-es típusú PtdIns 3-kináznak, ezáltal a PM PtdIns(3,4,5)*P*<sub>3</sub> szintjének izolált csökkentését eredményezi (**11. ábra**). Az utóbbi módszer alkalmazása során bekövetkező PM lipidszint-változásokról nyert adatainkat, és a lipid-depléciós rendszerünk alkalmazása során tapasztalt változások összevetését korábban még nem publikáltuk, ezért indokolt az eredmények jelen fejezetben történő ismertetése a „Módszerek” c. fejezet helyett.

A heterodimerizációs rendszer esetében a legtöbb kísérletben egy 4- és 5-foszfátáz aktivitással egyaránt rendelkező Pseudojanin (PJ) enzimet alkalmaztam, melyet az FKBP (FKBP-PJ) fehérjéhez kapcsoltam (173). A rendszer működéséhez elengedhetetlen másik komponenst, az FRB domént a PM-hoz irányított fehérjéknél már bemutatott Lck fehérje N-terminális irányító-szekvenciáját (Lck<sub>1-10</sub>-FRB) felhasználva a PM-hoz irányítottam. A depléciós rendszer későbbi detektálásának elősegítése érdekében a foszfátáz piros fluoreszcens jelzéssel láttam el (mRFP-FKBP-PJ). A foszfátáz PM-hoz való indukált kihelyeződésétől a PM PtdIns4*P* és a PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> szintek akut csökkenését várjuk, ugyanis az enzimnek mind a kettő említett PPI<sub>ns</sub> szubsztrátja. A hidrolízis után a PM-ban a lebontott molekulák számával megegyező mennyiségű foszfatidil-inozitol (PtdIns) marad vissza (**11. ábra**).

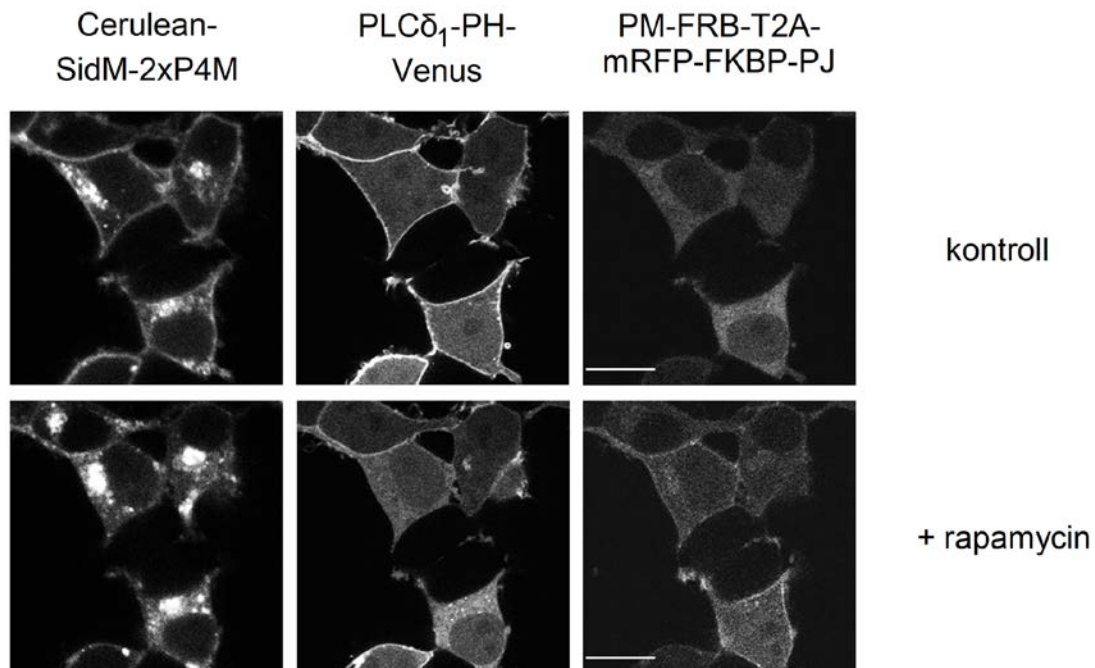


**11. ábra** – A PM PPI<sub>ns</sub> tartalmának akut csökkentésére használt módszerek Rapamycin kezelés hatására a citoplazmatikus FKBP-hez kötött 4- és 5-foszfátáz aktivitással egyaránt rendelkező enzim, a Pseudojanin (PJ) a PM-hoz kötött FRB doménhez horgonyozódik ki. Ennek hatására a PM többszörösen foszforilált PPI<sub>ns</sub> molekuláiból (tehát a PtdIns4*P*-ből, a PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub>-ből és a PtdIns(3,4,5)*P*<sub>3</sub>-ből) egyaránt PtdIns keletkezik. A PI3K inhibitor wortmannin 100 nM-os koncentrációban gátolja a PtdIns(3,4,5)*P*<sub>3</sub> molekulák keletkezését a PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub>-ből

Az alkalmazott beavatkozások hatását konfokális mikroszkóppal és BRET kísérletekben validáltam specifikus bioszenzorok felhasználásával. A PtdIns4*P* nyomon



követésére a lipidet specifikusan kötő *Legionella pneumophila*-ból származó SidM fehérje P4M doménjének (174) tandem formáját (SidM-2xP4M) használtam. A PtdIns(4,5) $P_2$  detektálását a munkacsoportunk által régóta használt foszfolipáz C  $\delta_1$  fehérje pleckstrin homológia (PH) doménjével (PLC $\delta_1$ -PH) (175) végeztem. A PtdIns(3,4,5) $P_3$  méréséhez a témavezetőm által korábban már bemutatott (176) specifikus Bruton's tyrosine kinase (Btk) fehérje PH doménjét (Btk-PH) használtam. A konfokális méréseknél (**12. ábra**) a PtdIns4P és a PtdIns(4,5) $P_2$  kötésére alkalmas szenzorok fluoreszcensen jelölt formáit (Cerulean-SidM-2xP4M, illetve PLC $\delta_1$ -PH-Venus) használtam a szenzorokat és a lipid-depléciós rendszert tranziensen expresszáló HEK 293T sejtekben.



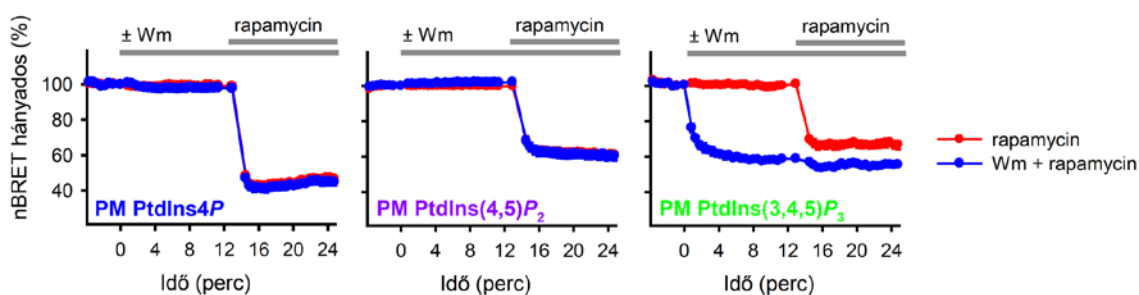
**12. ábra** – A PM PIIns tartalmában bekövetkező változások követése konfokális mikroszkóppal a rapamycin-függő lipid-depléciós rendszer aktiválása után A PM lipid-változásainak követését specifikus lipidkötő doméneket tranziensen kifejező HEK 293T sejtekben végeztem. A sejtek a fluoreszcensen jelölt lipidkötő doméneken kívül tartalmazták a lipid-depléciós rendszer mindkét tagját (PM-FRB és FKBP-PJ) T2A-szekvenciával összekötve, a citoplazmatikus enzim mRFP jelölése mellett (jobbra). A PtdIns4P kimutatására a SidM-2xP4M fehérje Ceruleannal jelölt formáját (balra), a PtdIns(4,5) $P_2$  PM szintjének megítélésére a PLC $\delta_1$ -PH domént Venussal jelölve (középen). Rapamycin (300 nM) adását követően az enzim a PM-hoz horgonyzódik ki, míg a lipidet kötő fehérjék elvesztik PM lokalizációjukat és a sejt intracelluláris részeire helyeződnek át. Az ábrán látható felvételek reprezentatív eredmények. Lépték: 20  $\mu$ m.

Az **12. ábrán** is jól látható, hogy az enzim PM-hoz történő áthelyeződése után a a PtdIns4P és a PtdIns(4,5) $P_2$  detektálására alkalmas bioszenzorok PM-lokalizációja csökken, mutatva a kompartment lipid-szintjének fogyását. Fontos azonban megjegyezni, hogy a PtdIns4P-t kötő fehérje a PM-ról a Golginak megfelelő sejtorganellumra és vezikulákra helyeződik át a citoplazma helyett, ami a jelnövekedést mutató sejtalkotók

PtdIns4P tartalmát mutatja. Ez a jelenség azonban nem a membránok emelkedő PtdIns4P tartalma, hanem a szenzor újra rendeződése miatt következik be (177).

A PtdIns(3,4,5) $P_3$  követését konfokális mikroszkóppal ugyancsak elvégeztem, azonban nem mutatom be, mert a lipidet kötő konstrukció (Btk-PH) nyugalomban lévő sejteknél döntően a citoplazmában foglal helyet és a PM frakciója ennek megfelelően nem, vagy nagyon nehezen detektálható (90). Ennek oka, hogy a PtdIns(3,4,5) $P_3$  molekula PM szintje elenyésző a másik kettő lipidhez képest.

A konfokális mikroszkóppal történő vizsgálat után a lipidek szintjének csökkentésére alkalmas módszereink működését BRET technikán alapuló specifikus bioszenzorok (90) használatával is elvégeztem, melyek segítségével a PM lipid szintjeinek szemikvantitatív meghatározása is lehetséges. A szenzorokban a már részletezett lipidkötő domének szerepeltek luciferáz enzimhez kapcsolva, illetve a monomer Venus fehérje, -amit az Lck fehérje irányító-szekvenciájával (Lck<sub>1-10</sub>-Venus) a PM-hoz irányítottunk. Ezzel a molekulapárral specifikusan mérni tudjuk a kérdéses lipid PM szintjét BRET technikával (13. ábra).



**13. ábra – A rapamycin-függő lipid-depléciós rendszer működése során, illetve wortmannin kezelés hatására bekövetkező PM PPIns változások követése BRET-módszerrel** A PM PPIns tartalmának követésére az általunk korábban bemutatott (90) specifikus lipidkötő doméneket tartalmazó BRET-szenzorokkal (Lck<sub>1-10</sub>-Venus-T2A-Luc-SidM-2xP4M a PtdIns4P; Lck<sub>1-10</sub>-Venus-T2A-PLCδ1-PH-Luc a PtdIns(4,5) $P_2$  és Lck<sub>1-10</sub>-Venus-T2A-Btk-PH-Luc a PtdIns(3,4,5) $P_3$  méréséhez) végeztem transziensen transzfektált HEK 293T sejteken, melyek ugyancsak tartalmazták a lipid-depléciós rendszerünk mindkét tagját. A sejteket 100 nM wortmanninnal, vagy kontrollként DMSO-val, majd később 300 nM rapamycinnel kezeltem. A BRET hányadosok normalizálásának menetét (nBRET hányados) a módszerek című fejezetben tárgyalom. A görbék három független kísérlet átlagát és a hozzájuk tartozó standard hibát (S.E.M.) szemléltetik.

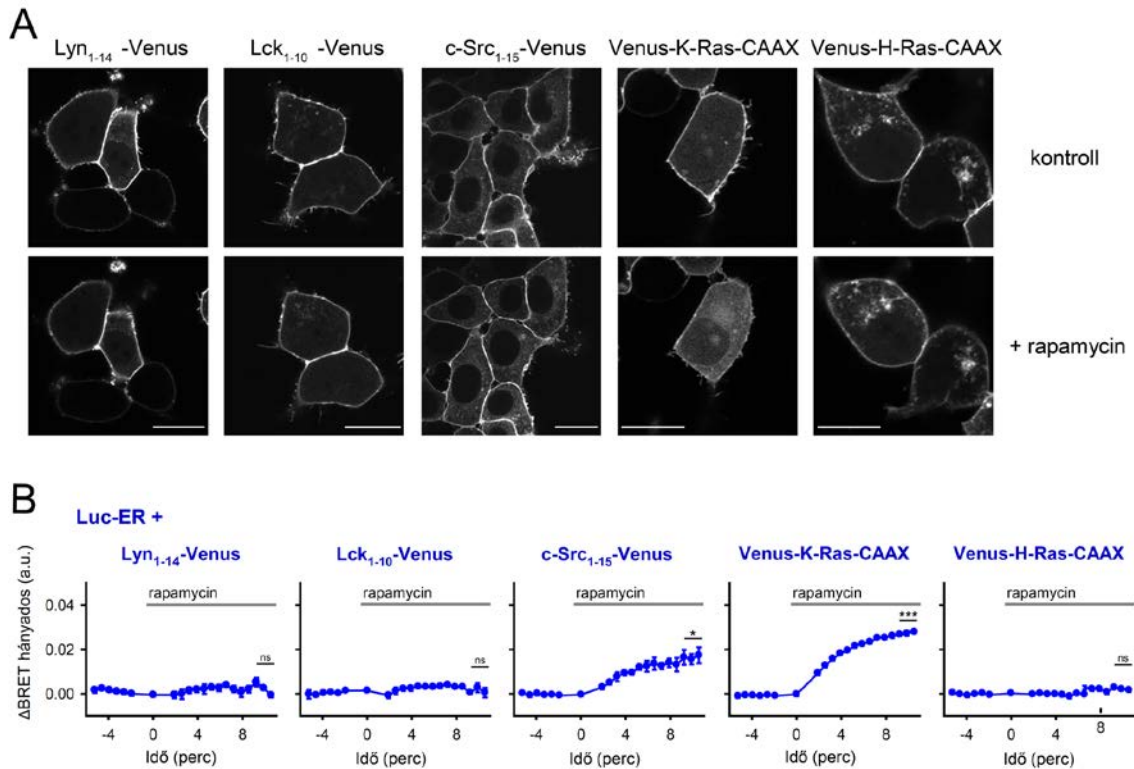
A kísérletek során 300 nM rapamycint követően a PJ enzim PM-hoz helyeződik át a citoplazmából a konfokális mikroszkópos kísérletekhez hasonlóan és megtörténik a PtdIns4P és a PtdIns(4,5) $P_2$  molekulák inozitolgyűrűinek 4-es és 5-ös pozíciójában található foszfátcsoportok eltávolítása. A szenzorok nagyfokú csökkenést jeleznek mind a három lipid esetében, ami a PtdIns4P és a PtdIns(4,5) $P_2$  esetében megfelel a várható változásoknak, azonban a PtdIns(3,4,5) $P_3$  esetében magyarázatra szorul. Irodalmi adatok

alapján ismert (54), hogy a  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$  a kísérletekben használt PJ enzim egyik tagjának, az 5-foszfataz aktivitással rendelkező INPP5E enzimnek szubsztrátja, így direkt katalízis ebben az esetben is előfordulhat. Sokkal valószínűbb azonban, hogy a lipid PM szintjének csökkenésében a  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$  előanyagának, a  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -nek a fogyása a döntő tényező. Ez az elmélet a  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  és a  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$  rendkívül gyors, és nyugalomban is folyamatosan, nagy aktivitással végbemenő egymásba alakulását feltételezi. Ezt a PM lipidek szintjének csökkentésére irányuló, általam használt másik módszer alkalmazása során kapott eredmények is alátámasztják, ugyanis a PI3K 100 nM wortmanninnal történő gátlásakor, amely ezt az átalakulást katalizálja, ugyancsak egy rendkívül gyors, továbbá nagyobb fokú csökkenés tapasztalható a PM  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$  szintjében (**13. ábra**). A két lipidszint csökkentő technika egyidejű alkalmazása esetén a PM  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$  szintjében további fogyás tapasztalható, melynek hátterében a nem tökéletes  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  eltávolítás állhat. Fontos megjegyezni, hogy a másik két lipid esetében a wortmannin kezelés a vártaknak megfelelően hatástalannak bizonyult (**13. ábra**).

### 5.3 A PM foszfoinozítid-depléciója után bekövetkező változások a perifériás PM fehérjék intracelluláris elhelyezkedésében

Hammond és munkatársai egy korábbi munkában számos perifériás PM fehérje lokalizációjának változását megvizsgálták a PM foszfoinozítid-deplécióját követően (173). Kísérleteikben a PM foszfoinozítid szintjeinek csökkentésére az általunk is használt 4- és 5-foszfataz aktivitással egyaránt rendelkező Pseudojanin (PJ) enzimet alkalmazták, és azt tapasztalták, hogy azok a fehérjék, melyek pozitívan töltött aminosavakat tartalmaznak az irányító-szekvenciájukban a kezelés hatására elhagyják a PM-t. Kísérleteiket konfokális mikroszkóppal végezték. Ezt az eredményt figyelembe véve, első lépésként mi is konfokális mikroszkóppal követtük az általunk kiválasztott, eltérő poszttranszlációs módosításokkal ellátott irányító-szekvenciák viselkedését a PM együttes  $\text{PtdIns}4P$ ,  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  és  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$  deplécióját követően, melyet a már részletezett rapamycin függő lipid-depléciós rendszer aktiválásával hoztunk létre. A **14.A ábrán** a kísérletek eredménye látható, melyek alapján elmondhatjuk, hogy a Venus-K-Ras-CAAX és a c-Src<sub>1-15</sub>-Venus konstrukciók esetében a fehérjék PM lokalizációja kismértékben csökkent, azonban ennél szembetűnőbb, hogy az endomembrán

rendszereken való megjelenésük fokozódott. A többi általunk használt konstrukciónál nem észleltünk hasonló változásokat. Mindkét fúziós fehérje esetében a PM-hoz való kötődést az irányító-szekvenciákban található egyszeres lipidmódosítás mellett a pozitívan töltött aminosavak jelenléte biztosítja (**7. B ábra**), tehát kísérleteinkben az irodalomból ismert változásokkal megegyező eredményt kaptunk.



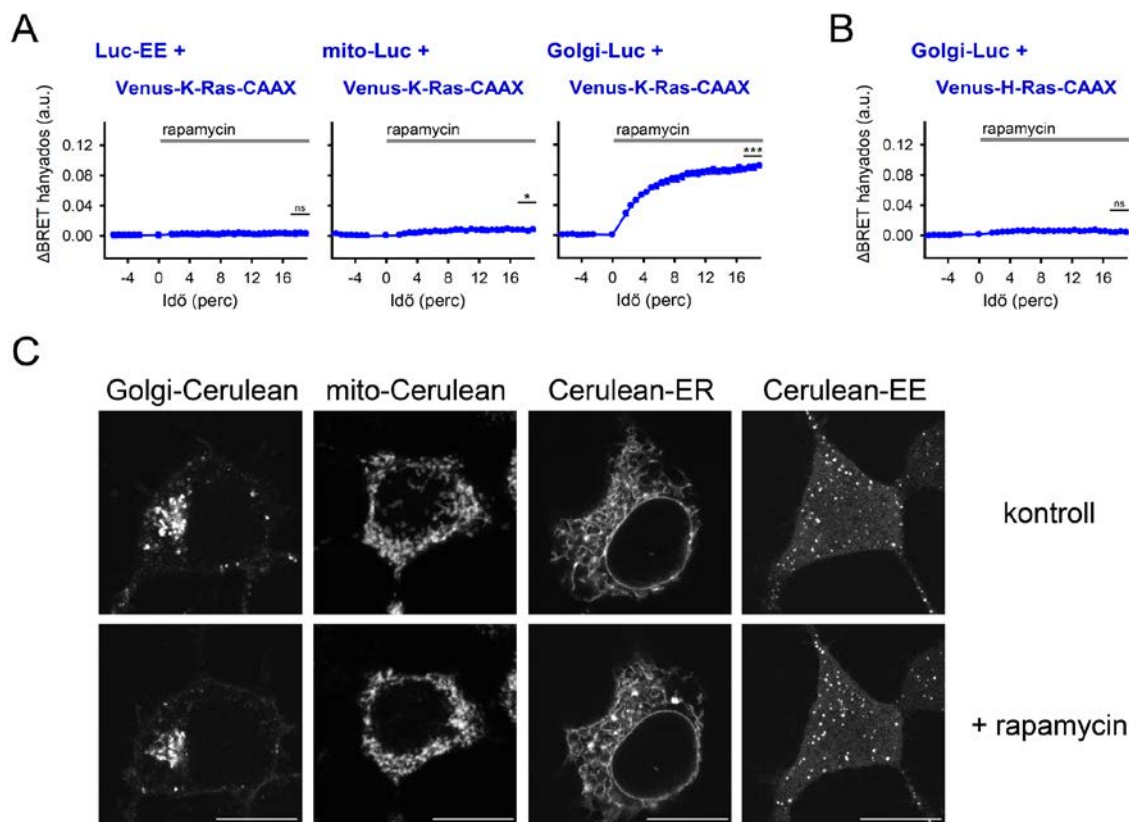
**14. ábra – A PM PPIs depléciójának hatása a PM-hoz irányított Venus fehérjék sejten belüli elhelyezkedésére**  
**I. (A)** Az eltérő irányító-szekvenciákkal módosított Venus fehérjék intracelluláris mozgásának követése a PM PPIs depléciója után. A konfokális mikroszkópos felvételek a különböző Venus konstrukciókat és a lipid-depléciós rendszerünk mindkét tagját (PM-FRB és FKBP-PJ T2A-szekvenciával összekötve) tranziensen kifejező HEK293T sejtekről készült reprezentatív eredményeket mutatnak. A képek a sejtek nyugalmi állapotában, illetve 300 nM rapamycin adását követően 5 perccel készültek. Lépték: 20  $\mu$ m. **(B)** Az eltérő irányító-szekvenciákat tartalmazó Venus fehérjék mozgásának követése BRET módszerrel. A kísérletekben használt HEK293T sejtek tranziensen expresszálták az ER-hoz irányított luciferáz enzimet (Luc-ER), a jelölt Venus konstrukciókat, illetve a depléciós rendszerünk mindkét tagját (PM-FRB és FKBP-PJ). A  $\Delta$ BRET hányados értékek a 300 nM rapamycinnel kezelt sejtek és a DMSO-val kezelt kontroll sejtek adatainak különbségét prezentálják. A görbék három független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatja. A statisztikai vizsgálat elvégzéséhez párosított t-tesztet végeztünk az ingerlés előtti és utáni utolsó három pont átlagértékének összehasonlításával. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns, nem-signifikáns

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a mikroszkópos kísérleteknél látott fehérje-átrendeződés mennyire követhető az általunk alkalmazott BRET-technikával, továbbá arra, hogy amennyiben a fehérjék mozgása kimutatható, akkor tapasztalható-e bármilyen mértékű elfogultság az intracelluláris tér egyes organellumainak membránrendszerei felé. Először az ER-hoz irányított luciferáz (Luc-ER) enzimet használtuk a kísérleteinkben azt feltételezve, hogy az ER nagy felülete miatt a PM-t

elhagyó fehérjék és a luciferáz között molekuláris interakció jön létre, amit a BRET mérések során detektálhatunk.

A **14.B ábrán** a kísérletek eredménye látható, melyek megegyeztek a konfokális mikroszkópos kísérletekben tapasztaltakkal, ugyanis csak a Venus-K-Ras-CAAX és a c-Src<sub>1-15</sub>-Venus konstrukciók esetében kaptunk a fehérjék mozgására utaló szignifikáns jelnövekedést. Ezek után a további vizsgálatokhoz a Venus-K-Ras-CAAX konstrukciót választottuk ki, amely több szempontból is megfelelő választásnak tűnt. Egyrészt, a K-Ras fehérje irányító-szekvenciája (K-Ras-CAAX) a membrán és fehérje között kialakuló elektrosztatikus interakciók kutatásában egy fontos modell, így számos irodalmi adat áll rendelkezésre a témában, másrészt a H-Ras fehérje irányító-szekvenciájának köszönhetően (H-Ras-CAAX) rendelkezünk egy olyan konstrukcióval is a kísérletek során, amely sejten belüli átrendeződést nem mutatott, azonban a fehérjeszakasz mérete, az alkalmazott összekötő fehérjeszakaszok és a teljes hosszúságú fehérjék funkciójának tekintetében is azonos vagy nagymértékben hasonló tulajdonságokkal bír. Nem elhanyagolható módon a tumorbiológiában rendkívül hangsúlyos K- és H-Ras fehérjék lokalizációjában bekövetkező gyors változások izgalmas kutatási területnek ígérkeztek.

A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy az ER-on kívül a Venus-K-Ras-CAAX fehérje melyik endomembránon jelenik meg a PM-től való eltávolodása után. A kérdés megválaszolásához BRET-méréseket végeztünk, ahol az ER-hoz irányított luciferáz enzimet a Golgihoz (Golgi-Luc), a mitokondriumhoz (Mito-Luc), illetve a korai endoszómákhoz (Luc-EE) irányított luciferáz konstrukciókkal helyettesítettük. Az eredmények alapján elmondható, hogy a Venus-K-Ras-CAAX fehérje PM-től való eltávolodása után nagymértékű, szignifikáns BRET-jel emelkedés jön létre a Golgihoz irányított luciferáz esetén, míg a korai endoszómákra irányított enzim esetén nem kaptunk szignifikáns változást. A Mito-Luc konstrukció használata esetén szignifikáns, azonban a Golginál látottakhoz képest messze elmaradó jelnövekedést tapasztaltunk. A Venus-H-Ras-CAAX fehérje esetében nem sikerült interakció-növekedést kimutatni a Golgihoz irányított enzim használatakor (**15.A és B ábrák**).



**15. ábra - A PM PPIs depléciójának hatása a PM-hoz irányított Venus fehérjék sejten belüli elhelyezkedésére II.** (A) A Venus-K-Ras-CAAX fehérje mozgásának nyomon követése a korai endoszómák, a mitokondriumok, illetve a Golgi organelum membránjához irányított luciferáz konstrukciók segítségével, BRET mérésekben a PM PPIs depléciója után. (B) A Venus-H-Ras-CAAX fehérje interakciójának vizsgálata a Golgival, Golgihoz irányított luciferáz enzim felhasználásával. (A-B) A kísérletek során a jelölt konstrukciókat és a lipid-depléciós rendszerünk mindkét tagját tranziensen expresszáló HEK 293T sejteket használtunk. A  $\Delta$ BRET hányados értékek a 300 nM rapamycinnel kezelt sejtek és a DMSO-val kezelt kontroll sejtek adatainak különbségét prezentálják. A görbék három független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatja. A statisztikai vizsgálat elvégzéséhez párosított t-tesztet végeztünk az ingerlés előtti és utáni utolsó három pont átlagának összehasonlításával. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns, nem-signifikáns. (C) Az endomembrán rendszerekhez irányított luciferáz konstrukciók sejten belüli mozgásának ellenőrzése a PM PPIs depléciója után. A kísérletekben használt HEK 293 T sejtek tartalmazták a lipid-depléciós rendszerünk mindkét tagját (PM-FRB és FKBP-PJ, T2A-szekvenciával összekötve), illetve az endomembránokhoz irányított Cerulean konstrukciókat. A képek reprezentatív felvételek, melyek az ingerlés előtti kontroll periódusban és az ingerlést követően 5 perccel készültek. Lépték: 20  $\mu$ m.

Ahhoz, hogy a PM-hoz irányított Venus fehérjék és az endomembránokhoz irányított luciferáz enzimek közötti interakció mérések során a tapasztalt BRET-hányados emelkedéseket a Venus fehérjék fokozott mozgásának következményeként értékeljük elengedhetetlen feltétel, hogy a PM lipid-deplécióját követően a mérésekben használt luciferáz konstrukciók nem változtatják a sejten belüli elhelyezkedésüket. Ennek vizsgálatához konfokális mikroszkóppal követtük az endomembránokhoz irányított fehérjék intracelluláris eloszlását a PM lipid-depléciója során, melyhez a konstrukciókban a luciferáz enzimet Cerulean fluoreszcens fehérjére cseréltük. A

kísérletek során egyik vizsgált molekulánál sem tapasztaltunk lényegi változást a depléciós rendszer rapamycinnel történő aktiválását követően (15. C ábra).

#### **5.4 A Venus-K-Ras-CAAX fehérje útvonalának vizsgálata a PM-ről a Golgi membránjára történő áthelyeződés során**

Az eddigiekben bemutattam, hogy a K-Ras fehérje PM kötésében két folyamatnak tulajdonítunk kulcsfontosságú szerepet, melyek mindegyike a molekula irányító-szekvenciájához kötött. Ezen a szakaszon belül történik meg az a poszttranszlációs lipidmódosítás, amely a fehérje lipofil jellegének erősítésén keresztül biztosítja a fehérje közvetlen membránkötését, illetve itt találhatóak azok a pozitívan töltött aminosavak is, melyek a fehérje PM kötését stabilizálják a negatívan töltött foszfolipidek és a fehérjelánc között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatások létrejötte által. Az eddig bemutatásra került kísérleteinkben azt kaptuk, hogy a K-Ras irányító-szekvenciájával módosított Venus fehérje a PM-ről a Golgi membránjára helyeződik át, ha a PM és a molekula közötti elektrosztatikus kölcsönhatások mértékét csökkentjük a PM foszfoinozitud-depléciója által. Jogosan vetődik fel tehát a kérdés, hogy ezen útvonal során az irányító-szekvencia miatt lipofil tulajdonságokkal rendelkező fúziós fehérje milyen módon jut keresztül a hidrofil természetű citoplazmán. Az egyik lehetőség, hogy a fehérje egy citoplazmatikus állapot után kerül a Golgi organelum membránjára, míg a másik, hogy a lipofil természetű fehérje mindvégig membránhoz kötött állapotban marad, és vezikulák közvetítésével, vagy az organelumok között kialakuló kontaktpontokat felhasználva „utazik” a PM-ről az endomembrán rendszerek irányába.

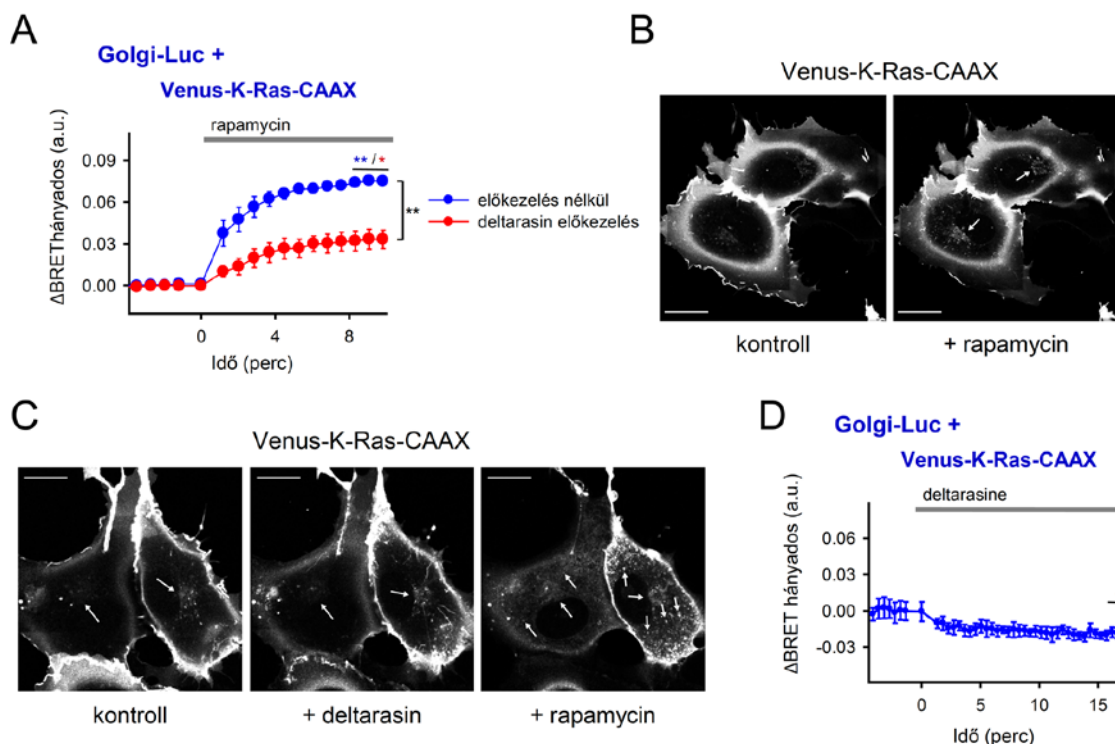
Az irodalomban található korábbi munkák során ismert volt, hogy a lipofil természetű K-Ras fehérje a vele rokon H-Ras fehérjével ellentétben a szintézise és poszttranszlációs módosulása után nem a klasszikus vezikuláris útvonalat használva éri el a PM-t, hanem úgynevezett „szolubilizáló faktorok” segítik az útját a hidrofil citoplazmán keresztül. Az irodalomban két fehérjének, a Galectin-3-nak (115) és a foszfodiesteráz  $\delta$ -nak (PDE $\delta$ ) (164) tulajdonítanak szerepet a K-Ras intracelluláris útvonala során, melyek megakadályozzák a fehérje véletlenszerűen bekövetkező endomembránokhoz kötődését. A Galectin-3 és PDE $\delta$  fehérjék struktúraanalízise során arra a megállapításra jutottak, hogy a fehérjeláncok egy olyan kúp szerű struktúrát hoznak

létre, melyek képesek a lipofil prenil-csoport megkötésére, és mintegy elrejtik a citoplazma hidrophil környezetét elől, ezzel biztosítva a fehérje szolubilizálását (119,178,179).

Annak vizsgálatához, hogy a méréseink során a K-Ras fehérje is ezt az útvonalat követi-e, az irodalomból ismert deltarasin vegyülettel kezelt sejteken is megismételtük azokat a kísérleteket, melyekben a Venus-K-Ras-CAAX fehérje Golgi membránjára történő áthelyeződését tapasztaltuk. A deltarasin egy olyan molekula, amely felépítését tekintve nagyon hasonlít ahhoz a prenil-csoporthoz, amely a K-Ras fehérje poszttranszlációs módosításaként is szerepet játszik. Ennek megfelelően kompetitíven gátolja a K-Ras fehérjék kötődését a szolubilizáló faktorokhoz, így gátolva a fehérjék sejten belüli transzportját (119). Kísérleteink során a sejteket 10 percig, 10  $\mu$ M deltarasin-nal kezeltük elő majd aktiváltuk a PM lipid-depléciós rendszerünket 300 nM rapamycin hozzáadásával (**16. A ábra**).

A BRET-hányadosunkban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a kontroll körülményekhez képest, azonban a Venus-K-Ras-CAAX és a Golgihoz irányított luciferáz közötti interakció nem szűnt meg teljesen, aminek hátterében a tökéletes gátlás elmaradása feltételezhető. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy ilyen esetekben mi történik azokkal a molekulákkal melyek nem érkeznek meg a Golgi membránjára a PM lipidszint-csökkentése után, ezért konfokális mikroszkóppal is követtük a Venus-K-Ras-CAAX fehérje mozgását deltarasin, illetve az azt követő rapamycin kezelés hatására tranziensen transzfektált COS-7 sejtekben. A kontroll kísérlettel összehasonlítva elmondhatjuk, hogy a deltarasin kezelésnek önmagában nem volt jelentős hatása a Venus-K-Ras-CAAX fehérje lokalizációjára, azonban a lipid-depléció után a fehérje Golgira való áthelyeződése egyértelműen kisebb mértékű volt, mint a kontroll kísérletekben, és a fehérje intracelluláris vezikulákon is megjelent (**16. B és C ábrák**). Fontos megjegyezni, hogy a deltarasin önmagában is képes volt kismértékű csökkenést előidézni a Venus-K-Ras-CAAX és a Golgi-hoz irányított luciferáz konstrukció között mérhető interakcióban, ami arra utal, hogy a fehérje PM és Golgi közötti körforgása nyugalomban is egy dinamikus folyamat (**16. D ábra**).

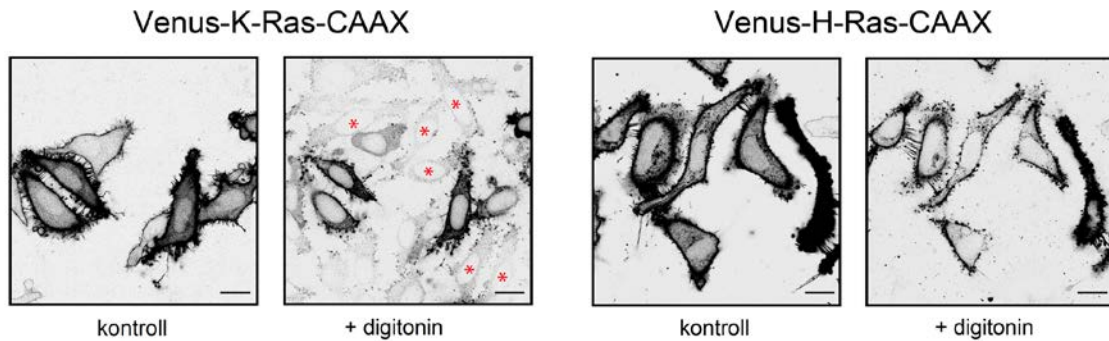




**16. ábra – A Venus-K-Ras-CAAX fehérje útvonalának vizsgálata a PM PPIns deplécióját követően a PM-ről a sejtek endomembrán rendszereire (A)** A Venus-K-Ras-CAAX fehérje interakciójának vizsgálata a Golgi felszínére irányított luciferáz enzimmel BRET kísérletekben, a konstrukciókat, illetve a PM lipid-depléciós rendszerét tartalmazó HEK 293T sejtekben. A fehérje útvonalának vizsgálatához, a Ras fehérjék intracelluláris transzportjában szereplő PDE  $\delta$  fehérjéket kompetitíven gátoltuk. Ehhez 10 perig 10  $\mu$ M deltarasinnal kezeltük elő a sejteket. A BRET hányados értékek a 300 nM rapamycinnel kezelt sejtek és a DMSO-val kezelt kontroll sejtek adatainak különbségét prezentálják. A görbék három független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatja. A statisztikai vizsgálat elvégzéséhez az egyedi görbéknél párosított t-tesztet végeztünk az ingerlés előtti és utáni utolsó három pont átlagának összehasonlításával (a csillagok színe az egyes görbékre utal). A két görbe összehasonlításához t-próbát használtunk, ahol a statisztikai próbákban az utolsó három pont átlagát használtuk fel. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (B) A Venus-K-Ras-CAAX fehérje intracelluláris elhelyezkedésében bekövetkező változások a PM PPIns deplécióját követően. A kísérletben használt COS-7 sejtek transziensen expresszálták a Venus-K-Ras-CAAX fehérjét és a lipid-depléciós rendszerünk mindkét tagját (PM-FRB és FKBP-PJ, T2A-szekvenciával összekötve). A képek rapamycin (300 nM) adása előtt, illetve azután 5 perccel készültek. A nyilak a Golgi területére mutatnak. Lépték: 20  $\mu$ m. (C) A Venus-K-Ras-CAAX fehérje intracelluláris elhelyezkedésében bekövetkező változások deltarasin kezelés hatására, majd a PM PPIns deplécióját követően. A kísérletben használt COS-7 sejtek transziensen expresszálták a Venus-K-Ras-CAAX fehérjét és a lipid-depléciós rendszerünk mindkét tagját (PM-FRB és FKBP-PJ, T2A-szekvenciával összekötve). A képek a Venus-K-Ras-CAAX fehérje elhelyezkedését mutatják a kiindulási helyzetben, 5 perccel 10  $\mu$ M deltarasin, illetve további 5 perccel rapamycin (300 nM) adása után. A nyilak a Golgi területére, és vezikulákra mutatnak. Lépték: 20  $\mu$ m. (D) Deltarasin hatásának kimutatása a Venus-K-Ras-CAAX fehérje Golgi lokalizációjára nyugvó sejteken. A kísérletekben használt HEK 293T sejtek transziensen expresszálták a Venus-K-Ras-CAAX fehérjét, a Golgi-hoz irányított luciferázt (Golgi-Luc) és a lipid-depléciós rendszerünk tagjait. A  $\Delta$ BRET hányados értékek a 300 nM rapamycinnel kezelt sejtek és a DMSO-val kezelt kontroll sejtek adatainak különbségét prezentálják. A görbék három független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatja. A statisztikai vizsgálat elvégzéséhez párosított t-tesztet végeztünk az ingerlés előtti és utáni utolsó három pont átlagának összehasonlításával. \*  $p < 0.05$

A Venus-K-Ras-CAAX fehérje citoplazmatikus frakciójának létét egy nagyon egyszerű kísérlettel próbáltuk megerősíteni. HeLa sejtekben transziensen transzfektáltuk a Venus-K-Ras-CAAX, illetve a H-Ras-CAAX konstrukciókat, majd a sejtek permeabilizálása után követtük a fehérjék mozgását. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a K-Ras fehérje irányító-szekvenciájával módosított Venus fehérje elhagyta az

expressziót mutató sejteket, sőt, a konstrukciót előzetesen nem tartalmazó sejtekben is megjelent (**17. ábra**). A Venus-H-Ras-CAAX fehérje esetében ilyen változásokat nem tapasztaltunk. Eredményeinket összegezve elmondhatjuk, hogy a Venus-K-Ras-CAAX fehérje citoplazmatikus frakcióját sikerült kimutatnunk, illetve megállapítottuk, hogy a PM lipid-depléciója követően a PM-t elhagyó fehérjék a „szolubilizációs faktorok” közvetítésével érik el a Golgi organelum membránját.

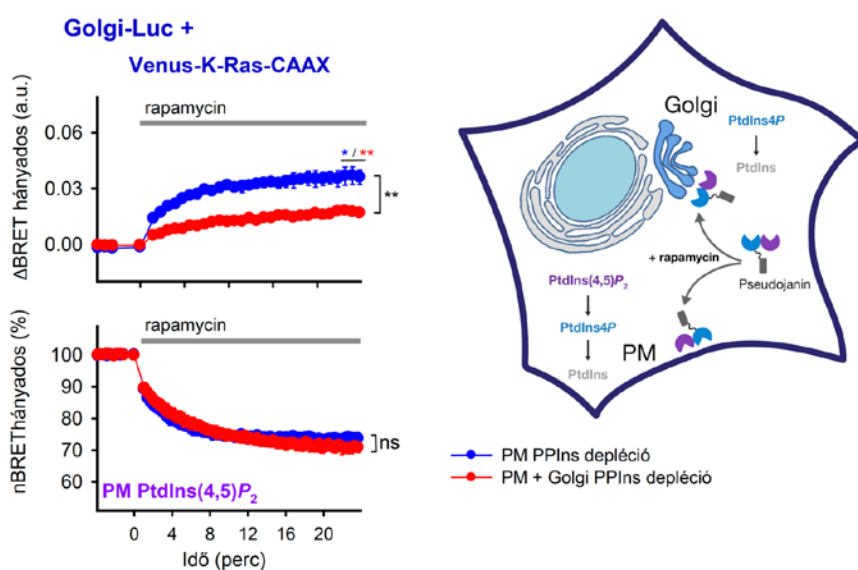


**17. ábra – A Venus-K-Ras-CAAX és Venus-H-Ras-CAAX fehérjék mozgásának és citoplazmatikus frakciójának vizsgálata digitoninnal permeabilizált HeLa sejteken** A kísérletekben a fehérjéket transziensen kifejező HeLa sejteket használtunk, melyeket intracelluláris médiumban tartottunk a kísérletek idején. A permeabilizáláshoz 25 µg/ml digitonint használtunk. A felvételek a permeabilizálás előtt, illetve 5 perccel utána készültek. A piros csillagok olyan sejteket jelölnek, melyek a Venus-K-Ras-CAAX konstrukciót nem tartalmazták a permeabilizálást megelőzően. Lépték: 20 µm.

## 5.5 A Golgi PtdIns4P tartalmának szerepe a Venus-K-Ras-CAAX fehérje lokalizációjának szabályozásában

A Venus-K-Ras-CAAX fehérje sejtben belüli útvonalának tisztázása után arra kerestük a választ, hogy a PM lipid-depléciója követően a fehérje Golgin történő felhalmozódásában szerepet játszik-e az organelum membránjának PtdIns4P tartalma. Ennek vizsgálatához a kísérleteinkben szereplő lipid-depléciós rendszerünket módosítottuk, és az eredetileg PM-hoz irányított FRB domének (Lck<sub>1-10</sub>-FRB-mRFP) mellett Golgihoz irányított formájukat (TGN38-FRB-mRFP) is expresszáltattuk a sejtekben. Ennek eredményeként a mérések során rapamycin adását követően egyszerre irányíthattuk mindkét helyre a citoplazmatikus foszfatáz enzimünket (mRFP-FKBP-PJ). Kontrollként olyan sejteket használtunk, melyek a PM lipid-depléciós rendszerünk két tagján kívül csak egy Golgihoz irányított fluoreszcens fehérjét tartalmazott az FRB domén nélkül (TGN38-mRFP), így rapamycin kezelés hatására csak a PM-on történt meg a lipidek eltávolítása, azonban a sejtekben expresszált fehérjék mennyisége jobban

közéltett egymáshoz. Az együttes lipid-depléció hatására szignifikánsan csökkent a Golgi membránjára áthelyeződő Venus-K-Ras-CAAX mennyisége, amit a két fehérje között detektálható energiatranszfer csökkenése jelez a kontroll esethez képest. A kísérleti elrendezésből adódóan előfordulhat, hogy a PM-on bekövetkező lipid-depléció csökken, amikor a foszfatázt párhuzamosan a Golgihoz is irányítjuk, mivel ilyenkor kompetíció alakul ki az enzim kapcsolódási pontjai között. Ennek ellenőrzésére mind a két módon létrehozott lipid-depléció esetében párhuzamos kísérletekben regisztráltuk a PM PtdIns(4,5) $P_2$  tartalmát Venus fluoreszcens fehérjével és luciferázzal jelölt PtdIns(4,5) $P_2$ -t kötő PLC $\delta$ 1-PH domének közötti BRET mérések segítségével. A mérések során nem találtunk szignifikáns eltérést a lipidszintek változásában, tehát megállapíthatjuk, hogy az együttes depléció során tapasztalt kisebb mértékű Venus-K-Ras-CAAX áthelyeződés a Golgi PtdIns4 $P$  tartalmának csökkenése miatt következett be. (18. ábra)



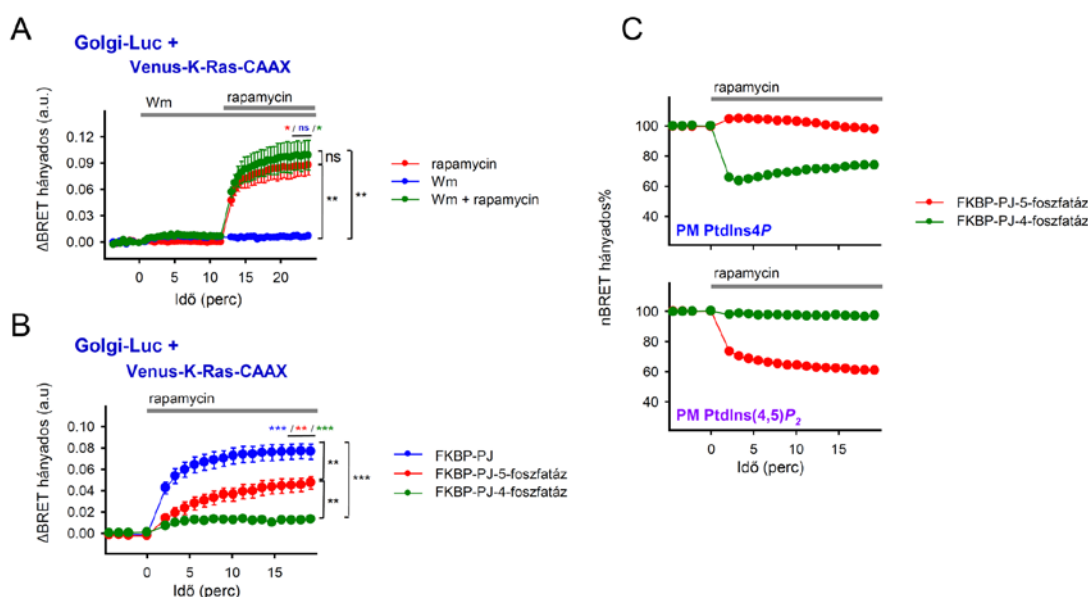
**18. ábra - A Venus-K-Ras-CAAX fehérje Golgira történő áthelyeződésének vizsgálata a PM és Golgi membránjának párhuzamos PI3K deplécióját követően** A felső ábrán a Venus-K-Ras-CAAX fehérje és a Golgihoz irányított luciferáz közötti interakció mérését mutatom be BRET módszerrel. A kísérletekben használt HEK293T sejtek tranziensen expresszálták a BRET méréshez szükséges jelölt konstrukciókat, illetve a lipid-depléciós rendszerünk módosított formájának tagjait. A módosított rendszerünkben a PM-hoz irányított FRB doménon kívül a sejtek tartalmaztak egy Golgi membránjához irányított FRB domént is (TGN38-FRB-mRFP), ami lehetőséget teremt az enzim Golgihoz történő kihelyeződésére rapamycin adását követően. A kontroll sejteknél egy olyan konstrukciót használtunk, amelyik nem tartalmazta az FRB domént (TGN38-mRFP), így ebben az esetben nem kell számítani az enzim kihelyeződésére a Golgi membránjához. A jobb oldali ábrán a kísérletek sematikus ábrázolása látható. Az alsó paneleken a fehérje mozgásának vizsgálatával párhuzamosan végzett kísérletek eredményei láthatóak, ahol a módosított depléciós rendszerünket tartalmazó és a kontrollként használt sejtekben hasonlítottuk össze a PM PtdIns(4,5) $P_2$  mennyiségében bekövetkező változásokat Venus és luciferáz enzimet tartalmazó, a lipidet specifikusan kötő PLC $\delta$ 1-PH domének közötti BRET mérések felhasználásával. A  $\Delta$ BRET hányados értékek a 300 nM rapamycinnel kezelt sejtek és a DMSO-val kezelt kontroll sejtek adatainak különbségét prezentálják. A nBRET hányados értékek normalizálási procedúráját a módszerek fejezetben ismertetem. A görbék három független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatja. A statisztikai vizsgálat elvégzéséhez párosított t-tesztet végeztünk az ingerlés előtti és utáni utolsó három pont átlagának összehasonlításával (a csillagok színe az egyes görbékre utal).

Két görbe összehasonlításához t-próbát használtunk, ahol a statisztikai próbákban az utolsó három pont átlagát használtuk fel. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; ns, nem-szignifikáns.

## 5.6 A Venus-K-Ras-CAAX fehérje PM kötésének további vizsgálata: az elektrosztatikus interakció, vagy egyes lipidek a fontosak?

A korábban bemutatott **13. ábrán** látható, hogy a 4- és 5-foszfatáz aktivitással egyaránt rendelkező PJ enzim rapamycinnel indukált PM-hoz irányítása során a PM PtdIns4P, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> és PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> tartalma is csökken. Annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk az egyes lipidek önálló szerepét a K-Ras fehérje PM lokalizációjának stabilizálásában a sejteket alacsony dózisu wortmannin kezelésnek vetettük alá, illetve a PJ enzim olyan mutánsait használtuk, melyek csak 4-, vagy 5-foszfatáz aktivitással rendelkeznek. A 100 nM-os koncentrációban alkalmazott wortmannin kezelésről korábban megállapítottuk (**13. ábra**), hogy csak a PM PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> szintjét csökkenti, míg a másik két foszfoinozítid mennyiségét nem befolyásolja. Használata esetén nem sikerült szignifikáns emelkedést kimutatni a Venus-K-Ras-CAAX fehérje és a Golgihoz irányított luciferáz közötti interakcióban, illetve a PJ enzim PM-hoz kapcsolódását követő interakció növekedést sem változtatta meg szignifikáns mértékben. Ezek alapján elmondható, hogy a PM PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> koncentrációja nem játszik meghatározó szerepet a K-Ras fehérje PM lokalizációjában, ugyanakkor érdemes megjegyezni, hogy bár a wortmannin hatására bekövetkező változások nem bizonyultak szignifikánsnak, egy kismértékű tendenciózus változás látható volt (**19. ábra**). A PM PtdIns4P és PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> tartalmának csökkentéséhez használt mutáns PJ enzimeket (PJ-4-foszfatáz és PJ-5-foszfatáz) munkacsoportunk már korábbi közleményekben is használta (90). Ezek a fehérjék egy-egy pontmutációt tartalmaznak a 4- és 5-foszfatáz domén katalitikus régiójában a PJ enzimhez képest, melynek következtében már csak az egyik lipid bontására képesek. A PJ és a két mutáns által létrehozott Venus-K-Ras-CAAX mozgás összehasonlítása során azt láthatjuk, hogy a megfelelő PM lipidek lebontását követően mindkét mutáns használata esetén szignifikánsan kisebb volt a Golgira áthelyeződő fehérje mennyisége, mint a PJ használata esetén. A PJ-4-foszfatáz alkalmazásakor, tehát a PM PtdIns4P frakciójának csökkentésekor jóval kisebb mértékű fehérjemozgást tapasztaltunk (**19. B ábra**), mint a másik két enzim esetében. A PJ-5-foszfatáz által kiváltott PM PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> csökkentés nagyobb áthelyeződést eredményezett (**19. B ábra**), mint a másik mutáns esetében, azonban a PJ hatásától ez is elmaradt. A Venus-K-

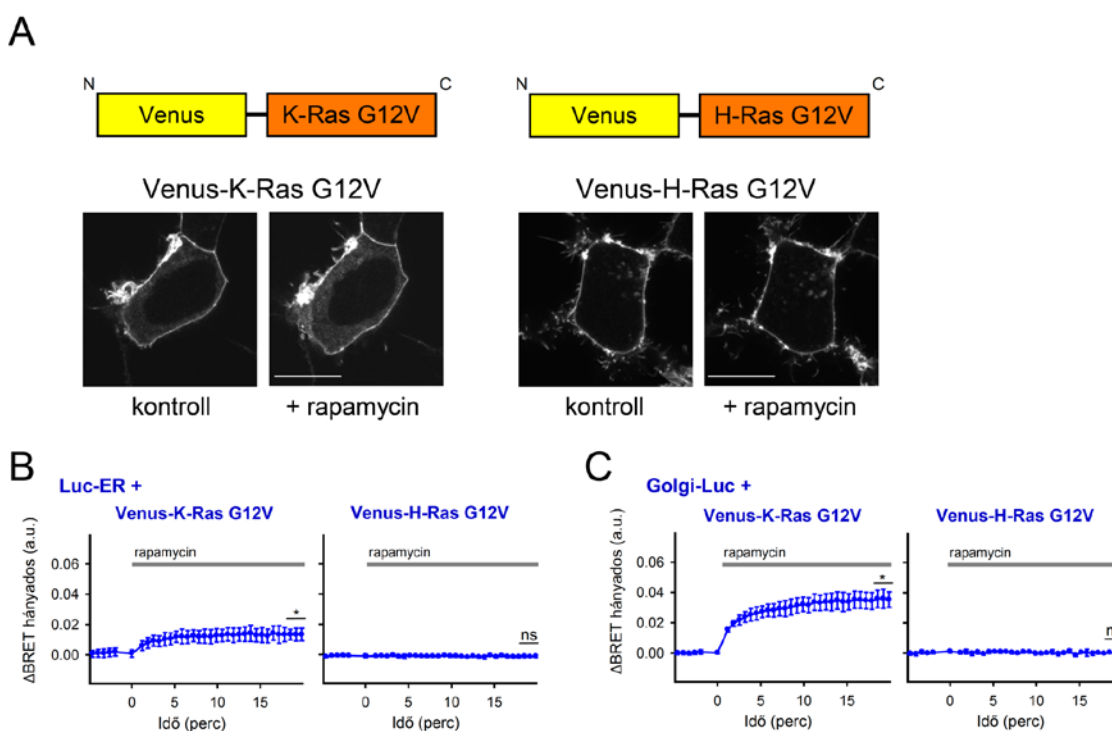
Ras-CAAX fehérje transzlokációjának mérésével párhuzamosan a PM PtdIns4P és PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> frakcióját is követtük (**19. C ábra**), hasonlóan a PJ által kiváltott lipid-szint-változásokhoz, melyet a (**13. ábra**) már korábban bemutattam. A kísérletek során az enzimek aktivitásának megfelelő lipid-változásokat tapasztaltunk. Tehát az 5-foszfataz aktivitású enzim működésénél a PM PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> tartalma csökkent, míg a PM PtdIns4P-frakciójában kismértékű növekedés volt látható. Ezzel ellentétben, a 4-foszfataz aktivitású enzimmél a PM PtdIns4P szintjének csökkenése mellett nem jött létre számottevő változás a PM PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-tartalmában.



**19. ábra** – A PM PIIns frakcióinak izolált változtatása által előidézett intacelluláris mozgások a Venus-K-Ras-CAAX fehérje esetében (A) A PM PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> szerepének vizsgálata a Venus-K-Ras-CAAX fehérje sejten belüli mozgásában. A sejtek PM PIIns szintjének csökkentéséhez 100 nM wortmanninnal gátoltuk a PI3K enzimet, vagy 300 nM rapamycinnal aktiváltuk a depléciós rendszerünket. (B) A PM PtdIns4P (zöld) és/vagy PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (piros) tartalmának csökkentése során tapasztalható interakció változása a Venus-K-Ras-CAAX fehérje és Golgi-hoz irányított luciferáz enzim között mérhető BRET szignál alapján. (A és B) Az intracelluláris mozgások követése során használt HEK 293T sejtek transziensen expresszálták a Venus-K-Ras-CAAX fehérjét, a Golgi felszínére irányított luciferáz enzimet (Golgi-Luc) és a depléciós rendszerünk tagjait (PM-FRB és FKBP-PJ, az együttes lipid-depléció esetén); FKBP-PJ-4-foszfataz a a PM PtdIns4P, illetve FKBP-5-foszfataz a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> izolált csökkentése esetén). A ΔBRET hányados értékek a 300 nM rapamycinnal, és/vagy 100 nM wortmanninnal kezelt sejtek és a DMSO-val kezelt kontroll sejtek adatainak különbségét prezentálják. (C) Az interakciós vizsgálatokkal párhuzamosan elvégeztük a PM PIIns frakcióinak mérését is az eltérő enzimek felhasználásával előidézett lipid-depléció során. Ezekben a kísérletekben az általunk korábban már bemutatott BRET alapú PtdIns4P és PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> szenzorokat használtuk a lipid-depléciós rendszert is tartalmazó HEK 293T sejteken. Az nBRET hányados értékek normalizálási procedúráját a módszerek fejezetben ismertetem. A görbék három (A), illetve négy (B és C) független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatják. Az egyedi görbék esetén a statisztikai vizsgálat elvégzéséhez párosított t-tesztet végeztünk az ingerlés előtti és utáni utolsó három pont átlagainak összehasonlításával. (a csillagok színe az egyes görbékre utal) Az egyes görbék összehasonlításához egyutas ANOVA-t használtunk, ahol a statisztikai próbákban az utolsó három pont átlagát használtuk fel. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001; ns, nem-szignifikáns.

## 5.7 A PM lipid-deplécióját követően kialakuló változások a teljes hosszúságú K-és H-Ras fehérje intracelluláris elhelyezkedésében

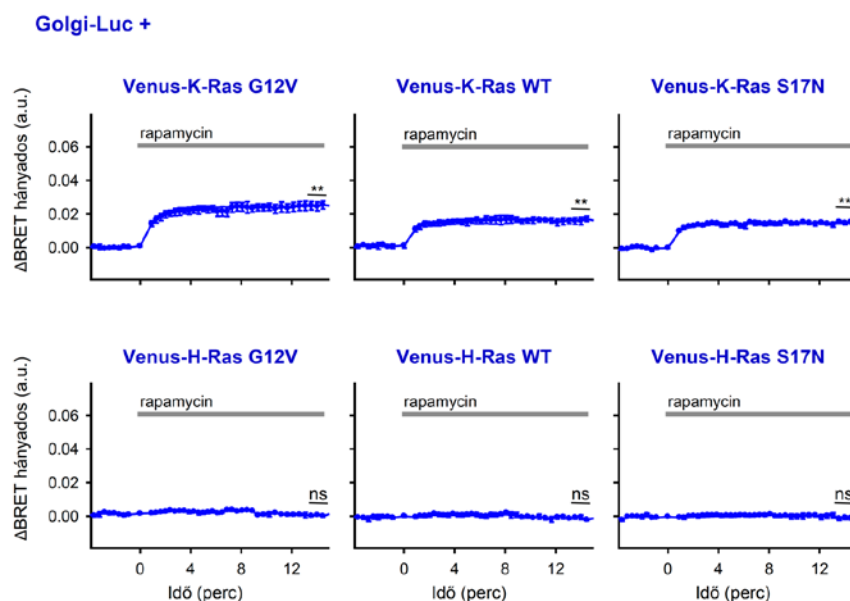
A korábbi kísérletekben a PM lipid-szintjeinek manipulálása után, a K- és H-Ras fehérjék intracelluláris átrendeződésére az irányítószakaszaikkal módosított Venus fehérjék mozgásából következtettünk. Az irodalomból jól ismert, hogy a Ras fehérjéknek a sejteken belüli lokalizációja ezen szakaszoktól függ, azonban a teljes hosszúságú fehérjék olyan fehérje-fehérje interakciókban is részt vehetnek, melyek befolyásolhatják szabad mozgásukat. Szükségszerű tehát, hogy a Ras fehérjék mozgására irányuló releváns konklúzió leszűréséhez megvizsgáljuk a teljes hosszúságú fehérjék mozgása során bekövetkező mozgásokat a PM lipid-deplécióját követően (**20. ábra**).



**20. ábra – A konstitutívan aktív K- és H-Ras mutánsok intracelluláris mozgásának vizsgálata a PM PPIs depléciója következtében (A)** A kísérletekben használt teljes hosszúságú, konstitutívan aktív K- és H-Ras fehérjéket tartalmazó konstrukciók (Venus-K-Ras G12V és Venus-H-Ras G12V) felépítésének sematikus ábrázolása, és sejten belüli elhelyezkedésük vizsgálata konfokális mikroszkóppal a PM PPIs depléciója előtt és után (300 nM rapamycin) a fehérjéket transziensen expresszáló HEK 293T sejteken. Lépték: 20  $\mu$ m. **(B és C)** A teljes hosszúságú, konstitutívan aktív K- és H-Ras fehérjék (Venus-K-Ras G12V és Venus-H-Ras G12V) ER és Golgi interakciójának vizsgálata BRET technikával, az organelumok felszínére irányított luciferáz enzimek (Luc-ER és Golgi-Luc) segítségével, a konstrukciókat és a lipid-depléciós rendszert (PM-FRB és FKBP-PJ) transziensen expresszáló HEK293T sejteken. A  $\Delta$ BRET hányados értékek a 300 nM rapamycinnel, és/vagy 100 nM wortmanninnal kezelt sejtek és a DMSO-val kezelt kontroll sejtek adatainak különbségét prezentálják. A görbék három független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatják. Az egyedi görbék esetén a statisztikai vizsgálat elvégzéséhez párosított t-tesztet végeztünk az ingerlés előtti és utáni utolsó három pont átlagainak összehasonlításával. \*  $p < 0.05$ ; ns, nem-szignifikáns.

Ennek vizsgálatához első lépésben elkészítettük a teljes hosszúságú, konstitutívan aktív mutáns K- és H-Ras fehérjék (K-Ras G12V és H-Ras G12V) Venus fluoreszcens fehérjével jelölt változatait, majd konfokális mikroszkóppal megvizsgáltuk a fehérjék sejten belüli mozgását, illetve a már bemutatott BRET-módszerrel az ER és a Golgi membránjára történő áthelyeződésüket a PM lipid-deplécióját követően. A mikroszkópos és a BRET-mérések során is hasonló eredményeket kaptunk, mint a fehérjék irányítószekvenciáival módosított Venus fehérje mozgásánál, tehát a K-Ras fehérje a PM-t elhagyva az ER-ra, illetve a Golgira helyeződött át, míg a H-Ras esetében nem tapasztaltunk semmilyen változást a fehérjék mozgásában a PM együttes lipid-deplécióját követően (**20. B és C ábra**).

Ezek után megvizsgáltuk, hogy a kapott eredmények függetlenek-e a fehérjék aktivitásától, ezért a konstitutívan aktív mutánsok mellet elkészítettük a fehérjék vad típusú (WT) és domináns negatív (S17N) verzióját is és megismételtük a kísérleteket. A mérések során az aktív mutánsok esetében tapasztalható változásokkal megegyező eredményt kaptunk (**21. ábra**).



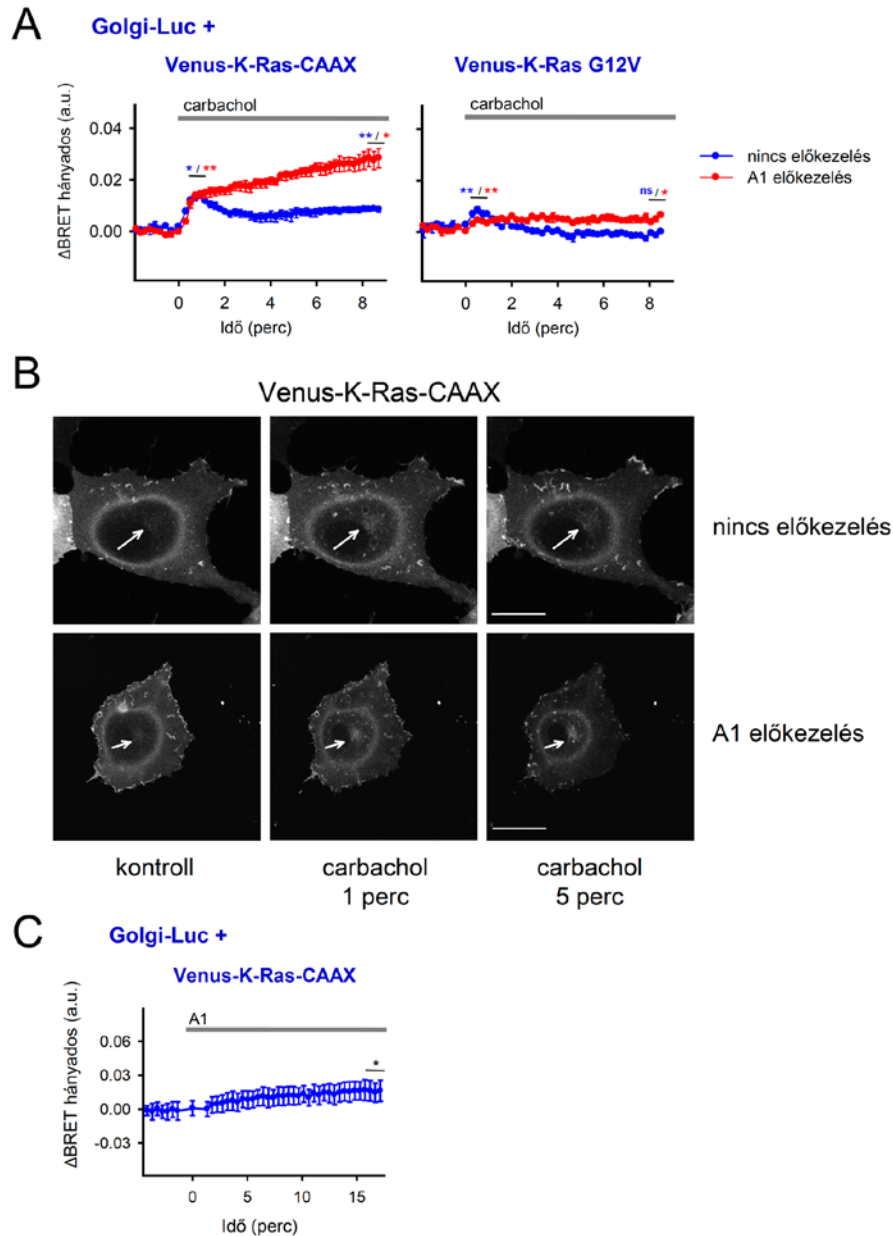
**21. ábra – A vad típusú és domináns negatív (S17N) K- és H-Ras mutánsok intracelluláris mozgásának vizsgálata a PM PPIs depléciója következtében** A teljes hosszúságú, konstitutívan aktív, vad típusú és domináns negatív K- és H-Ras fehérjék (Venus-K-Ras G12V/WT/S17N és Venus-H-Ras G12V/WT/S17N) Golgi interakciójának vizsgálata BRET technikával, az organelum felszínére irányított luciferáz enzim (Golgi-Luc) segítségével, a konstrukciókat és a lipid-depléciós rendszert (PM-FRB és FKBP-PJ) tranziensen expresszáló HEK293T sejteken. A  $\Delta$ BRET hányados értékek a 300 nM rapamycinnel, és/vagy 100 nM wortmanninnal kezelt sejtek és a DMSO-val kezelt kontroll sejtek adatainak különbségét prezentálják. A görbék három független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatják. Az egyedi görbék esetén a statisztikai vizsgálat elvégzéséhez párosított t-tesztet végeztünk az ingerlés előtti és utáni utolsó három pont átlagainak összehasonlításával. \*\*  $p < 0.01$ ; ns, nem-szignifikáns.

## 5.8 A K-Ras fehérje sejten belüli elhelyezkedésének változása G<sub>q</sub>-fehérjét aktiváló muszkarinos M3-as acetilkolin és EGF receptorok stimulációja esetén

A PM mesterséges lipid-depléciója esetén bekövetkező Ras fehérje mozgások vizsgálata után kíváncsiak voltunk arra, hogy a fiziológiás viszonyokat jobban közelítő állapotokban is bekövetkezik-e a K-Ras fehérjénél tapasztalt sejten belüli átrendeződés. Fiziológiás esetekben a PM jelentős mértékű lipid-depléciója az eltérő foszfolipáz C (PLC) izoformák aktiválódása során alakulhat ki, melyek közül a legismertebb mechanizmus a G<sub>q</sub>-heterotrimer G-fehérjét aktiváló hét transzmembrán (7TM) receptorok ingerlése során bekövetkező PLC $\beta$  aktiváció. A másik, ugyancsak ismert lehetőség a PLC enzim direkt aktiválására a tirozin-kináz receptorok ingerlése, melyek PLC $\gamma$  izoformájának működését fokozzák.

Kísérleteinkben ennek megfelelően a G<sub>q</sub>-heterotrimer G-fehérjét aktiváló M3-as muszkarinos acetilkolin receptor (M3R) és az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) aktiválódása során bekövetkező fehérjemozgásokat is megvizsgáltuk. Az M3R ingerlése során a Venus-K-Ras-CAAX fehérje a Golgira helyeződött át, amely tranziens kinetikát mutatott. Ennek hátterében a PLC működésének hatására kialakuló lipid-szint változások állhatnak, ugyanis ismert, hogy az enzim aktiválódása után a a PM PtdIns4P és PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> tartalma gyorsan csökken, majd emelkedni kezd a lipidek gyors újra termelődésének következtében. A reszintézis folyamatának meghatározó enzime a foszfatidil-inozitol 4-kinázok (PI4K) csoportjába tartozó PI4KA enzim, melyről egy korábbi munkánkban megállapítottuk (90), hogy fokozott működése a PLC jelpálya során aktiválódó proteinkináz C enzim közreműködésével valósul meg. Abban az esetben, ha a sejteket 10 perces A1 előkezelésnek vetettük alá, ami az enzim specifikus gátlószere, a Venus-K-Ras-CAAX fehérje mozgása megváltozik, és a Golgihoz irányított luciferázzal kialakított interakció a tranziens emelkedés helyett egy fenntartott, folyamatosan növekedést mutatott. Ezek alapján a lipidek reszintézisének fontos szerepe van a fehérje intracelluláris elhelyezkedésének szabályozásban a receptor aktivációját követően (**22. A ábra**).



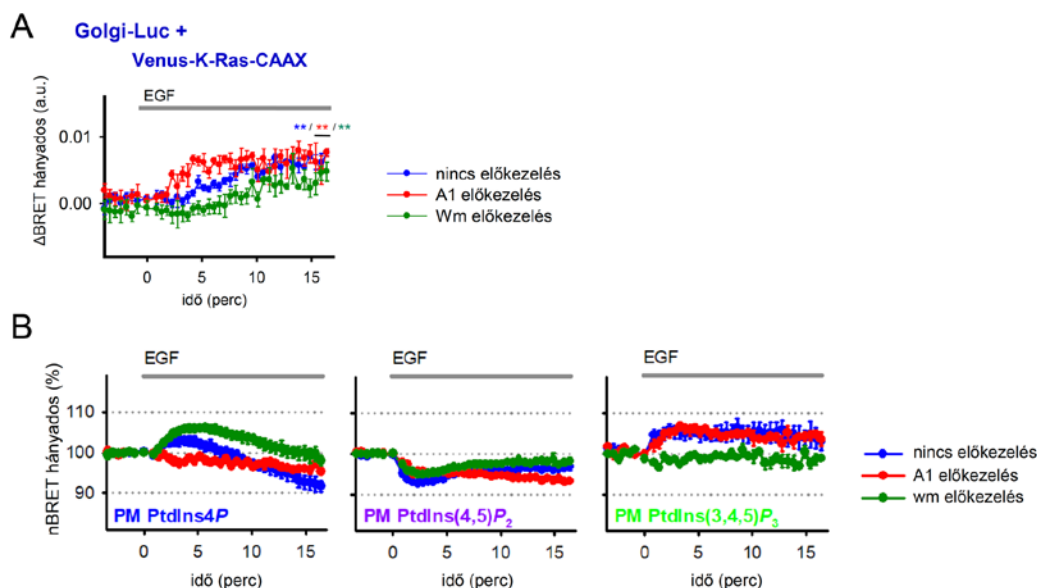


**22. ábra – A Venus-K-Ras-CAAX és a Venus-K-Ras-G12V konstrukciók sejten belüli elhelyezkedésének változása muszkarinos M3R aktivációja esetén (A)** A Venus-K-Ras-CAAX és Venus-K-Ras-G12V konstrukciók interakciójának mérése a Golgi membránjához irányított luciferáz enzimmal, BRET mérésekben 10  $\mu$ M carbachol stimulus hatására, a fehérjéket és a muszkarinos M3R-t tranziensen expresszáló HEK 293T sejteken (kék görbék), illetve a sejtek 10 perces PI4KA inhibitor A1 (10 nM) vegülettel történő előkezelése esetén (piros görbék). A  $\Delta$ BRET hányados értékek a 10  $\mu$ M carbachollal és a médiummal kezelt kontroll sejtek adatainak különbségét prezentálják. A görbék három független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatják. Az egyedi görbék esetén a statisztikai vizsgálat elvégzéséhez párosított t-tesztet végeztünk, melyben az ingerlés előtti három mérési pont átlagát, az ingerlés utáni 2-4. mérési pontok, illetve az ingerlés utáni utolsó három mérési pont átlagait hasonlítottam össze (a csillagok színe az egyes görbékre utal). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; ns, nem-szignifikáns. **(B)** A Venus-K-Ras-CAAX fehérje mozgásának nyomon követése 10  $\mu$ M carbachol stimulust követően a fehérjét és a muszkarinos M3R-t tranziensen expresszáló COS-7 sejteken. A nyilak a Golginak megfelelő területet mutatják. A PI4KA inhibitor A1 vegülettel történő előkezelés 10 percig tartott. A képek reprezentatív mérési eredményeket mutatnak. Lépték: 20  $\mu$ m. **(C)** A PI4KA inhibitor A1 vegület hatásának vizsgálata a Venus-K-Ras-CAAX fehérje és a Golgi membránjának interakciójára BRET mérésekben, a fehérjéket tranziensen expresszáló HEK 293T sejteken. A  $\Delta$ BRET hányados értékek a 10 nM A1-gyel és DMSO-val kezelt kontroll sejtek adatainak különbségét prezentálják. A görbék három független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatják. Az egyedi görbék esetén a statisztikai vizsgálat elvégzéséhez párosított t-tesztet végeztünk az ingerlés előtti és utáni utolsó három pont átlagainak összehasonlításával. \*  $p < 0.05$

A kísérleteket megismételtük a Venus-K-Ras-CAAX helyett a teljes hosszúságú fehérjéket tartalmazó sejteken is. Korábban a teljes hosszúságú fehérjéket vizsgálva kisebb mértékű áthelyeződést regisztráltunk a lipid-depléciós rendszer használatakor, ennek megfelelően ebben az esetben is egy csökkent változást tapasztaltunk, azonban a változás kinetikájában nem találtunk különbséget (**22. A ábra**). A Venus-K-Ras-CAAX konstrukció esetében kapott mérési eredményeinket konfokális mikroszkópos kísérletekben is megerősítettük (**22. B ábra**), ahol szintén sikerült kimutatni a Golgi membránjára került fehérjéket, illetve a kinetikai különbségeket is a kontroll és az A1-gyel kezelt sejtek között. Végezetül, a reszintézis gátlásához használt A1 vegyület hatását is megvizsgáltuk a Venus-K-Ras-CAAX fehérje mozgására, ugyanis ez önmagában is képes nagymértékű csökkenést előidézni a PM PtdIns4*P* frakciójában, így hasonlóan a rapamycinnel aktiválható mesterséges lipid-depléciónál látottakhoz, kismértékű emelkedésre lehet számítani. A vártaknak megfelelően sikerült szignifikáns emelkedést kimutatni a Venus-K-Ras-CAAX és a Golgihoz irányított luciferáz enzim közötti interakcióban, ami a molekulák Golgira való áthelyeződését mutatja, illetve megerősíti a PM PtdIns4*P* tartalmának szerepét a fehérje PM lokalizációjában. (**22. C ábra**)

Korábbi közleményünkben (90) bemutattuk, hogy overexpresszált EGFR-t tartalmazó HEK 293T sejtekben EGF stimulus hatására csökken a PM PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> szintje, ami egyrészt a PLCγ enzim aktiválódása, másrészt a PtdIns(3,4,5)*P*<sub>3</sub> fokozott szintézise miatt következik be. Ezt, és az eddigi kísérletek eredményeit figyelembe véve kíváncsiak voltunk arra, hogy az EGFR aktiválódása során bekövetkező, az M3R aktivációjánál tapasztalható képest jóval kisebb mértékű PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> depléció is elegendő-e a Venus-K-Ras-CAAX fehérje jól ismert Golgira való áthelyeződését kiváltani. A mérések során azt tapasztaltuk, hogy EGF stimulust követően szignifikánsan növekszik a Venus-K-Ras-CAAX fehérje és a Golgira irányított luciferáz enzim közötti interakció, azonban ennek mértéke elmaradt az M3R-nál tapasztaltaktól (**23. A ábra**). Abban az esetben, ha a PM-on történő lipid-reszintézist 10 nM A1 vegyület használatával gátoltuk, akkor a két fehérje között kialakuló interakció gyorsabban jött létre. Ha a PM PtdIns(3,4,5)*P*<sub>3</sub> szintézisét megakadályoztuk a termelésért felelős PI3K enzim 100 nM wortmanninnal történő gátlásával, akkor ugyancsak szignifikáns interakció növekedést tapasztaltunk, azonban a folyamat kinetikáját tekintve jelentős késés mutatkozott. A kísérletekkel párhuzamosan

mindhárom kérdéses lipid PM-szintjét monitoroztuk. A gátlószeres esetében a vártaknak megfelelő lipid-változásokat mértünk (**21. B ábra**).



**23. ábra – A Venus-K-Ras-CAAX fehérje intracelluláris elhelyezkedésében bekövetkező változások, és az azok háttérben álló lipidváltozások vizsgálata EGFR stimulust követően (A)** A Venus-K-Ras-CAAX fehérje és a Golgi membránjához irányított luciferáz enzim (Golgi-Luc) közötti interakció mérése BRET módszerrel 100 ng/ml EGF ingerlés hatására, a fehérjéket és a humán EGFR-t tranziensen expresszáló HEK 293T sejteken (kék görbék), illetve a sejtek 10 perces PI4KA inhibitor A1 vegyülettel (piros görbék), vagy 100 nM PI3K inhibitor wortmanninnal történő előkezelése esetén (zöld görbék). A ΔBRET hányados értékek a 100 ng/ml EGF és a médiummal kezelt kontroll sejtek adatainak különbségét prezentálják. A görbék négy független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatják. Az egyedi görbék esetén a statisztikai vizsgálat elvégzéséhez párosított t-tesztet végeztünk az ingerlés előtti és utáni utolsó három pont átlagának összehasonlításával. \*\*p < 0.01. **(B)** Az EGFR stimulálása esetén mérhető PM lipid-változások a lipidek érzékelésére alkalmas BRET-alapú lipidszenzorokat és az EGFR-t tranziensen kifejező HEK 293T sejtekben előkezelés nélkül (kék), 10 perces PI4KA inhibitor A1 vegyülettel (piros görbék), vagy 100 nM PI3K inhibitor wortmanninnal történő előkezelése esetén (zöld görbék). A nBRET hányados értékek normalizálási procedúráját a módszerek fejezetben ismertetem. A görbék négy független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatják.

Az A1 kezelés hatására a bazálisan is csökkent PtdIns4P szint további, ám kismértékű csökkenést mutatott, a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> szint esetében hiányzott a lipid reszintézise, míg a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> képződésre nem volt jelentős hatással. A wortmannin előkezelés hatására a bazálisan is csökkent PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> szintjének emelkedése elmaradt, azonban meglepő módon a PM PtdIns4P frakciójában emelkedést tapasztaltunk a kontroll körülményekhez képest. Ennek háttérben egy általunk, és az irodalom által még szintén nem ismert jelenség állhat, melynek tisztázása további terveink részét képezi. A mérések során regisztrált lipid-változások megmagyarázzák a fehérje mozgásának vizsgálatára irányuló kísérletekben kapott eltéréseket, ugyanis az A1 hatására bekövetkező változás feltehetően a PM PtdIns4P szintjének csökkenése miatt következett be, míg a wortmannin kezelésnél látható késés a PM PtdIns4P szintjének relatív emelkedésével is

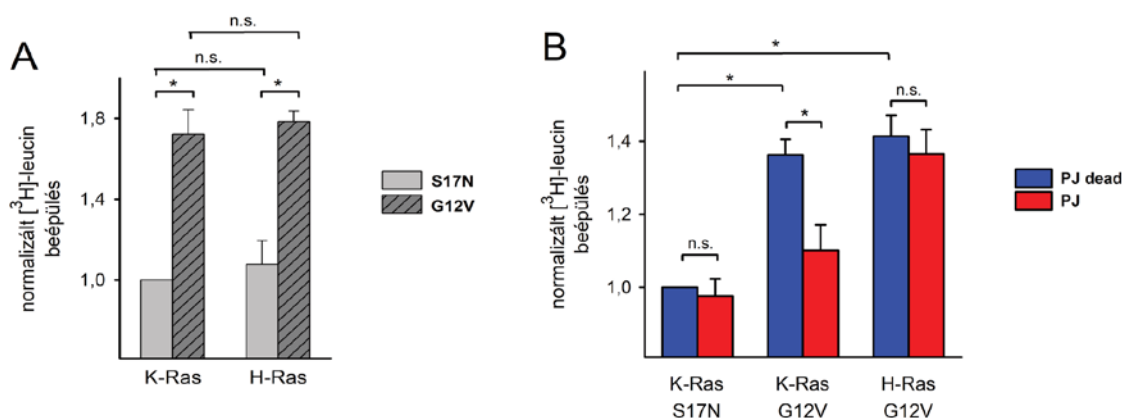
magyarázható. Adataink alapján a PM PtdIns(3,4,5) $P_3$  szintjének változásai nem voltak hatással a Venus-K-Ras-CAAX fehérje Golgira történő áthelyeződésére, míg a PM PtdIns4 $P$  és PtdIns(4,5) $P_2$  frakciójának változásai egyértelműen befolyásolták a folyamatot az előző kísérletekben látottakhoz hasonlóan.

### **5.9 A PM lipid-depléciójának hatása a K- és H-Ras fehérjék által indukált fokozott sejtproliferációra**

A Ras fehérjék központi szerepet töltenek be számos sejtleletani folyamat jelpályájában, és kitüntetett szerepük van a sejtek növekedésben, a sejtproliferációban, illetve a túlélési jelpályában (180). Annak megítélésére, hogy a K-Ras fehérjék PM-ről Golgira történő áthelyeződése a PM lipid-depléciójának következtében jár-e bármilyen funkcionális következménnyel, egy 24 órás izotóppal jelzett [ $^3\text{H}$ ]-leucin beépülési tesztet végeztünk el. Ez a módszer alkalmas a fehérjeszintézis sebességének megítélésére, hiszen a mérések során alkalmazott izotóp a szintézis mértékével arányosan kerül beépítésre a sejtekbe. Tehát, a beépült izotóp meghatározásával közvetlenül a fehérjeszintézis intenzitásáról, illetve közvetetten a sejtproliferáció sebességéről nyerhetünk adatokat.

A kísérletek során először összehasonlítottuk a domináns negatív és a konstitutívan aktív Ras mutánsok (S17N és G12V) sejtproliferációra gyakorolt hatását a K- és a H-Ras fehérjék esetében is. Ehhez a szükséges konstrukciókat tranziensen expresszáló COS-7 sejteket használtunk fel. A vizsgálat során a vártaknak megfelelő eredményeket kaptunk, tehát az aktiváló mutáció mind a két Ras izoforma esetében szignifikáns növekedést okozott a jelzett leucin beépülésében (**24. A ábra**). Ezek után arra kerestük a választ, hogy a PM lipid-depléciója milyen hatással van a K- illetve H-Ras tartalmazó sejtek proliferációs képességére. A kísérletek során a PM lipid-deplécióját a már bemutatott rapamycinnel indukálható heterodimerizációs rendszerünkkel hoztuk létre, melyben a foszfataz kettős, 4- és 5-foszfataz aktivitással is rendelkezett (FKBP-PJ). Mivel a kísérletek során, a rendszer aktiválását rapamycin hozzáadásával végeztük, amely hatásos gátlószere az mTOR jelpályának, ezért a fehérjeszintézist, tehát a leucin beépülést önmagában is gátolhatja, kontrollként olyan enzimet használtunk, amely a foszfataz alegységek inaktív formáit tartalmazta (FKBP-PJ-dead) (173). A kísérletek alapján elmondható, hogy 100 nM rapamycin jelenlétében, a 24 órás beépülési teszt során a konstitutívan aktív K- és H-Ras fehérjéket (K-Ras G12V és H-Ras G12V) tartalmazó

sejtekben szignifikánsan nagyobb volt a proliferáció mértéke, mint a domináns negatív K-Ras-t (K-Ras S17N) tartalmazó sejtekben, ha az inaktív foszfatázt alkalmaztuk. Abban az esetben, ha az izotóp beépülésének mértékét az aktív foszfatáz aktiválása mellett követjük, akkor a kontroll mérésekben tapasztalható szintekhez képest, a konstitutívan aktív K-Ras G12V konstrukciót tartalmazó sejtekben szignifikáns csökkenést tapasztalunk a mérhető izotópaktivitásban, míg a domináns negatív K-Ras S17N vagy a konstitutívan aktív H-Ras (H-Ras G12V) fehérjét tartalmazó sejtekben nem tapasztalható ez a csökkenés (**24. B ábra**). A kapott eredmények alapján feltételezhető, hogy az aktív Ras fehérjék csak PM-kötött formában képesek indukálni a sejtek fokozott leucin beépülését, mely a Golgira történő áthelyeződés során lehetetlenné válik a K-Ras fehérje esetében. A PM lipid-depléciójának önmagában nincs jelentős hatása a folyamatra, melyet a H-Ras G12V konstrukciónál látható eredmények alapján valószínűsíthetünk. A kapott változások háttérben álló folyamatokat részleteiben nem vizsgáltuk tovább. A lehetséges útvonalakra és a szerepet játszó fehérjékre a megbeszélés fejezetben térünk vissza. Későbbi terveink között szerepel a folyamatban szerepet játszó fehérjék és jelátviteli útvonalak tisztázása, melyek fontosak lehetnek a K-Ras függő daganatok viselkedésének megértésében, illetve új terápiás célpontok felderítésében.



**24. ábra – Izotóppal jelzett [<sup>3</sup>H]-leucin beépülési vizsgálatok eltérő aktivitással rendelkező Ras mutánsokat kifejező COS-7 sejtekben (A)** Normalizált [<sup>3</sup>H]-leucin beépülés mértéke konstitutívan aktív (G12V) és domináns negatív (S17N) mutációt hordozó K- és H-Ras fehérjék esetében. A normalizálás minden kísérletben a K-Ras S17N-re történt. Az oszlopok négy független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatják. Az adatok statisztikai vizsgálatához kétutas ANOVA-t használtunk. \*p < 0.05; ns, nem-szignifikáns. **(B)** Normalizált [<sup>3</sup>H]-leucin beépülés mértéke konstitutívan aktív (G12V) K- és H-Ras, illetve domináns negatív (S17N) mutációt hordozó K-Ras fehérjék esetében, egyidejűleg kivitelezett PM PPIns depléció során. A lipid-depléciót a már említett depléciós rendszerünk (PM-FRB és FKBP-PJ) tranzienst kifejezésével értük el. Kontrollként inaktív enzimet tartalmazó konstrukciót használtunk (PJ-dead). A kísérletekben a lipid depléciós rendszerünk tagjait, illetve a jelölt, teljes hosszúságú Ras fehérjét (mRFP-K-Ras S17N/G12V, illetve mRFP-K-Ras S17N/G12V) kifejező COS-7 sejteket használtunk. A normalizálás minden kísérletben az inaktív enzimet tartalmazó K-Ras S17N-re történt. Az oszlopok négy független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatják. Az adatok statisztikai vizsgálatához kétutas ANOVA-t használtunk. \*p < 0.05; ns, nem-szignifikáns.

### **5.10 A PM lipid-depléciójának hatása a sejtek Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- és Ca<sup>2+</sup>-válaszára G<sub>q</sub>-fehérjét aktiváló AT1-es angiotenzin II receptor stimulálását követően**

A Ras fehérjék sejten belüli elhelyezkedésének foszfoinozítid-függő szabályozása mellett munkám során egy másik folyamatnak, a kapacitív kalcium-beáramlásnak is vizsgáltam a PM-foszfoinozítidek által történő szabályozását. Azért erre a folyamatra esett a választás, mert korábban munkacsoportunk is szerteágazó kutatásokat végzett ebben a témában, illetve nagyon ellentmondásos eredmények láttak napvilágot ezen a területen az utóbbi, mintegy tíz évben. Ezen kívül azt feltételeztük, hogy a kifinomult PM lipid-depléciós rendszerünk használatával, mellyel képesek vagyunk a PM foszfoinozítid-frakcióinak izolált, specifikus csökkentésére, illetve a közelmúltban szintetizált vegyületnek, –melyet a Ras fehérjék mozgásánál már bemutattam– az A1-nek a felhasználásával tovább tudjuk gyarapítani és pontosítani a folyamat szabályozásáról szóló ismeretanyagot.

Munkánk kiindulópontjaként azt a korábbi közleményt tekintettük, amely összefüggést talált a PM PtdIns4P tartalma és a kapacitív kalcium-beáramlás folyamata között (160). A kísérleteikben angiotenzin II segítségével ingereltek olyan HEK 293 sejteket, melyek stabilan expresszálták a G<sub>q</sub>-fehérjéhez kapcsolt AT1-R-t. Ezáltal a sejtekben jellemző két fázisú Ca<sup>2+</sup>-jel jött létre, melynek első, tranziens, nagy amplitúdójú részét az Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> képződését követően felszabaduló ER eredetű ionok, míg második, ellaposodott részét a kapacitív kalcium-beáramlás során az extracelluláris térből származó ionok citoplazmába történő beáramlása hozza létre. A mérésekben azt vizsgálták, hogy a hormonnal történő aktivációt követően a kapacitív kalcium-beáramlás által létrehozott komponens befolyásolható-e a PM foszfoinozítid-szintjeinek befolyásolásával. A PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> szintjének csökkentését az általunk is használt rapamycinnel aktiválható heterodimerizációs rendszerrel hozták létre, melyben a citoplazmatikus foszfatáz alegység csak az 5-foszfatáz aktivitással rendelkező fehérjét tartalmazta. A PM PtdIns4P tartalmának csökkentésére egy olyan vegyületet alkalmaztunk (LY294002), amely egy széles körben alkalmazott PI4K gátlószer, azonban nem elég specifikus, mivel egyaránt gátolja a Golgin működő PI4KIIIβ és a PM-on működő, a foszfoinozítidek reszintézisét végző PI4KIIIα enzimeket. Fontos továbbá megemlíteni, hogy ez a vegyület a PI3K-ra is gátló hatással van, amely nem meglepő, hiszen a két

enzimcsalád nagyfokú homológiát mutat egymással felépítésüket tekintve (43). Összességében tehát elmondható, hogy a korábban alkalmazott módszerek nem tették lehetővé az egyes PM-foszfoinozitidek szerepének izolált vizsgálatát a folyamatban. A kísérletek során azt tapasztalták, hogy a PM PtdIns(4,5) $P_2$  szintjének változása önmagában nem képes a kalcium-beáramlás megváltoztatására, azonban abban az esetben, ha utána a sejteket a PI4K gátlószerrel kezelték, ami az eddigiekben említettek miatt a PM PtdIns4 $P$  és PM PtdIns(3,4,5) $P_3$  szintjét egyaránt csökkenti, akkor a  $Ca^{2+}$ -jel második fázisa, ami a kapacitív kalcium-beáramlásnak köszönhető, csökkent. Ezek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a PM PtdIns4 $P$  frakciójának fontos szerepe van a kapacitív kalcium-beáramlás folyamatában.

A fejezet bevezetésében említett új technikák birtokában azt a célt tűztük ki magunk elé, hogy hasonlóan az ismertett közleményhez, mi is megvizsgáljuk a PM foszfoinozítid-lipidjeinek szerepét a kapacitív kalcium-beáramlás folyamatának szabályozásában. A kísérletek során első lépésben mi is a hormonnal kiváltott  $Ca^{2+}$ -jelek foszfoinozítid függésének vizsgálatával kezdtünk el foglalkozni. A kísérletek során olyan HEK293T sejteket alkalmaztunk, melyek tranziensen expresszálták a munkacsoportunk által korábban bemutatott nem internalizálódó, mutáns AT1 receptort. A PM PtdIns(4,5) $P_2$  szintjének csökkentésére mi is a rapamycinnel indukálható heterodimerizációs rendszert használtuk, melynek citoplazmatikus alegysége szintén csak az 5-foszfátáz fehérjét tartalmazta, mint a bemutatott közlemény esetében. A PM PtdIns4 $P$  frakciójának csökkentésére azonban a bemutatott közleménnyel ellentétben a jóval specifikusabb A1 vegyületet alkalmaztuk, illetve összehasonlítottuk a kapott eredményeket a 10  $\mu$ M wortmannin előkezelés során tapasztaltakkal. A wortmannin ebben a koncentrációban ugyancsak gátolja mind a kettő PI4KIII izoformát és a PI3K-t is, mint a fent említett közleményben alkalmazott LY (LY294002) vegyület. Kísérleteink során további fontos szempont volt a citoplazmatikus Ins(1,4,5) $P_3$ -koncentráció követése a  $Ca^{2+}$ -szintek párhuzamos regisztrálása mellett. Erre előzetes megfontolásaink alapján azért volt szükség, hogy pontosabb képet kapjunk a  $Ca^{2+}$ -jel megszűnésének körülményeiről, amely már pusztán a hormoningerlés következtében két alapvető ok miatt is bekövetkezhet. Az egyik lehetőség, hogy a receptor aktivációja után a PLC $\beta$  hatására megemelkedő Ins(1,4,5) $P_3$ -koncentráció visszatér a nyugalmi szintre, így csökken az ER  $Ca^{2+}$ -permeabilitása, ami a kapacitív kalcium-beáramlás kiváltó

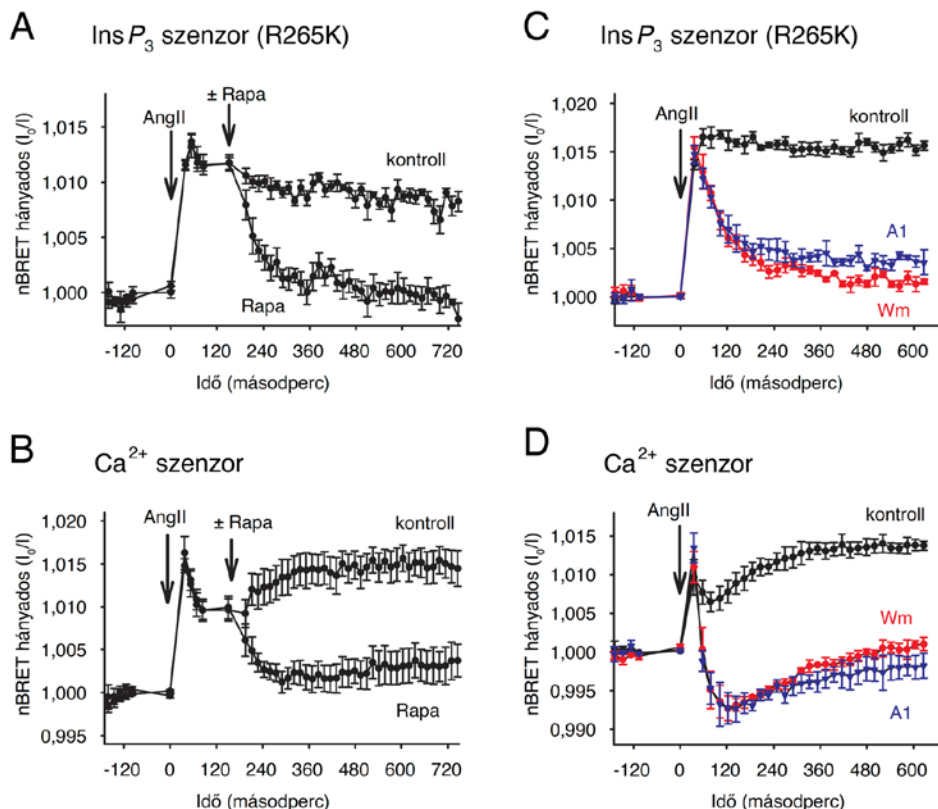
ingerének megszűnéséhez vezet. A másik lehetőség szerint a PM lipid-szintjeinek csökkenése miatt azok feltételezett szabályozó szerepe kiesik, ami az emelkedett  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -koncentráció ellenére a  $\text{Ca}^{2+}$ -jel terminálásához vezet. További bonyolító tényező, hogy a két folyamat szorosan kapcsolódik egymáshoz, ugyanis az  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$  keletkezésének forrása az a  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  molekula, melynek a beáramlás folyamatának szabályozásában is szerepe lehet.

A kísérletek során a citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -koncentrációjának méréséhez az általunk fejlesztett intramolekuláris BRET-szenzorokat használtuk melyeknek leírását és jellemzését kollégám, Dr. Tóth József már megtette doktori értekezésének keretei között, ezért a részletektől eltekintve a módszerek fejezetben is az eredeti közleményre hivatkozom (90).

Eredményeink alapján (**25. ábra**), a sejteket 100 nM angiotenzin II-vel ingerelve párhuzamosan változik a citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -koncentrációja az általunk vizsgált mintegy 12 perces időintervallumban. Abban az esetben, ha a sejtekben rapamycinnel beindítjuk az 5-foszfataz kihelyeződését a PM-ra, akkor a  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -szint csökkenésének hatására a citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -koncentráció is csökken. A két görbe esetében összehasonlítottuk a csökkenés kinetikáját, de nem találtunk szignifikáns eltérést az időállandókban [ $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szenzor:  $\tau=44 \pm 8,5$  másodperc,  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzor:  $47,5 \pm 23,8$  másodperc; átlag  $\pm$  S.E.M.,  $n=4$ ,  $p=0,892$ , kétmintás t-próba]. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a nem internalizálódó AT1 receptor mutáns által aktivált PLC $\beta$  önmagában nem képes olyan mértékű  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -bontást előidézni amely az  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szint fenntartásának gátját jelentené, vagy arra utal, hogy a  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -reszintézis során elegendő mennyiségű molekula képződik az  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -szint fenntartásához. Ezzel ellentétben, ha az 5-foszfataz enzimet a PM-hoz irányítjuk, akkor a reszintézis elégtelenné válik és nem tud egyensúlyt fenntartani a nagyfokú  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -fogyással, így a folyamat terminálódik (**25. ábra**).

Korábbi közleményünkben bemutattuk (90), hogy a PM foszfoinozítid-szintjeinek reszintézise a  $G_q$ -fehérjét aktiváló hét-transzmembrán receptorok, illetve az EGF-receptor stimulációja után is bekövetkezik. A folyamat kulcsenzime a már említett PI4KIII $\alpha$ , amely a jelpályák működése során a PKC enzim közvetítésével aktiválódik. A reakció során a PI4KIII $\alpha$  a PM-ban található  $\text{PtdIns}$ -t alakítja át  $\text{PtdIns}4P$ -tá, amely tovább alakul  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -tá a PM-ban konstitutívan működő 5-kináz enzimek közreműködésével.





**25. ábra** – A PM  $\text{PtdIns}(4)P$  és  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  frakciók csökkentésének hatása a sejtek  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ - és  $\text{Ca}^{2+}$ -válaszára  $G_q$ -fehérjét aktiváló 1-es típusú angiotenzin II receptor (AT1R) aktivációja esetén (A és B) AT1R-t tranziensen expresszáló HEK 293T sejtek  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ - és  $\text{Ca}^{2+}$ -válasza angiotenzin II-vel (AngII) kiváltott receptoraktiváció után. A sejtek a receptor mellett tartalmazták az ábrák címében jelölt másodlagos hírvivők kimutatására alkalmas BRET-alapú szenzorokat, illetve a PM lipid-depléciós rendszerüket is (PM-FRB és FKBP-5-foszfátáz), melyekben foszfatázként egy 5-foszfátáz aktivitású enzimet használtunk fel. A kísérletekben a hormonális stimulus után (100 nM AngII) 300 nM rapamycin adásával aktiváltuk a depléciós rendszerünket mellyel a PM  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  szintjének gyors esése következett be. A nBRET hányados értékek normalizálási procedúráját a módszerek fejezetben ismertetem. A görbék négy független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatják. (C és D) AT1R-t tranziensen expresszáló HEK 293T sejtek  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ - és  $\text{Ca}^{2+}$ -válasza 100 nM angiotenzin II-vel (AngII) kiváltott receptoraktiváció után. A sejtek a receptor mellett tartalmazták az ábrák címében jelölt másodlagos hírvivők kimutatására alkalmas BRET-alapú szenzorokat is. A mérések során a PM lipid-szintjeinek manipulálását gátlószerek segítségével értük el, melyekkel 10 percreg kezeltük elő a sejtjeinket. 10 nM A1 (kék görbék) segítségével a PI4KA enzimét, míg 10  $\mu\text{M}$  wortmanninnal (Wm) a PI4KA, PI4KB és a PI3K enzimeket gátlottuk. A nBRET hányados értékek normalizálási procedúráját a módszerek fejezetben ismertetem. A görbék három független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatják.

Abban az esetben, ha a kísérletek során az 5-foszfátázt a PM-hoz irányítjuk, akkor a rezisztetikus folyamat zavartalanul működik és a  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  fogyásával párhuzamosan a PM  $\text{PtdIns}4P$ -frakciója érintetlen marad, sőt akár növekedhet is az 5-foszfátáz működésének következtében. Ezzel ellentétben, ha a  $\text{PI4KIII}\alpha$  enzim gátlásán keresztül egy rezisztetikus blokkot hozunk létre, akkor a hormoningerlést követően a PM  $\text{PtdIns}4P$  és  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$ -tartalma egyaránt csökken. A továbbiakban ezt a lehetőséget is megvizsgáltuk a hormoningerléssel kiváltott citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -koncentráció változásaira, a  $\text{PI4KIII}\alpha$  enzim gátlásához a nem izoforma specifikus (a  $\text{PI4KIII}\alpha$  és  $\text{PI4KIII}\beta$  formákra egyaránt hat) wortmannint, és az enzimre specifikusnak

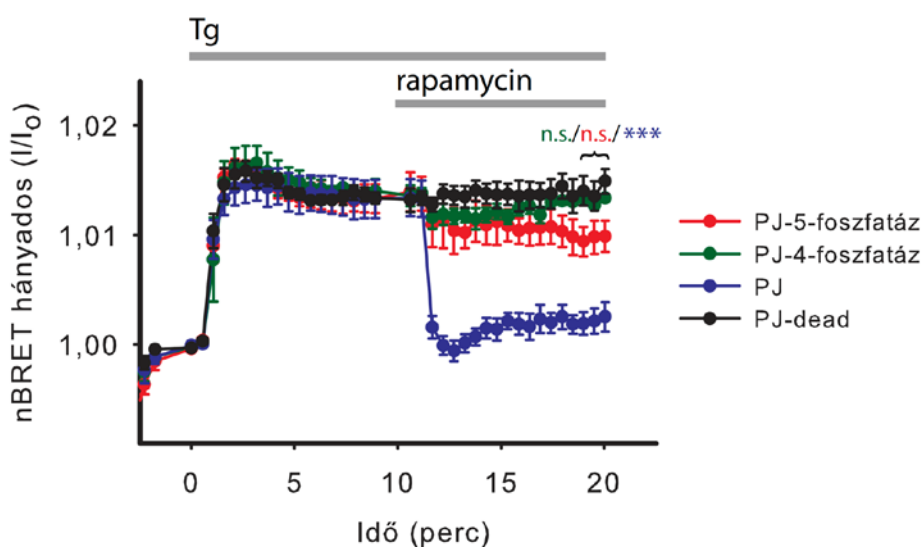
tekinthető A1 vegyületet használtuk. A vegyületekkel való 10 perces előkezelés hatására jelentős változásokat tapasztaltunk  $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -koncentrációt mutató görbék lefutásában. Az eredmények alapján a  $\text{Ca}^{2+}$ -szint csökkenése szignifikánsan gyorsabb volt (Wm:  $\tau=7 \pm 3,9$  másodperc, A1:  $\tau=11 \pm 7$  másodperc; átlag  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$ ), mint az  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -koncentrációé (Wm:  $\tau=61 \pm 3,6$  másodperc, A1:  $\tau=53 \pm 11$  másodperc; átlag  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$ ; Wm:  $p<0,001$ , A1:  $p<0,05$ , kétmintás t-próba), amely arra utal, hogy ebben az esetben a  $\text{Ca}^{2+}$ -jel terminálódása nem csupán az  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -koncentráció csökkenése miatt következik be, hanem a kapacitív kalcium-beáramlás fehérjéinek megváltozott működése következtében is, amely a PM  $\text{PtdIns}4\text{P}$  és  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -tartalmának együttes csökkenésével hozható összefüggésbe.

### 5.11 A PM lipid-depléciójának hatása a sejtek thapsigarginnal kiváltott $\text{Ca}^{2+}$ -válaszára

Az előző fejezetben bemutattam, hogy miként változik a sejtek citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -koncentrációja AT1-receptor ingerlését követően a PM izolált  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -, illetve együttes  $\text{PtdIns}4\text{P}$  és  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -tartalmának csökkentése esetén. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a kapacitív kalcium-beáramlás, függetlenül a sejtek citoplazmatikus  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -koncentrációjától gátlódik abban az esetben, ha a PM  $\text{PtdIns}4\text{P}$  és  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -szintje egyaránt csökken. Hasonló változást nem sikerült kimutatni abban az esetben, ha a PM-ban csak a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -koncentrációját csökkentettük. Sajnos a PM  $\text{PtdIns}4\text{P}$ -tartalmának izolált szerepe nem vizsgálható hormoningerlést követően kialakuló válaszkornál, ugyanis ez mindig a PM fokozott reszintetikus folyamataival és a  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -koncentráció csökkenésével is együtt jár. Ennek a kérdésnek a tisztázásához egy olyan kísérleti elrendezést választottunk, ahol a különböző lipidek koncentrációi egymástól függetlenül változtathatók, és a kapacitív kalcium-beáramlás aktivációja nem a PLC enzim fokozott működése során, tehát nem a citoplazmatikus  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -koncentráció emelkedése útján valósul meg.

A kísérleteinkhez HEK 293T sejteket használtunk, melyek tranziensen expresszálták a citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció követésére alkalmas BRET-alapú szenzorunkat, és az előző fejezetekben ismertetett lipid-depléciós rendszerünk mindkét tagját (**26. ábra**).

A heterodimerizációs rendszer citoplazmatikus alegységeként azokat a korábban bemutatott foszfatáz enzimeket használtuk, melyek csak 4-, csak 5-, vagy 4 és 5-foszfatáz aktivitással egyaránt rendelkeztek (PJ-4ptase, PJ-5ptase és PJ). A kapacitív kalcium-beáramlás aktivációját thapsigarginnal (Tg) hoztuk létre, amely az ER  $\text{Ca}^{2+}$ -pumpájának (SERCA) gátlására széleskörűen használt vegyület. A konstitutívan működő pumpa gátlásakor az ER  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalma lassan csökken, és ennek hatására aktiválódik a kapacitív kalcium-beáramlás, amely a citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció növekedéséhez vezet.



**26. ábra - A PM PtdIns(4)P és PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> frakcióinak csökkentésének hatása a sejtek Thapsigarginnal kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -válaszára** A kísérletekben HEK 293T sejteket használtunk fel, melyek tranziensen expresszálták a lipid-depléciós rendszerünk tagjait, a görbék elvezetésénél is látható módon. Tehát a sejtek a PM-FRB fehérjén kívül tartalmazták vagy az 5-foszfatáz aktivitású PJ-5-foszfatáz enzimet (piros), vagy a 4-foszfatáz aktivitású PJ-4-foszfatáz enzimet (zöld), mind a kettő aktivitással rendelkező PJ enzimet (kék), illetve az aktivitás nélküli mutánst (PJ-dead, fekete). A sejtekben a  $\text{Ca}^{2+}$ -jel kiváltásához 200 nM Thapsigarginnal (Tg) kezeltük a sejteket, míg a depléciós rendszer aktiválásához 300 nM rapamycint használtunk. A nBRET hányados értékek normalizálási procedúráját a módszerek fejezetben ismertetem. A görbék a PJ-5-foszfatáz és a PJ-4-foszfatáz esetében négy, a PJ-dead esetében öt, míg a PJ esetében hat független mérés átlagértékeit és az ahhoz tartozó standard hiba (S.E.M.) értékeit mutatják. A görbék összehasonlításához egyutas ANOVA-t használtunk, ahol a statisztikai próbákban a görbék utolsó három pontjának átlagait használtuk fel. \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns, nem-szignifikáns (a kontrollra, tehát a PJ-dead-re vonatkoztatva).

Kísérleteinkben tehát Tg-nal indukáltuk a kapacitív kalcium-beáramlás létrejöttét, majd ezt követően rapamycin segítségével a PM-hoz irányítottuk a különböző enzimaktivitással rendelkező foszfatáz enzimeinket és ennek megfelelően csökkenést hoztunk létre a PM foszfoinozítid frakcióiban. A mérések során csak a PM PtdIns4P és PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-tartalmának együttes csökkentésekor következett be a citoplazmatikus  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció esése, amely az áramot létrehozó csatorna gátlására utal (**26. ábra**). Ezzel ellentétben, a PtdIns4P, és a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> izolált csökkentésekor sem tapasztaltunk

változást a kontrollként használt körülményekhez képest, ahol a foszfatáz aktivitással nem rendelkező enzimot irányítottuk a PM-hoz. Fontos megjegyezni azt is, hogy a PtdIns4P és a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> együttes, illetve a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> izolált csökkentése esetén a PM PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> tartalma is csökken, az 5-foszfatáz aktivitással rendelkező enzimünk, illetve a lipid gyors anyagcseréje következtében.

Összefoglalva a kapacitív kalcium-beáramlással kapcsolatos eredményeinket elmondhatjuk, hogy a folyamatban szereplő fehérjék működése függ a PM inozitol-lipid tartalmától, és a csatorna működéséhez elengedhetetlen a PtdIns4P vagy PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> molekulák jelenléte a PM-ban, ugyanis funkciójuk csak a két molekula együttes eltávolításakor szűnik meg. Ez a fajta lipid-függés felveti a lehetőségét annak, hogy a folyamatban szereplő fehérjék funkcionálisan aktív konformációját a PM foszfoinozítid molekulái elektrosztatikus interakciók segítségével stabilizálják, illetve az is elképzelhető, hogy ezek a lipidek csak indirekten szabályozzák a fehérjék működését egy másik fontos szabályozó faktor mennyiségének befolyásolásán keresztül. Az ezekre vonatkozó irodalmat a megbeszélés fejezetben részletezem.

## 6 Megbeszélés

A különböző jelátviteli utakban szereplő intracelluláris fehérjék sejten belüli elhelyezkedése kiemelt jelentőségű az általuk ellátott fő funkció, a szignalizáció szempontjából. Ennek oka, hogy ezek a fehérjék az általuk megvalósított információtovábbítási folyamatban többnyire egy láncolatot alkotnak, melyben a résztvevő elemek időbeli és térbeli kapcsolódása is szigorúan szabályozott a funkció minél pontosabb végrehajtása érdekében. Abban az esetben, ha csak egy fehérje lokalizációja is károsodik az egymás utáni lépések során, akkor a jelátviteli út vonal károsodik, ami az általa szabályozott funkció megváltozásához, kieséséhez vezethet.

A perifériás PM-fehérjék esetében számos olyan mechanizmus került bemutatásra a bevezetés fejezetben, melyek a fehérjék megfelelő PM lokalizációját biztosítják. Ide tartoznak a különböző típusú poszttranszlációs lipidmódosítások; a fehérjék szekvenciájában megtalálható domének, melyek direkt membránkötést, vagy specifikus lipidek felismerését teszik lehetővé; és a másodlagos kötést biztosító elektrosztatikus interakciók is, melyek a PM negatívan töltött foszfolipid molekulái, tehát a PS, és a PPIs származékok, valamint a fehérjék pozitívan töltött aminosav oldalláncai között jönnek létre. Munkám során a PM PPIs molekuláinak szabályozó szerepét próbáltam meg részletesen és szisztematikusan feltárni ezen utóbbi kapcsolatban a perifériás PM-fehérjék, elsődlegesen a Ras fehérjecsald PM lokalizációjának és funkciójának szabályozásában; illetve ezen túlmenően a kapacitatív kalcium-beáramlás folyamatában is, melynek működésében szintén fontos szerepet tulajdonítanak a membrán és a fehérje között kialakuló elektrosztatikus interakcióknak.

A perifériás PM-fehérjék esetében a vizsgálatokat több különböző fehérje irányító-szekvenciájának felhasználásával végeztem, melyek irodalmi adatok alapján megfelelőnek és elégségesnek tűntek a teljes hosszúságú fehérjék mozgásának modellezéséhez (162-164). A későbbi nyomonkövetés érdekében a kiválasztott szekvenciákat monomer Venus fluoreszcens fehérjéhez kapcsoltuk. A kísérletek során azt tapasztaltam, hogy a c-Src és a K-Ras 4B (K-Ras) fehérjékhez tartozó irányító-szekvenciákat tartalmazó fúziós fehérjék a PM PPIs deplécióját követően a PM-ről a sejt endomembrán rendszereire helyeződnek át. Ezekre a fehérjékre az a jellemző, hogy az irányítószakaszaiknak köszönhetően csak egy mirisztoil, illetve csak egy prenil típusú poszttranszlációs lipidmódosításon mennek keresztül, és PM lokalizációjuk

stabilizálásában – az irányító-szekvenciájuk pozitívan töltött aminosavain keresztül – az elektrosztatikus interakcióknak is fontos szerepe van. A fehérjék mozgásának hátterében, tehát feltehetően az elektrosztatikus interakciók felborulása áll, melyet a kísérletekben a PM PPIs frakciójának csökkentése hozott létre. Ezzel ellentétben a H-Ras, illetve a többi hozzá hasonló fehérje, melyek irányító-szekvenciája további módosításon, jellemzően palmitoiláción esik át, nem mutattak hasonló intracelluláris átrendeződést a PM PPIs deplécióját követően. Az általunk vizsgált Ras fehérjecsalád két tagja, a K-Ras és H-Ras izoformák, tehát alapvetően eltérő viselkedést mutattak a PM PPIs frakciójának csökkentésekor. Ez egyrészt lehetővé tette a K-Ras működésének további vizsgálatát a kísérletekben a H-Ras fehérje kontrollként történő alkalmazása mellett, másrészt magyarázatul szolgálhat a Ras fehérjék esetében megfigyelhető szignalizációs különbségekre is (130,181).

Munkánk során a fehérjék mozgásának követésére konfokális mikroszkópot, illetve egy általunk kifejlesztett BRET-technikán alapuló módszert alkalmaztunk, amely nagymértékben megkönnyítette az adatok kvantitatív feldolgozását. A PM PPIs frakciók jelentőségének vizsgálatához a lipidek mennyiségét az általunk már korábban használt lipid-depléciós rendszerrel, illetve PM receptorok ingerlésével változtattuk. Kísérleteinkben azt kaptuk, hogy a K-Ras fehérje PM lokalizációjának fenntartásában a PM PPIs molekulái közül elsősorban a  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  a fontos, és ugyancsak szerepe van a folyamatban a  $\text{PtdIns}4P$ -nak is, míg a  $\text{PtdIns}(3,4,5)P_3$  nem, vagy alig vesz részt folyamat fenntartásában. Ezen kívül fontosnak tartom megemlíteni, hogy a fehérje intracelluláris átrendeződését az általunk alkalmazott BRET alapú módszerrel fiziológiásabbnak tekinthető ingerek felhasználásával, tehát receptorok aktivációjával is sikerült kimutatni, ahol szintén megerősítettük a már említett lipidek szerepét a folyamatban.

Az irodalomban számos olyan munka található, amely ugyanezzel a témakörrel foglalkozik. Ezekben a munkákban az volt a közös, hogy mindegyikük konfokális mikroszkópiát használt a fehérjék mozgásának megítéléséhez, ami nagyban nehezítette az endomembránok elkülönítését és a megfelelő következtetések levonását a sejt intracelluláris terére vonatkozóan. Hammond és munkatársai (173) ugyanazt a lipid-depléciós rendszert alkalmazták munkájuk során, amit mi is használtunk a kísérleteinkben. Ennek megfelelően ők is képesek voltak vizsgálni a PM PPIs

frakcióinak együttes és szuverén hatását is a PM lokalizációban. Kísérleteik során azt tapasztalták, hogy a K-Ras irányító-szekvenciájával jelölt fluoreszcens fehérje PM lokalizációjának csökkenése csak a membrán PtdIns(4,5) $P_2$  és PtdIns4 $P$  frakciójának együttes esésekor jön létre. Heo és Yeung (170,182) egymástól függetlenül vizsgálták a folyamatot két munkacsoport tagjaként, és mind a két közlemény arra a következtetésre jutott, hogy a fehérje lokalizációját biztosító CAAX domén PM lokalizációjában a PtdIns(4,5) $P_2$ -nek és a PtdIns(3,4,5) $P_3$ -nak van kiemelt szerepe. Heo és munkatársai ugyancsak egy indukálható lipid-depléciós rendszert alkalmazott, melyben a citoplazmatikus enzim egy 5-foszfátáz aktivitással rendelkező enzim volt. Az enzim PM-áthelyeződésével párhuzamosan nem tapasztaltak nagymértékű fehérje transzlokációt, erre csak abban az esetben volt lehetőség, ha a sejteket párhuzamosan egy PI3K gátlószerral, LY294002 kezelték. A farmakon jól ismert módon, nagy koncentrációban (183) képes a PM PtdIns4 $P$  szintézisét végző PI4KA enzim gátlására is. A közleményben használt 30  $\mu$ M-os koncentráció esetében biztosan megtörténik az enzim gátlása, így a PM PtdIns4 $P$  frakciójának gyors csökkenése is a PtdIns(3,4,5) $P_3$ -szintek csökkenésével párhuzamosan. A szerzők védelmében hozzá kell tenni, hogy abban az időben a gátlószert ilyen típusú viselkedése nem volt ismert, illetve nem állt rendelkezésre az általunk már elérhető PtdIns4 $P$ -ot kötő bioszenzor, mellyel a lipid változása könnyen és egyértelműen követhető. Az általunk kapott eredmények alapján, tehát a PtdIns4 $P$ -nak és a PtdIns(4,5) $P_2$ -nek van kitüntetett szerepe a K-Ras fehérje PM lokalizációjának biztosításában, míg a PtdIns(3,4,5) $P_3$  ilyen jellegű hatása elhanyagolható mértékű. A bevezetésben leírtaknak megfelelően a két meghatározó szereppel bíró lipid van jelen a legnagyobb mennyiségben a PM-on a PtdSer után a töltéssel rendelkező foszfolipidek sorában. Fontos azonban megemlíteni, hogy a két PPIns, főleg a PtdIns(4,5) $P_2$  kis csoportokban dúsulva klasztereket képez a membránban, ami nagymértékben emelheti a terület lokális elektromos térerejét, így a fehérjék kötését is jobban elősegítheti(20,184,185). Az általunk képviselt álláspontot tovább erősíti egy a közelmúltban megjelent közlemény, amely a molekulamodellézés útján jutott arra a megállapításra, hogy a K-Ras PM lokalizációjának legfontosabb stabilizálója a PtdIns(4,5) $P_2$  molekula (186).

A PM másik negatív töltéssel rendelkező foszfolipidének, a PtdSer-nek a szerepét is többen vizsgálták a K-Ras fehérje PM lokalizációjának szabályozásában (187-190). Jól

ismert, hogy ez a lipid csak egyszeres negatív töltést hordoz, azonban mennyisége jóval meghaladja a PPIIns-ek összességét a PM-ban (185). Ennek megfelelően, fontos szerepe van a PM belső felszínén a negatív környezet létrehozásában, így a pozitív töltéssel rendelkező fehérjék lokalizációjában is fontos szerepet tölthet be. A közleményekben a PtdSer mennyiségét nem specifikus módszerekkel, farmakológiailag csökkentették a PM-on, és a beavatkozások hatását a lipidet kötő specifikus doménnel (LactC2) monitorozták. A kísérletekben a K-Ras fehérje irányító-szekvenciájának, illetve a teljes hosszúságú fehérjének a mozgását is követték, amely a lipid szintjének csökkentésekor minden esetben megvalósult, függetlenül attól, hogy melyik vegyületet részesítették előnyben. Az első közlemény (19) esetében ionomycint alkalmaztak, amely egy  $\text{Ca}^{2+}$ -ionofór vegyület, így alkalmazása foszfolipázok aktiválódásához vezet (191). Ilyen körülmények között a mind a LactC2, mind a K-Ras fehérje elhagyta a PM-t, azonban ezeken kívül a PM PPIIns frakciója is erős esést mutatott. A többi hivatkozott közleményben a lipid szintjének csökkentését egyéb, nem specifikus szerekkel hozták létre, ugyanis a fendiline esetében egy  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló, míg az 7-oxo-staurosporin és a staurosporin esetében egy-egy döntően protein kináz C (PKC) gátlására használt vegyület került kipróbálásra (187,188,190). Nagyobb kételkedésre adhat azonban okot az a tény, hogy az említett szerekkel történő legalább 24, de jellemzően 48 órás kezelésre volt szükség a PtdSer-változások kimutatására, illetve a K-Ras fehérje mozgásában bekövetkező változások láthatóvá tételére. Fontos azonban megjegyezni, hogy a lipid eltávolítására alkalmas gyors módszer a mai napig nem áll rendelkezésre, így nagyon nehéz PtdSer szerepének egyértelmű tisztázása a folyamatban. A közlemények, illetve a PtdSer jelentőségének megítélése szempontjából további bonyolító tényező, hogy az elmúlt időszakban számos közlemény jelent meg az ORP5 és ORP8 fehérjék működéséről, melyek a PM PtdSer és PPIIns anyagcseréjét egyaránt befolyásolják. Ezek a proteinek fiziológias működésük során az ER-ből PtdSer-t transzportálnak a PM-ba, melyet egy ellenkező irányú PtdIns4P (46,192), vagy újabb közlemények alapján PtdIns(4,5) $P_2$  (51) transzport kíséri. Ezek alapján a fehérjék működése következtében, ha a PM PtdSer frakciója csökken egy ettől független mechanizmus hatására, akkor várhatóan a transzporter aktivitása fokozódik, amely ugyancsak növeli a PPIIns molekulák eltávolítását a PM-ről. Összességében tehát úgy tűnik, hogy a PM PtdSer szintjének csökkentésével valóban előidézhető a K-Ras fehérje PM-ről történő eltávolítása, azonban



az adatok alapján nem teljesen tisztázott a folyamat minden lépése, így nem lehet kizárni a PM PPIs molekuláinak szerepvállalását sem a folyamat során.

Az előzőekben azokról a folyamatokról, illetve kísérletes munkákról volt szó, melyekben a PM és a K-Ras fehérje közötti elektrosztatikus interakció csökkenése a PM negatív töltött foszfolipid molekuláinak fogyása során jött létre. Ettől eltérően, azonban lehetőség van az elektrosztatikus interakció mértékének változtatására a fehérjék pozitív töltéseinek csökkentése révén is, melyre kitűnő példát szolgáltat a MARCKS fehérje intracelluláris mozgásának mechanizmusa (10). A MARCKS betűszó egy olyan fehérjét jelöl, amely hasonlóan a K-Ras és a c-Src fehérjékhez ugyancsak egyszeres lipidmodifikáción, egy mirisztoiláción megy keresztül, és a PM lokalizációjában a szekvencián belüli pozitív aminosavaknak kiemelt jelentősége van (193). További fontos tulajdonsága, melyet a neve is jelöl, hogy a PKC enzimnek szubsztrátja, tehát az enzim aktiválódása esetén foszforiláció történik a fehérje szerin oldalláncain. Ennek következtében a foszfátcsoportok negatív töltései csökkentik a MARCKS fehérje aminosavai által létrehozott pozitív töltésű felületet, ami az elektrosztatikus interakció csökkenéséhez, így a fehérje lokalizációjának megváltozásához vezet (194). Ezt a mechanizmust a K-Ras fehérje esetében is leírták (195), ugyanis ennél a fehérjénél is találunk egy szerin aminosavat (S181) az irányító-szekvencián belül, a pozitív töltésű aminosavak környezetében. A foszforiláció hatására a K-Ras fehérje a PM-ről a sejt endomembrán rendszereire, ezen belül is a mitokondriumokra került. A fehérje-áthelyeződés funkcionális hatását is kimutatták, ugyanis a sejtorganelum felszínén a K-Ras interakcióba lép a proapoptotikus Bcl-X<sub>L</sub> fehérjével és apoptózist indukál. A közleményben az enzim aktiválását PMA vagy Bryostatin-1 és a már említett ionomycin együttes adásával hozták létre, melynek PM PPIs csökkentő hatásáról korábban már én is beszámoltam.

A közleménnyel ellentétben, nekünk nem sikerült kimutatnunk a fehérje mitokondriumokra történő áthelyeződését PKC aktivációját követően, melyet ionomycin alkalmazása nélkül, az enzim aktivációjához széleskörűen használt PMA vegyület önálló adásával hoztunk létre. Ezzel ellentétben, azokban a kísérleteinkben, ahol a K-Ras irányító-szekvenciájával módosított fluoreszcens fehérje mozgását vizsgáltuk a PM PPIs szintjének indukált csökkentésekor, mi is tapasztaltuk a fehérje és a mitokondriumok közötti interakció szignifikáns emelkedését, azonban ennek mértéke

messze elmaradt a Golgi membránjára történő áthelyeződéshez képest. Fontos azonban megjegyezni, hogy ez a mechanizmus is hozzájárulhat a PM PPIs depléciója esetén mérhető csökkent sejtproliferációhoz, amit a konstitutívan aktív K-Ras fehérjét tartalmazó sejtek esetében sikerült kimutatnunk.

Munkánk során kiemelt figyelmet fordítottunk a PM-t elhagyó K-Ras fehérjék későbbi sorsára, melynek vizsgálatában nagy segítséget nyújtott a molekulák mozgásának követésére alkalmas, általunk kifejlesztett BRET-alapú módszer. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a fehérje a PM lipid-deplécióját követően az ER-ra, a mitokondriumokra, de főleg a Golgi membránjára helyeződött át. A mérések során azt is bizonyítottuk, hogy a fehérje mozgása a citoplazmán keresztül valósul meg az irodalomban leírt szolubilizáló fehérjék segítségével. Ennek kimutatására a deltarasin vegyületet használtuk, amely a K-Ras fehérjék lipidmódosítását mimikálva a szállító fehérjék kötőhelyét részlegesen telítette, így gátolta a K-Ras irányító-szekvenciájával ellátott fluoreszcens fehérje transzportját a Golgi felszínére. Ezzel párhuzamosan azt tapasztaltuk, hogy a PM-t elhagyó fehérjék a szállítórendszer kapacitásának hiányában intracelluláris vezikulákon is megjelentek. Fontos megemlíteni, hogy a K-Ras-CAAX fehérje ilyen jellegű lokalizációját korábban nem tapasztaltuk, és ennek a „patológiás” lokalizációnak a hátterében feltehetően a fehérjék lipofil tulajdonsága, illetve a vezikulák felszínének PPIs (PtdIns3P, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>) tartalma állt, azonban a folyamatot nem vizsgáltuk részletesen. Ezzel ellentétben vizsgáltuk és bizonyítottuk is a Golgi PtdIns4P tartalmának szerepét a K-Ras-CAAX fehérje áthelyeződésében az organellum felszínére.

A következőkben azt a kérdést fogalmaztuk meg, hogy a Golgi membránjára átkerült K-Ras fehérjének van-e bármilyen fiziológias jelentősége, vagy pusztán csak egy kihelyezett tartalékot képez, amely a későbbiekben a PM-ra visszajutva részt vehet a fehérjére jellemző fiziológias működésekben. A Ras fehérjék endomembrán rendszerekről történő szignalizációjára több irodalmi példát találhatunk, azonban ezekben a munkákban a H- és N-Ras fehérjéket említik (196,197). Ennek oka feltehetően az, hogy ezek azok az izoformák, melyek normális, sejten belüli ciklusuk alkamával is megtalálhatóak a Golgi és az intracelluláris vezikulák membránján, míg a K-Ras esetében ez nem jellemző (164). Az említett izoformák endomembrán-függő jelátvitelében az ERK-jelpálya fokozódását sikerült kimutatni (198), míg a fehérjék aktivációjának előidézésében feltehetően az endomembránokon található RasGRP fehérje játszik kitüntetett szerepet (199,200). Ez

utóbbi protein jelenléte lehetőséget biztosítana az ide kerülő K-Ras fehérjék aktivációjára is, azonban munkánk során ezt nem sikerült adatokkal alátámasztanunk. Jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján tehát elmondhatjuk, hogy az ER és a Golgi membránjára áthelyeződő K-Ras molekulák nem rendelkeznek szignalizációs szereppel, hanem egy olyan dinamikus változó, újrahasznosítható fehérjecsoportot alkotnak, melyek a PM PPIs szintjeinek rendeződésekor ismét kijuthatnak a PM-ba és folytathatják a szignalizációs feladatukat. Erre utal a  $G_q$ -kapcsolt muszkarinos M3 receptor ingerlésekor bekövetkező változások is, melynek során a fehérje csak transziens megjelenést mutatott a Golgi felszínén, és a PM PPIs szintjeinek reszintézisekor visszatért a kiindulási helyére.

Annak megerősítésére, hogy a PM-t elhagyó, és ezáltal endomembrán elhelyezkedést mutató K-Ras fehérjék ténylegesen is gátoltak a szignalizációs funkciójukban további kísérleteket végeztünk a sejtek proliferációs képességének megítélését célzó leucin-beépülési vizsgálatunkkal. A Ras fehérjék proliferációt aktiváló képessége alapvetően három jelátviteli útvonal eredményeképpen jöhet létre, melyeket a bevezetés fejezetben már részletesen bemutattam. Ezek közül az első, és legjobban ismert útvonal a PI3K jelpálya, melynek során az Akt fehérje fokozott működése figyelhető meg; a második a MAPK kaskád, amely a Raf fehérje aktivációján keresztül valósul meg; végezetül pedig a Ral útvonal, melyet a Ral-GDS fehérje indít be (201). Ez utóbbi jelpálya nem annyira közismert, azonban egyre több adat szól a jelpálya proliferációt előidéző hatása mellett, amit a mutáns Ral fehérjék tumorokban tapasztalható gyakori előfordulása is jelez (130,136). A 24 órás leucin-beépülési vizsgálatokban a K- és H-Ras fehérjék konstitutívan aktív (G12V) és domináns negatív (S17N) mutánsait használtuk fel, míg a PM PPIs szintjének csökkentését, és ezáltal a K-Ras fehérje endomembrán lokalizációját a rapamycin-függő heterodimerizációs rendszerünk aktivációjával idéztük elő.

Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a PM PPIs depléciója esetén csak azokban a sejtekben csökkent a radioaktívan jelzett leucin beépülése, melyek a konstitutívan aktív K-Ras fehérjét tartalmazták. A H-Ras fehérje aktív formáját kifejező sejteknél nem jött létre változás a proliferációban, tehát a kapott eredmények megfeleltek a várt változásoknak, melyekre a fehérjék intracelluláris mozgásának vizsgálatából lehetett következtetni. Fontos megjegyezni, hogy a kísérletes rendszerünkben fakadóan a sejtek mindvégig 100 nM rapamycint tartalmazó médiumban nőttek, melyet 8 óránként

pótolunk. A vegyület ebben a koncentrációban teljesen gátolja a PI3K jelpálya effektorának tekinthető mTOR fehérjét, tehát a proliferációs hatás különbségének megítélése szempontjából ezt az útvonalat figyelmen kívül hagyhattuk (202,203). Ezek alapján a proliferációban bekövetkező változások okát a másik két útvonal eltérő működésében kell keresni. A MAPK kaszkád szabályozásával kapcsolatban több közlemény is beszámolt arról, hogy a jelpálya normális működésének feltétele a PM PPIs molekuláinak jelenléte (128,204). Ennek oka, hogy a kaszkád kezdeti lépéseiben fontos szerepet játszó KSR-1 állványfehéje – amely a kezdeti aktiválódás fehérjelemeit egy komplexbe tömöríti, növelve ezzel az aktiváció határfokát és gyorsaságát is – PM lokalizációja foszfolipid függő. Ezt alátámasztják azon nem publikált megfigyeléseink is, melyeket a konstitutívan aktív K- és H-Ras fehérjék ERK foszforilációs képességének vizsgálatakor szereztünk. Ezekben a kísérletekben függetlenül az alkalmazott Ras izoformáktól, mindkét esetben csökkent ERK fehérje foszforilációt mértünk a PM PPIs depléciója után, már az első tíz perces intervallumban is. Széles körben elfogadott, hogy a Ral útvonalon keresztül a Ras fehérjék aktiválhatják a TBK1 fehérje útvonalat is, amely fokozott sejtproliferációhoz vezet (131). A Ral fehérje sejten belüli elhelyezkedése, illetve membránkötésének mechanizmusa még jelenleg sem tisztázott teljes mértékben, ugyanis egyes közlemények a fehérje fő működési helyszínéként a Golgit, míg mások a PM-t jelölik meg. Ezen kívül a fehérjék lipidmódosítási mintázatáról is találhatunk eltérő adatokat, mivel az elektrosztatikus interakciók létrejötte mellett leírtak palmitoiláció keresztüli szabályozást is (132,205). Ez utóbbi magyarázatot adna a jelen kísérleti rendszerünkben megfigyelhető proliferáció csökkenésre, ugyanis meggátolná a fehérje PM-ről való leesését, ezáltal a Golgi membránján való megjelenését a PM PPIs depléciója következtében. Az eredmények alapján elmondható, hogy a kísérleteink során tapasztalt PM lipid-deplécióval kiváltott csökkent proliferáció háttérében feltehetően a Ral útvonal eltérő szabályozása áll, amely a jelpályát aktiváló K- és H-Ras fehérjék eltérő intracelluláris elhelyezkedéséből fakad, azonban a folyamat további vizsgálatra szorul.

A SOCE folyamatának PPIs függését számos munkacsoport vizsgálta rajtunk kívül (206-209). Ezekben a munkákban közös, hogy a SOCE aktivációjában, vagy az áram fenntartásában a STIM1 molekula direkt PtdIns(4,5) $P_2$  és PtdIns(3,4,5) $P_3$  kötésének, vagy egyéb PtdIns(4,5) $P_2$ -t kötő moduláló fehérjéknek, a septineknek (210), synaptotagminoknak (206), vagy a TMEM110 transzmembrán fehérjének (208)

tulajdonítanak szerepet. A STIM1 fehérje SOAR doménjének direkt lipidkötéséről már a bevezetés ezzel a témával foglalkozó részében és az eredmények ismertetésénél is részletesen írtam. Az említett munkákban a polibázikus SOAR domén legfőbb feladatának a PM közelségének érzékelését tekintették az elektrosztatikus interakciók által, amely az Orai1 aktivációját előidéző konformációs változáshoz vezet. Az újabban leírt moduláló fehérjéről elmondható, hogy legfőbb feladatuk a STIM1-Orai1 komplex létrejöttének elősegítése, amelyet az ER-PM közötti kontaktpontok létrehozásával, vagy a fehérjék kontaktpontokban történő stabilizálásával érnek el (211,212). Az eddigi kutatások mintegy 70 hasonló fehérjét jelöltek meg, melyek ilyen módon elősegíthetik a folyamat bekövetkezését (207).

Ezek mellett, azonban találhatunk olyan új publikációkat is az irodalomban, melyek a PM PPIs frakciója mellett a membrán koleszterin tartalmát is fontosnak tekintik a folyamat szabályozásában (213,214). A közleményeknek sikerült olyan aminosavakat azonosítani az Orai1 fehérjén, illetve a STIM1 fehérje már említett SOAR doménjén belül, melyek a PM koleszterintartalmának felismeréséért és kötéséért felelősek. Az aminosavak mutációja, illetve a PM koleszterintartalmának csökkentése a STIM1 és Orai1 fehérjék asszociációjának növekedéséhez, így az áram növekedéséhez vezetett. Ezzel ellentétben olyan adatok is ismertek, hogy a SOCE aktiválódása során a STIM1 és az Orai1 közötti kapcsolatok preferáltan a PM koleszterinben és  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -ben gazdag rendezett, vagy a régi nomenklatúra szerinti raft régióiban alakulnak ki, majd a folyamat előrehaladtával a koleszterinben és  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -ben szegény non-raft kompartmentekbe kerülnek (206). A közlemények alapján elképzelhető, hogy a koleszterin szerepe a folyamatban kettős: egyrészt szükség van rá a STIM1 és az Orai1 fehérjék közös kompartmentbe történő dúsulásához, majd ennek létrejötte után gátolja a fehérjék kapcsolódását, ezzel is elősegítve a fehérjéknek az áram kialakulásának kedvező mikrodomének felé terelését.

Az ER és a PM közötti nem vezikuláris koleszterin transzportban a manapság intenzíven kutatott és a korábbiakban már bemutatott OSBP és ORP fehérjék vesznek részt, melyek a két membrán közötti lipidtranszport energetikai biztosítására a PM és az ER között fennálló  $\text{PtdIns}4\text{P}$  grádienszt használják fel. Az eddigi adatok alapján a fehérjék által katalizált reakciókban a PM-ről  $\text{PtdIns}4\text{P}$  transzportja, míg ezzel ellentétesen koleszterin, vagy  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  szállítása figyelhető meg. Kísérleteink során azt kaptuk,

hogy a SOCE csak a PM PtdIns4*P* és PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> tartalmának együttes csökkentésekor gátolható. Az eddig ismertetett irodalmi adatok alapján ennek a háttérben több magyarázat is elképzelhető. Egyrészt lehetséges, hogy a két lipid által hordozott negatív töltések, és az általuk biztosított elektrosztatikus interakciók a fontosak, melyek elégtelensége csak mindkét lipid együttes eltűnése esetén következik be. A másik magyarázat alapján, – amely sokkal inkább feltételezésekre szorítkozik így további vizsgálatokat igényel a felvetés bizonyítása – az elektrosztatikus interakciók kialakulásáért, így a STIM1 molekula PM kötéséért a PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> tehető felelőssé, amely a koleszterinnel együttműködve biztosítja az Orai1 és a STIM1 közötti kapcsolat kialakulását. Az általunk alkalmazott PM lipid-deplécióval mind a két mechanizmus gátolható, ugyanis a már részletezett módon a membrán PtdIns4*P*-szintjének csökkentése a felállított modell alapján a PM koleszterin és PtdSer tartalmának csökkenéséhez vezet. A PtdSer-ről ráadásul egy közleményben megállapították (215), hogy fő feladata a koleszterin stabilizálása PM-ban, így a PM PtdIns4*P* frakciójának csökkentése több útvonalon keresztül is a koleszterin szintjének csökkentéséhez vezethet a transzporter fehérjék gátolt működése következtében.

Összegzésként elmondható, hogy munkám során a PM PPIIns-ek szerepével foglalkoztam a K-Ras fehérje intracelluláris elhelyezkedésében és funkciójában, illetve ezen túlmenően a kapacitatív kalcium-beáramlás folyamatában is. Eredményeink beilleszthetőek voltak a témákkal foglalkozó tudományos irodalom ismeretanyagainak sorába, melyeket fejlett, a lipidek egyenként történő változtatására alkalmas molekuláris eszköztárunk, a lipidek és a fehérjék mozgásának nyomonkövetésére alkalmas módszereinknek köszönhetően tovább gyarapították a lipidek pontos funkciójáról kialakult képet az említett sejtfolyamatokban.

## 7 Következtetések

A PhD-dolgozatom alapjául szolgáló kísérletes munka két témakört ölelt fel, melyek központjában a PM PPIIns-frakciói, illetve ezek szabályozó szerepe állt. Az első részben a Ras fehérjecsalád PPIIns-függő sejten belüli elhelyezkedéséről és az ezzel kapcsolatos funkcionális hatásokról számoltam be, míg a második részben a kapacitív kalcium-beáramlás folyamatának PPIIns függő szabályozásával összefüggő eredményeimet prezentáltam. A kísérletek során nyert adatokból az alábbi következtetések vonhatóak le:

- Eredményeink alapján azok a perifériás PM-fehérjék, melyek szekvenciájukban pozitívan töltött aminosavakat tartalmaznak, elhagyják a PM-t, ha annak PtdIns4P és PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> tartalmát csökkentjük.
- A PMPtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> tartalma nem, vagy csak kismértékben játszik szerepet a pozitívan töltött aminosavakat tartalmazó perifériás PM-fehérjék PM lokalizációjában
- A K-Ras fehérje a PM elhagyása után döntően a Golgira helyeződik át, melyben az organelum felszínének PtdIns4P tartalma fontos szerepet játszik.
- A K-Ras intracelluláris mozgása során a citoplazmában marad, szállítófehérjék által szolubilizált formában.
- A K-Ras mozgásában tapasztalható változások fiziológias ingerek alkalmazása esetén, a Gq-fehérjéhez kapcsolt M3R és az EGFR aktivációja során bekövetkező PM foszfoinozítid-depléció esetén is létrejönnek.
- A PM foszfoinozítid-depléciója hatására csökken az aktív K-Ras proliferációt kiváltó képessége, melynek hátterében a kimutatott lipid-depléció hatására bekövetkező transzlokáció állhat.
- Kimutattuk, hogy a SOCE normális működéséhez a PM PtdIns4P vagy PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> molekuláinak jelenléte szükséges, ugyanis a kettő lipid együttes csökkentése a folyamat gátlását eredményezi.

## 8 Összefoglalás

A PM PPIs molekulái számos sejtélettani folyamatot szabályoznak. Hatásaik eltérő módon jutnak érvényre, melyek közül ez egyik, hogy negatív töltéseiket felhasználva aspecifikus elektrosztatikus interakciókat alakítanak ki pozitívan töltött aminosavakat tartalmazó fehérjékkel, ezáltal szabályozva azok membránkötését és funkcióját. Munkám során a PM PPIs molekuláinak szerepét vizsgáltam a K- és H-Ras fehérjék PM lokalizációjában és működésében, illetve a SOCE folyamatában, melyet a lipid PM szintjének csökkentésével, majd az arra bekövetkező változások tanulmányozásával értem el.

A Ras fehérjék PM lokalizációja alapvetően fontos a sejtnövekedést kiváltó hatásaik közvetítésében. A fehérjék membránlokalizációjának kialakításában a poszttranszlációs lipid-módosítások játszanak kiemelt szerepet. A H-Ras fehérje palmitoilálódik, így stabil membránkötésre képes, míg a K-Ras esetében a palmitoiláció hiányzik, és az elektrosztatikus kapcsolatok felelnek a PM kötésért. A lipidek PM-szintjének csökkentéséhez egyrészt egy rapamycin-függő heterodimerizációs rendszert használtam, mellyel különböző enzimaktivitással rendelkező PPIs-foszfatazok irányíthatóak a PM-hoz, másrészt hormonok segítségével aktiváltam a PLC enzimet. A fehérjék sejten belüli mozgását konfokális mikroszkóppal, illetve egy általunk kifejlesztett BRET-módszerrel követtem. Méréseimben a PM PPIs depléciója után a K-Ras fehérje a sejt endomembrán rendszereire, főleg a Golgira helyeződött át. Hasonló változást a H-Ras esetében nem tapasztaltam. A PM PPIs molekulái közül a PtdIns4P és a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> jelenléte bizonyult fontosnak, míg a PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> alig, vagy nem vesz részt a folyamatban. A fehérjék mozgása a fehérje intracelluláris diffúziójának gátlásával, a deltarasinnal, vagy a Golgi membránjának szimultán PtdIns4P depléciójával csökkenthető volt. A PM PPIs depléciója csökkentette a K-Ras-t kifejező sejtek [<sup>3</sup>H]-leucin beépülését is, amely a Golgi lokalizációt mutató K-Ras fehérje gátolt szignalizációs képességére utal.

A SOCE folyamatának PPIs függését vizsgálva azt kaptam, hogy a folyamat gátlása csak a PM PtdIns4P és a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> tartalmának együttes depléciója esetén következik be, a lipidszintek önálló csökkentésének nem volt hatása. Ezek alapján elmondható, hogy a PM PPIs molekuláinak kiemelt szabályozó szerepe van a SOCE és sejtek K-Ras szignalizációjának szabályozásában az elektrosztatikus interakciók létrehozása által.



## 9 Summary

The PM PPIs molecules regulate a number of cellular processes. Their effects show up in different manners, for example due to their negatively charged head groups, they can generate aspecific electrostatic interactions with positively charged amino acids of proteins, hereby regulating their membrane attachment and function. In this study, the role of the PM PPIs molecules was investigated in the localization and function of the K- and H-Ras proteins, and in the SOCE, which was achieved by the reduction of the PM levels of the lipids, and monitoring the concomitant changes of this abrogative effect.

PM localization of Ras is crucial for transmitting their proliferating signals upon stimulation, which is achieved by post-translational lipid modification of these proteins. H-Ras becomes palmytoilated, which accounts for the stable membrane connection of these proteins. In the case of K-Ras palmytoilation is lacking, so its PM attachment depends on electrostatic interactions. PPIs depletion from the PM was achieved either by a rapamycin-inducible system in which various PPIs-phosphatases were recruited to the PM or by receptor-induced activation of phospholipase C. Redistribution of the proteins within cells was monitored by confocal microscopy or by a recently developed bioluminescence resonance energy transfer-based approach. We found that PM PPIs depletion caused rapid translocation of K-Ras but not of H-Ras from the PM to the endomembranes of the cell, mostly to the Golgi. PM depletion of either phosphatidylinositol 4-phosphate (PtdIns4P) or PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> but not PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> was sufficient to evoke K-Ras translocation. This effect was diminished by deltarasin, an inhibitor of the Ras–phosphodiesterase interaction, or by simultaneous depletion of the Golgi PtdIns4P. Moreover, PPIs depletion decreased the incorporation of [<sup>3</sup>H]-leucine in K-Ras–expressing cells, suggesting that Golgi-localized K-Ras is not as signaling-competent as its PM-bound form.

The PPIs dependence of SOCE was also investigated. The process could be inhibited by joint depletion of PM PtdIns4P and PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> molecules. On the contrary the separate depletion was totally ineffective in the regulation of this process. Based on these data, the PPIs molecules in the PM are important regulators of SOCE and K-Ras–mediated signals via their role in generation of electrostatic interactions.

## 10 Irodalomjegyzék

1. Cho, W., and Stahelin, R. V. (2005) Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**, 119-151
2. Whited, A. M., and Johs, A. (2015) The interactions of peripheral membrane proteins with biological membranes. *Chem Phys Lipids* **192**, 51-59
3. Resh, M. D. (2013) Covalent lipid modifications of proteins. *Curr Biol* **23**, R431-435
4. Ligeti, E., Welti, S., and Scheffzek, K. (2012) Inhibition and termination of physiological responses by GTPase activating proteins. *Physiol Rev* **92**, 237-272
5. Lavoie, J. N., Landry, M. C., Faure, R. L., and Champagne, C. (2010) Src-family kinase signaling, actin-mediated membrane trafficking and organellar dynamics in the control of cell fate: lessons to be learned from the adenovirus E4orf4 death factor. *Cell Signal* **22**, 1604-1614
6. Reinehr, R., Sommerfeld, A., and Haussinger, D. (2013) The Src family kinases: distinct functions of c-Src, Yes, and Fyn in the liver. *Biomol Concepts* **4**, 129-142
7. Zheng, H., Loh, H. H., and Law, P. Y. (2013) Posttranslation modification of G protein-coupled receptor in relationship to biased agonism. *Methods Enzymol* **522**, 391-408
8. Blaskovic, S., Blanc, M., and van der Goot, F. G. (2013) What does S-palmitoylation do to membrane proteins? *FEBS J* **280**, 2766-2774
9. Fukata, Y., Murakami, T., Yokoi, N., and Fukata, M. (2016) Local Palmitoylation Cycles and Specialized Membrane Domain Organization. *Curr Top Membr* **77**, 97-141
10. Resh, M. D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1451**, 1-16
11. Sinensky, M. (2000) Functional aspects of polyisoprenoid protein substituents: roles in protein-protein interaction and trafficking. *Biochim Biophys Acta* **1529**, 203-209
12. Linder, M. E., and Deschenes, R. J. (2007) Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 74-84
13. Salaun, C., Greaves, J., and Chamberlain, L. H. (2010) The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J Cell Biol* **191**, 1229-1238

14. Cadwallader, K. A., Paterson, H., Macdonald, S. G., and Hancock, J. F. (1994) N-terminally myristoylated Ras proteins require palmitoylation or a polybasic domain for plasma membrane localization. *Mol Cell Biol* **14**, 4722-4730
15. Heinrich, F., Nanda, H., Goh, H. Z., Bachert, C., Losche, M., and Linstedt, A. D. (2014) Myristoylation restricts orientation of the GRASP domain on membranes and promotes membrane tethering. *J Biol Chem* **289**, 9683-9691
16. Peitzsch, R. M., and McLaughlin, S. (1993) Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* **32**, 10436-10443
17. Kay, J. G., Koivusalo, M., Ma, X., Wohland, T., and Grinstein, S. (2012) Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Mol Biol Cell* **23**, 2198-2212
18. Stahelin, R. V., Scott, J. L., and Frick, C. T. (2014) Cellular and molecular interactions of phosphoinositides and peripheral proteins. *Chem Phys Lipids* **182**, 3-18
19. Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A., and Grinstein, S. (2008) Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science* **319**, 210-213
20. McLaughlin, S., and Murray, D. (2005) Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* **438**, 605-611
21. Bond, P. (2017) Phosphatidic acid: biosynthesis, pharmacokinetics, mechanisms of action and effect on strength and body composition in resistance-trained individuals. *Nutr Metab (Lond)* **14**, 12
22. Stahelin, R. V., and Cho, W. (2001) Differential roles of ionic, aliphatic, and aromatic residues in membrane-protein interactions: a surface plasmon resonance study on phospholipases A2. *Biochemistry* **40**, 4672-4678
23. Moravcevic, K., Oxley, C. L., and Lemmon, M. A. (2012) Conditional peripheral membrane proteins: facing up to limited specificity. *Structure* **20**, 15-27
24. Stahelin, R. V., Long, F., Diraviyam, K., Bruzik, K. S., Murray, D., and Cho, W. (2002) Phosphatidylinositol 3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vps27p and Hrs. *J Biol Chem* **277**, 26379-26388
25. He, J., Vora, M., Haney, R. M., Filonov, G. S., Musselman, C. A., Burd, C. G., Kutateladze, A. G., Verkhusha, V. V., Stahelin, R. V., and Kutateladze, T. G. (2009) Membrane insertion of the FYVE domain is modulated by pH. *Proteins* **76**, 852-860

26. Putta, P., Rankenberg, J., Korver, R. A., van Wijk, R., Munnik, T., Testerink, C., and Kooijman, E. E. (2016) Phosphatidic acid binding proteins display differential binding as a function of membrane curvature stress and chemical properties. *Biochim Biophys Acta* **1858**, 2709-2716
27. Payrastre, B., Missy, K., Giuriato, S., Bodin, S., Plantavid, M., and Gratacap, M. (2001) Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space. *Cell Signal* **13**, 377-387
28. Balla, T. (2013) Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev* **93**, 1019-1137
29. De Craene, J. O., Bertazzi, D. L., Bar, S., and Friant, S. (2017) Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways. *Int J Mol Sci* **18**
30. Yamamoto, A., DeWald, D. B., Boronenkov, I. V., Anderson, R. A., Emr, S. D., and Koshland, D. (1995) Novel PI(4)P 5-kinase homologue, Fab1p, essential for normal vacuole function and morphology in yeast. *Mol Biol Cell* **6**, 525-539
31. Wiradjaja, F., Ooms, L. M., Tahirovic, S., Kuhne, E., Devenish, R. J., Munn, A. L., Piper, R. C., Mayinger, P., and Mitchell, C. A. (2007) Inactivation of the phosphoinositide phosphatases Sac1p and Inp54p leads to accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on vacuole membranes and vacuolar fusion defects. *J Biol Chem* **282**, 16295-16307
32. Berridge, M. J. (2014) Cell Signalling Biology, Portland Press Limited, London. Module 2. 2014: 62-64
33. Zhao, H., and Lappalainen, P. (2012) A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein-lipid interactions. *Mol Biol Cell* **23**, 2823-2830
34. Williams, D., Vicogne, J., Zaitseva, I., McLaughlin, S., and Pessin, J. E. (2009) Evidence that electrostatic interactions between vesicle-associated membrane protein 2 and acidic phospholipids may modulate the fusion of transport vesicles with the plasma membrane. *Mol Biol Cell* **20**, 4910-4919
35. Gericke, A., Leslie, N. R., Losche, M., and Ross, A. H. (2013) PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated cell signaling: emerging principles and PTEN as a paradigm for regulatory mechanism. *Adv Exp Med Biol* **991**, 85-104
36. Backer, J. M. (2008) The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* **410**, 1-17

37. Clague, M. J., Urbe, S., and de Lartigue, J. (2009) Phosphoinositides and the endocytic pathway. *Exp Cell Res* **315**, 1627-1631
38. Cao, C., Laporte, J., Backer, J. M., Wandinger-Ness, A., and Stein, M. P. (2007) Myotubularin lipid phosphatase binds the hVPS15/hVPS34 lipid kinase complex on endosomes. *Traffic* **8**, 1052-1067
39. Cao, C., Backer, J. M., Laporte, J., Bedrick, E. J., and Wandinger-Ness, A. (2008) Sequential actions of myotubularin lipid phosphatases regulate endosomal PI(3)P and growth factor receptor trafficking. *Mol Biol Cell* **19**, 3334-3346
40. Amoasii, L., Hnia, K., and Laporte, J. (2012) Myotubularin phosphoinositide phosphatases in human diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* **362**, 209-233
41. Gillooly, D. J., Morrow, I. C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N. J., Gaullier, J. M., Parton, R. G., and Stenmark, H. (2000) Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J* **19**, 4577-4588
42. Schink, K. O., Raiborg, C., and Stenmark, H. (2013) Phosphatidylinositol 3-phosphate, a lipid that regulates membrane dynamics, protein sorting and cell signalling. *Bioessays* **35**, 900-912
43. Balla, A., and Balla, T. (2006) Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. *Trends Cell Biol* **16**, 351-361
44. Liu, Y., and Bankaitis, V. A. (2010) Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease. *Prog Lipid Res* **49**, 201-217
45. Moser von Filseck, J., Vanni, S., Mesmin, B., Antonny, B., and Drin, G. (2015) A phosphatidylinositol-4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes. *Nat Commun* **6**, 6671
46. Moser von Filseck, J., Copic, A., Delfosse, V., Vanni, S., Jackson, C. L., Bourguet, W., and Drin, G. (2015) INTRACELLULAR TRANSPORT. Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate. *Science* **349**, 432-436
47. Blumental-Perry, A., Haney, C. J., Weixel, K. M., Watkins, S. C., Weisz, O. A., and Aridor, M. (2006) Phosphatidylinositol 4-phosphate formation at ER exit sites regulates ER export. *Dev Cell* **11**, 671-682

48. Olkkonen, V. M., and Li, S. (2013) Oxysterol-binding proteins: sterol and phosphoinositide sensors coordinating transport, signaling and metabolism. *Prog Lipid Res* **52**, 529-538
49. De Matteis, M. A., and Rega, L. R. (2015) Endoplasmic reticulum-Golgi complex membrane contact sites. *Curr Opin Cell Biol* **35**, 43-50
50. Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J., Lacas-Gervais, S., Drin, G., and Antonny, B. (2013) A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell* **155**, 830-843
51. Ghai, R., Du, X., Wang, H., Dong, J., Ferguson, C., Brown, A. J., Parton, R. G., Wu, J. W., and Yang, H. (2017) ORP5 and ORP8 bind phosphatidylinositol-4, 5-biphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) and regulate its level at the plasma membrane. *Nat Commun* **8**, 757
52. Weber-Boyvart, M., Zhong, W., Yan, D., and Olkkonen, V. M. (2013) Oxysterol-binding proteins: functions in cell regulation beyond lipid metabolism. *Biochem Pharmacol* **86**, 89-95
53. Raess, M. A., Friant, S., Cowling, B. S., and Laporte, J. (2017) WANTED - Dead or alive: Myotubularins, a large disease-associated protein family. *Adv Biol Regul* **63**, 49-58
54. Sasaki, T., Takasuga, S., Sasaki, J., Kofuji, S., Eguchi, S., Yamazaki, M., and Suzuki, A. (2009) Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog Lipid Res* **48**, 307-343
55. Roberts, H. F., Clarke, J. H., Letcher, A. J., Irvine, R. F., and Hinchliffe, K. A. (2005) Effects of lipid kinase expression and cellular stimuli on phosphatidylinositol 5-phosphate levels in mammalian cell lines. *FEBS Lett* **579**, 2868-2872
56. Gozani, O., Karuman, P., Jones, D. R., Ivanov, D., Cha, J., Lugovskoy, A. A., Baird, C. L., Zhu, H., Field, S. J., Lessnick, S. L., Villasenor, J., Mehrotra, B., Chen, J., Rao, V. R., Brugge, J. S., Ferguson, C. G., Payrastre, B., Myszka, D. G., Cantley, L. C., Wagner, G., Divecha, N., Prestwich, G. D., and Yuan, J. (2003) The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* **114**, 99-111

57. Bae, Y. H., Ding, Z., Das, T., Wells, A., Gertler, F., and Roy, P. (2010) Profilin1 regulates PI(3,4)P2 and lamellipodin accumulation at the leading edge thus influencing motility of MDA-MB-231 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 21547-21552
58. Posor, Y., Eichhorn-Gruenig, M., Puchkov, D., Schoneberg, J., Ullrich, A., Lampe, A., Muller, R., ZARBakhsh, S., Gulluni, F., Hirsch, E., Krauss, M., Schultz, C., Schmoranzler, J., Noe, F., and Haucke, V. (2013) Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature* **499**, 233-237
59. Watt, S. A., Kimber, W. A., Fleming, I. N., Leslie, N. R., Downes, C. P., and Lucocq, J. M. (2004) Detection of novel intracellular agonist responsive pools of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate using the TAPP1 pleckstrin homology domain in immunoelectron microscopy. *Biochem J* **377**, 653-663
60. Misawa, H., Ohtsubo, M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., and Yoshimura, A. (1998) Cloning and characterization of a novel class II phosphoinositide 3-kinase containing C2 domain. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 531-539
61. Sasaki, J., Kofuji, S., Itoh, R., Momiyama, T., Takayama, K., Murakami, H., Chida, S., Tsuya, Y., Takasuga, S., Eguchi, S., Asanuma, K., Horie, Y., Miura, K., Davies, E. M., Mitchell, C., Yamazaki, M., Hirai, H., Takenawa, T., Suzuki, A., and Sasaki, T. (2010) The PtdIns(3,4)P(2) phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death. *Nature* **465**, 497-501
62. Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651-657
63. Takatori, S., Tatematsu, T., Cheng, J., Matsumoto, J., Akano, T., and Fujimoto, T. (2016) Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate-Rich Membrane Domains in Endosomes and Lysosomes. *Traffic* **17**, 154-167
64. Shisheva, A. (2008) PIKfyve: Partners, significance, debates and paradoxes. *Cell Biol Int* **32**, 591-604
65. Odorizzi, G., Babst, M., and Emr, S. D. (1998) Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell* **95**, 847-858
66. Shen, J., Yu, W. M., Brotto, M., Scherman, J. A., Guo, C., Stoddard, C., Nosek, T. M., Valdivia, H. H., and Qu, C. K. (2009) Deficiency of MIP/MTMR14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca(2+) homeostasis. *Nat Cell Biol* **11**, 769-776

67. Watt, S. A., Kular, G., Fleming, I. N., Downes, C. P., and Lucocq, J. M. (2002) Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem J* **363**, 657-666
68. Ishihara, H., Shibasaki, Y., Kizuki, N., Wada, T., Yazaki, Y., Asano, T., and Oka, Y. (1998) Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. *J Biol Chem* **273**, 8741-8748
69. Bunce, M. W., Boronenkov, I. V., and Anderson, R. A. (2008) Coordinated activation of the nuclear ubiquitin ligase Cul3-SPOP by the generation of phosphatidylinositol 5-phosphate. *J Biol Chem* **283**, 8678-8686
70. Clarke, J. H., Emson, P. C., and Irvine, R. F. (2008) Localization of phosphatidylinositol phosphate kinase IIgamma in kidney to a membrane trafficking compartment within specialized cells of the nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F1422-1430
71. Hsu, F., and Mao, Y. (2015) The structure of phosphoinositide phosphatases: Insights into substrate specificity and catalysis. *Biochim Biophys Acta* **1851**, 698-710
72. Santarius, M., Lee, C. H., and Anderson, R. A. (2006) Supervised membrane swimming: small G-protein lifeguards regulate PIPK signalling and monitor intracellular PtdIns(4,5)P2 pools. *Biochem J* **398**, 1-13
73. Wu, Z., Li, X., Sunkara, M., Spearman, H., Morris, A. J., and Huang, C. (2011) PIPKIgamma regulates focal adhesion dynamics and colon cancer cell invasion. *PLoS One* **6**, e24775
74. Frazier, M. N., and Jackson, L. P. (2017) Watching real-time endocytosis in living cells. *J Cell Biol* **216**, 9-11
75. Toth, D. J., Toth, J. T., Gulyas, G., Balla, A., Balla, T., Hunyady, L., and Varnai, P. (2012) Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *J Cell Sci* **125**, 2185-2197
76. Liscovitch, M., Chalifa, V., Pertile, P., Chen, C. S., and 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



77. Huang, C. L., Feng, S., and Hilgemann, D. W. (1998) Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP<sub>2</sub> and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* **391**, 803-806
78. Matsushita, Y., Ohya, S., Suzuki, Y., Itoda, H., Kimura, T., Yamamura, H., and Imaizumi, Y. (2009) Inhibition of Kv1.3 potassium current by phosphoinositides and stromal-derived factor-1alpha in Jurkat T cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, C1079-1085
79. Milne, S. B., Ivanova, P. T., DeCamp, D., Hsueh, R. C., and Brown, H. A. (2005) A targeted mass spectrometric analysis of phosphatidylinositol phosphate species. *J Lipid Res* **46**, 1796-1802
80. Bayascas, J. R., Wullschleger, S., Sakamoto, K., Garcia-Martinez, J. M., Clacher, C., Komander, D., van Aalten, D. M., Boini, K. M., Lang, F., Lipina, C., Logie, L., Sutherland, C., Chudek, J. A., van Diepen, J. A., Voshol, P. J., Lucocq, J. M., and Alessi, D. R. (2008) Mutation of the PDK1 PH domain inhibits protein kinase B/Akt, leading to small size and insulin resistance. *Mol Cell Biol* **28**, 3258-3272
81. Lemmon, M. A. (2003) Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* **4**, 201-213
82. Andreotti, A. H., Schwartzberg, P. L., Joseph, R. E., and Berg, L. J. (2010) T-cell signaling regulated by the Tec family kinase, Itk. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a002287
83. Rawlings, D. J., and Witte, O. N. (1995) The Btk subfamily of cytoplasmic tyrosine kinases: structure, regulation and function. *Semin Immunol* **7**, 237-246
84. Bender, A. T., Gardberg, A., Pereira, A., Johnson, T., Wu, Y., Grenningloh, R., Head, J., Morandi, F., Haselmayer, P., and Liu-Bujalski, L. (2017) Ability of Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors to Sequester Y551 and Prevent Phosphorylation Determines Potency for Inhibition of Fc Receptor but not B-Cell Receptor Signaling. *Mol Pharmacol* **91**, 208-219
85. Boyle, K. B., Gyori, D., Sindrilaru, A., Scharffetter-Kochanek, K., Taylor, P. R., Mocsai, A., Stephens, L. R., and Hawkins, P. T. (2011) Class IA phosphoinositide 3-kinase beta and delta regulate neutrophil oxidase activation in response to *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J Immunol* **186**, 2978-2989
86. Hilpela, P., Vartiainen, M. K., and Lappalainen, P. (2004) Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P<sub>2</sub> and PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. *Curr Top Microbiol Immunol* **282**, 117-163

87. Berridge, M. J., and Irvine, R. F. (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315-321
88. Ling, Y., Stefan, C. J., Macgurn, J. A., Audhya, A., and Emr, S. D. (2012) The dual PH domain protein Opy1 functions as a sensor and modulator of PtdIns(4,5)P(2) synthesis. *EMBO J* **31**, 2882-2894
89. Balla, A., Kim, Y. J., Varnai, P., Szentpetery, Z., Knight, Z., Shokat, K. M., and Balla, T. (2008) Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase IIIalpha. *Mol Biol Cell* **19**, 711-721
90. Toth, J. T., Gulyas, G., Toth, D. J., Balla, A., Hammond, G. R., Hunyady, L., Balla, T., and Varnai, P. (2016) BRET-monitoring of the dynamic changes of inositol lipid pools in living cells reveals a PKC-dependent PtdIns4P increase upon EGF and M3 receptor activation. *Biochim Biophys Acta* **1861**, 177-187
91. Falkenburger, B. H., Jensen, J. B., and Hille, B. (2010) Kinetics of PIP2 metabolism and KCNQ2/3 channel regulation studied with a voltage-sensitive phosphatase in living cells. *J Gen Physiol* **135**, 99-114
92. Bojjireddy, N., Botyanszki, J., Hammond, G., Creech, D., Peterson, R., Kemp, D. C., Snead, M., Brown, R., Morrison, A., Wilson, S., Harrison, S., Moore, C., and Balla, T. (2014) Pharmacological and genetic targeting of the PI4KA enzyme reveals its important role in maintaining plasma membrane phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels. *J Biol Chem* **289**, 6120-6132
93. Nakanishi, H., Brewer, K. A., and Exton, J. H. (1993) Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **268**, 13-16
94. Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208
95. Papke, B., and Der, C. J. (2017) Drugging RAS: Know the enemy. *Science* **355**, 1158-1163
96. Buday, L., and Downward, J. (1993) Epidermal growth factor regulates the exchange rate of guanine nucleotides on p21ras in fibroblasts. *Mol Cell Biol* **13**, 1903-1910

97. Buday, L., and Downward, J. (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* **73**, 611-620
98. Buday, L., and Downward, J. (2008) Many faces of Ras activation. *Biochim Biophys Acta* **1786**, 178-187
99. Mitin, N., Rossman, K. L., and Der, C. J. (2005) Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol* **15**, R563-574
100. Bos, J. L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865-877
101. Gremer, L., Gilsbach, B., Ahmadian, M. R., and Wittinghofer, A. (2008) Fluoride complexes of oncogenic Ras mutants to study the Ras-RasGap interaction. *Biol Chem* **389**, 1163-1171
102. Prior, I. A., Lewis, P. D., and Mattos, C. (2012) A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* **72**, 2457-2467
103. Stacey, D. W., Feig, L. A., and Gibbs, J. B. (1991) Dominant inhibitory Ras mutants selectively inhibit the activity of either cellular or oncogenic Ras. *Mol Cell Biol* **11**, 4053-4064
104. Nassar, N., Singh, K., and Garcia-Diaz, M. (2010) Structure of the dominant negative S17N mutant of Ras. *Biochemistry* **49**, 1970-1974
105. Cox, A. D., Der, C. J., and Philips, M. R. (2015) Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery? *Clin Cancer Res* **21**, 1819-1827
106. Hancock, J. F., Paterson, H., and Marshall, C. J. (1990) A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **63**, 133-139
107. Tsai, F. D., Lopes, M. S., Zhou, M., Court, H., Ponce, O., Fiordalisi, J. J., Gierut, J. J., Cox, A. D., Haigis, K. M., and Philips, M. R. (2015) K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 779-784
108. Willumsen, B. M., Christensen, A., Hubbert, N. L., Papageorge, A. G., and Lowy, D. R. (1984) The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* **310**, 583-586

109. Silvius, J. R., Bhagatji, P., Leventis, R., and Terrone, D. (2006) K-ras4B and prenylated proteins lacking "second signals" associate dynamically with cellular membranes. *Mol Biol Cell* **17**, 192-202
110. Choy, E., Chiu, V. K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I. E., and Philips, M. R. (1999) Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* **98**, 69-80
111. Apolloni, A., Prior, I. A., Lindsay, M., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2000) H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol* **20**, 2475-2487
112. Dai, Q., Choy, E., Chiu, V., Romano, J., Slivka, S. R., Steitz, S. A., Michaelis, S., and Philips, M. R. (1998) Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **273**, 15030-15034
113. Swarthout, J. T., Lobo, S., Farh, L., Croke, M. R., Greentree, W. K., Deschenes, R. J., and Linder, M. E. (2005) DHHC9 and GCP16 constitute a human protein fatty acyltransferase with specificity for H- and N-Ras. *J Biol Chem* **280**, 31141-31148
114. Goodwin, J. S., Drake, K. R., Rogers, C., Wright, L., Lippincott-Schwartz, J., Philips, M. R., and Kenworthy, A. K. (2005) Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J Cell Biol* **170**, 261-272
115. Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Balan, E., and Kloog, Y. (2004) Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J Biol Chem* **279**, 34922-34930
116. Belanis, L., Plowman, S. J., Rotblat, B., Hancock, J. F., and Kloog, Y. (2008) Galectin-1 is a novel structural component and a major regulator of h-ras nanoclusters. *Mol Biol Cell* **19**, 1404-1414
117. Ashery, U., Yizhar, O., Rotblat, B., Elad-Sfadia, G., Barkan, B., Haklai, R., and Kloog, Y. (2006) Spatiotemporal organization of Ras signaling: rasosomes and the galectin switch. *Cell Mol Neurobiol* **26**, 471-495
118. Chandra, A., Grecco, H. E., Pisupati, V., Perera, D., Cassidy, L., Skoulidis, F., Ismail, S. A., Hedberg, C., Hanzal-Bayer, M., Venkitaraman, A. R., Wittinghofer, A., and Bastiaens, P. I. (2011) The GDI-like solubilizing factor PDEdelta sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nat Cell Biol* **14**, 148-158

119. Zimmermann, G., Papke, B., Ismail, S., Vartak, N., Chandra, A., Hoffmann, M., Hahn, S. A., Triola, G., Wittinghofer, A., Bastiaens, P. I., and Waldmann, H. (2013) Small molecule inhibition of the KRAS-PDEdelta interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* **497**, 638-642
120. Ong, S. H., Hadari, Y. R., Gotoh, N., Guy, G. R., Schlessinger, J., and Lax, I. (2001) Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6074-6079
121. Engelman, J. A., Luo, J., and Cantley, L. C. (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* **7**, 606-619
122. Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D. M. (2003) GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* **11**, 895-904
123. Nimnual, A. S., Yatsula, B. A., and Bar-Sagi, D. (1998) Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* **279**, 560-563
124. Morrison, D. K., and Cutler, R. E. (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 174-179
125. Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R., and Avruch, J. (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**, 417-421
126. Crews, C. M., and Erikson, R. L. (1992) Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast *byr1* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8205-8209
127. Suzuki, T., J, K. T., Ajima, R., Nakamura, T., Yoshida, Y., and Yamamoto, T. (2002) Phosphorylation of three regulatory serines of Tob by Erk1 and Erk2 is required for Ras-mediated cell proliferation and transformation. *Genes Dev* **16**, 1356-1370
128. Claperon, A., and Therrien, M. (2007) KSR and CNK: two scaffolds regulating RAS-mediated RAF activation. *Oncogene* **26**, 3143-3158

129. Hofer, F., Fields, S., Schneider, C., and Martin, G. S. (1994) Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11089-11093
130. Goldfinger, L. E., and Michael, J. V. (2017) Regulation of Ras signaling and function by plasma membrane microdomains. *Biosci Trends* **11**, 23-40
131. Gentry, L. R., Martin, T. D., Reiner, D. J., and Der, C. J. (2014) Ral small GTPase signaling and oncogenesis: More than just 15minutes of fame. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 2976-2988
132. Gentry, L. R., Nishimura, A., Cox, A. D., Martin, T. D., Tsygankov, D., Nishida, M., Elston, T. C., and Der, C. J. (2015) Divergent roles of CAAX motif-signaled posttranslational modifications in the regulation and subcellular localization of Ral GTPases. *J Biol Chem* **290**, 22851-22861
133. Moskalenko, S., Henry, D. O., Rosse, C., Mirey, G., Camonis, J. H., and White, M. A. (2002) The exocyst is a Ral effector complex. *Nat Cell Biol* **4**, 66-72
134. Jullien-Flores, V., Mahe, Y., Mirey, G., Leprince, C., Meunier-Bisceuil, B., Sorkin, A., and Camonis, J. H. (2000) RLIP76, an effector of the GTPase Ral, interacts with the AP2 complex: involvement of the Ral pathway in receptor endocytosis. *J Cell Sci* **113** ( Pt 16), 2837-2844
135. Jullien-Flores, V., Dorseuil, O., Romero, F., Letourneur, F., Saragosti, S., Berger, R., Tavitian, A., Gacon, G., and Camonis, J. H. (1995) Bridging Ral GTPase to Rho pathways. RLIP76, a Ral effector with CDC42/Rac GTPase-activating protein activity. *J Biol Chem* **270**, 22473-22477
136. Neel, N. F., Martin, T. D., Stratford, J. K., Zand, T. P., Reiner, D. J., and Der, C. J. (2011) The RalGEF-Ral Effector Signaling Network: The Road Less Traveled for Anti-Ras Drug Discovery. *Genes Cancer* **2**, 275-287
137. Sidhu, R. S., Clough, R. R., and Bhullar, R. P. (2005) Regulation of phospholipase C-delta1 through direct interactions with the small GTPase Ral and calmodulin. *J Biol Chem* **280**, 21933-21941
138. Luo, J. Q., Liu, X., Hammond, S. M., Colley, W. C., Feig, L. A., Frohman, M. A., Morris, A. J., and Foster, D. A. (1997) RalA interacts directly with the Arf-responsive, PIP2-dependent phospholipase D1. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 854-859

139. Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr., and Meyer, T. (2005) STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol* **15**, 1235-1241
140. Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., and Rao, A. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179-185
141. Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J. P. (2006) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science* **312**, 1220-1223
142. Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K. A., and Cahalan, M. D. (2006) Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9357-9362
143. Parekh, A. B., and Putney, J. W., Jr. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* **85**, 757-810
144. Williams, R. T., Manji, S. S., Parker, N. J., Hancock, M. S., Van Stekelenburg, L., Eid, J. P., Senior, P. V., Kazenwadel, J. S., Shandala, T., Saint, R., Smith, P. J., and Dziadek, M. A. (2001) Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J* **357**, 673-685
145. Zheng, L., Stathopoulos, P. B., Li, G. Y., and Ikura, M. (2008) Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca<sup>2+</sup> sensory region of STIM1 and STIM2. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 240-246
146. Brandman, O., Liou, J., Park, W. S., and Meyer, T. (2007) STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> levels. *Cell* **131**, 1327-1339
147. Stathopoulos, P. B., Zheng, L., Li, G. Y., Plevin, M. J., and Ikura, M. (2008) Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry. *Cell* **135**, 110-122
148. Ong, H. L., Cheng, K. T., Liu, X., Bandyopadhyay, B. C., Paria, B. C., Soboloff, J., Pani, B., Gwack, Y., Srikanth, S., Singh, B. B., Gill, D. L., and Ambudkar, I. S. (2007) Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-

operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *J Biol Chem* **282**, 9105-9116

149. Varnai, P., Toth, B., Toth, D. J., Hunyady, L., and Balla, T. (2007) Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 Complex. *J Biol Chem* **282**, 29678-29690

150. Prakriya, M., and Lewis, R. S. (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* **95**, 1383-1436

151. Feske, S., Giltzane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L. M., and Rao, A. (2001) Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* **2**, 316-324

152. Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K. C., Dolmetsch, R. E., and Lewis, R. S. (2009) STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* **136**, 876-890

153. Zhou, Y., Meraner, P., Kwon, H. T., Machnes, D., Oh-hora, M., Zimmer, J., Huang, Y., Stura, A., Rao, A., and Hogan, P. G. (2010) STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 in vitro. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 112-116

154. McNally, B. A., Somasundaram, A., Jairaman, A., Yamashita, M., and Prakriya, M. (2013) The C- and N-terminal STIM1 binding sites on Orai1 are required for both trapping and gating CRAC channels. *J Physiol* **591**, 2833-2850

155. Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Hendron, E., Mancarella, S., Andrade, M. D., Rothberg, B. S., Soboloff, J., and Gill, D. L. (2014) Distinct Orai-coupling domains in STIM1 and STIM2 define the Orai-activating site. *Nat Commun* **5**, 3183

156. Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., and Meyer, T. (2007) Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca<sup>2+</sup> store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9301-9306

157. Li, Z., Lu, J., Xu, P., Xie, X., Chen, L., and Xu, T. (2007) Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel activation. *J Biol Chem* **282**, 29448-29456

158. Bhardwaj, R., Muller, H. M., Nickel, W., and Seedorf, M. (2013) Oligomerization and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin control binding of the ER Ca<sup>2+</sup>-sensors STIM1 and STIM2 to plasma membrane lipids. *Biosci Rep* **33**



159. Walsh, C. M., Chvanov, M., Haynes, L. P., Petersen, O. H., Tepikin, A. V., and Burgoyne, R. D. (2009) Role of phosphoinositides in STIM1 dynamics and store-operated calcium entry. *Biochem J* **425**, 159-168
160. Korzeniowski, M. K., Popovic, M. A., Szentpetery, Z., Varnai, P., Stojilkovic, S. S., and Balla, T. (2009) Dependence of STIM1/Orai1-mediated calcium entry on plasma membrane phosphoinositides. *J Biol Chem* **284**, 21027-21035
161. Hunyady, L., Bor, M., Balla, T., and Catt, K. J. (1994) Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor. *J Biol Chem* **269**, 31378-31382
162. Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., and Tsien, R. Y. (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913-916
163. Johnson, C. M., Chichili, G. R., and Rodgers, W. (2008) Compartmentalization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signaling evidenced using targeted phosphatases. *J Biol Chem* **283**, 29920-29928
164. Wright, L. P., and Philips, M. R. (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res* **47**, 883-891
165. Woo, J., and von Arnim, A. G. (2008) Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from Renilla. *Plant Methods* **4**, 23
166. Szentpetery, Z., Varnai, P., and Balla, T. (2010) Acute manipulation of Golgi phosphoinositides to assess their importance in cellular trafficking and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 8225-8230
167. Balla, T., Bondeva, T., and Varnai, P. (2000) How accurately can we image inositol lipids in living cells? *Trends Pharmacol Sci* **21**, 238-241
168. Gulyas, G., Toth, J. T., Toth, D. J., Kurucz, I., Hunyady, L., Balla, T., and Varnai, P. (2015) Measurement of inositol 1,4,5-trisphosphate in living cells using an improved set of resonance energy transfer-based biosensors. *PLoS One* **10**, e0125601
169. Gulyas, G., Radvanszki, G., Matuska, R., Balla, A., Hunyady, L., Balla, T., and Varnai, P. (2017) Plasma membrane phosphatidylinositol 4-phosphate and 4,5-bisphosphate determine the distribution and function of K-Ras4B but not H-Ras proteins. *J Biol Chem* **292**, 18862-18877

170. Heo, W. D., Inoue, T., Park, W. S., Kim, M. L., Park, B. O., Wandless, T. J., and Meyer, T. (2006) PI(3,4,5)P<sub>3</sub> and PI(4,5)P<sub>2</sub> lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* **314**, 1458-1461
171. Szakadati, G., Toth, A. D., Olah, I., Erdelyi, L. S., Balla, T., Varnai, P., Hunyady, L., and Balla, A. (2015) Investigation of the fate of type I angiotensin receptor after biased activation. *Mol Pharmacol* **87**, 972-981
172. Varnai, P., Thyagarajan, B., Rohacs, T., and Balla, T. (2006) Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. *J Cell Biol* **175**, 377-382
173. Hammond, G. R., Fischer, M. J., Anderson, K. E., Holdich, J., Koteci, A., Balla, T., and Irvine, R. F. (2012) PI4P and PI(4,5)P<sub>2</sub> are essential but independent lipid determinants of membrane identity. *Science* **337**, 727-730
174. Hammond, G. R., Machner, M. P., and Balla, T. (2014) A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi. *J Cell Biol* **205**, 113-126
175. Varnai, P., and Balla, T. (1998) Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[<sup>3</sup>H]inositol-labeled phosphoinositide pools. *J Cell Biol* **143**, 501-510
176. Varnai, P., Rother, K. I., and Balla, T. (1999) Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. *J Biol Chem* **274**, 10983-10989
177. Varnai, P., Gulyas, G., Toth, D. J., Sohn, M., Sengupta, N., and Balla, T. (2017) Quantifying lipid changes in various membrane compartments using lipid binding protein domains. *Cell Calcium* **64**, 72-82
178. Papke, B., Murarka, S., Vogel, H. A., Martin-Gago, P., Kovacevic, M., Truxius, D. C., Fansa, E. K., Ismail, S., Zimmermann, G., Heinelt, K., Schultz-Fademrecht, C., Al Saabi, A., Baumann, M., Nussbaumer, P., Wittinghofer, A., Waldmann, H., and Bastiaens, P. I. (2016) Identification of pyrazolopyridazinones as PDE $\delta$  inhibitors. *Nat Commun* **7**, 11360

179. Schmick, M., Vartak, N., Papke, B., Kovacevic, M., Truxius, D. C., Rossmannek, L., and Bastiaens, P. I. (2014) KRas localizes to the plasma membrane by spatial cycles of solubilization, trapping and vesicular transport. *Cell* **157**, 459-471
180. Bar-Sagi, D., and Hall, A. (2000) Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* **103**, 227-238
181. Zhou, Y., and Hancock, J. F. (2015) Ras nanoclusters: Versatile lipid-based signaling platforms. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 841-849
182. Yeung, T., Terebiznik, M., Yu, L., Silvius, J., Abidi, W. M., Philips, M., Levine, T., Kapus, A., and Grinstein, S. (2006) Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis. *Science* **313**, 347-351
183. Balla, A., Tuymetova, G., Toth, B., Szentpetery, Z., Zhao, X., Knight, Z. A., Shokat, K., Steinbach, P. J., and Balla, T. (2008) Design of drug-resistant alleles of type-III phosphatidylinositol 4-kinases using mutagenesis and molecular modeling. *Biochemistry* **47**, 1599-1607
184. Fujita, A., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Takenawa, T., and Fujimoto, T. (2009) A distinct pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9256-9261
185. Bigay, J., and Antonny, B. (2012) Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Dev Cell* **23**, 886-895
186. Gregory, M. C., McLean, M. A., and Sligar, S. G. (2017) Interaction of KRas4b with anionic membranes: A special role for PIP2. *Biochem Biophys Res Commun* **487**, 351-355
187. Cho, K. J., Park, J. H., Piggott, A. M., Salim, A. A., Gorfe, A. A., Parton, R. G., Capon, R. J., Lacey, E., and Hancock, J. F. (2012) Staurosporines disrupt phosphatidylserine trafficking and mislocalize Ras proteins. *J Biol Chem* **287**, 43573-43584
188. van der Hoeven, D., Cho, K. J., Ma, X., Chigurupati, S., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2013) Fendiline inhibits K-Ras plasma membrane localization and blocks K-Ras signal transmission. *Mol Cell Biol* **33**, 237-251
189. Gelabert-Baldrich, M., Soriano-Castell, D., Calvo, M., Lu, A., Vina-Vilaseca, A., Rentero, C., Pol, A., Grinstein, S., Enrich, C., and Tebar, F. (2014) Dynamics of KRas

on endosomes: involvement of acidic phospholipids in its association. *FASEB J* **28**, 3023-3037

190. Cho, K. J., van der Hoeven, D., Zhou, Y., Maekawa, M., Ma, X., Chen, W., Fairn, G. D., and Hancock, J. F. (2015) Inhibition of Acid Sphingomyelinase Depletes Cellular Phosphatidylserine and Mislocalizes K-Ras from the Plasma Membrane. *Mol Cell Biol* **36**, 363-374

191. Peterson, M. W., and Walter, M. E. (1992) Calcium-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase C and D in MDCK epithelial cells. *Am J Physiol* **263**, C1216-1224

192. Chung, J., Torta, F., Masai, K., Lucast, L., Czapla, H., Tanner, L. B., Narayanaswamy, P., Wenk, M. R., Nakatsu, F., and De Camilli, P. (2015) INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science* **349**, 428-432

193. McLaughlin, S., and Aderem, A. (1995) The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci* **20**, 272-276

194. Thelen, M., Rosen, A., Nairn, A. C., and Aderem, A. (1991) Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* **351**, 320-322

195. Bivona, T. G., Quatela, S. E., Bodemann, B. O., Ahearn, I. M., Soskis, M. J., Mor, A., Miura, J., Wiener, H. H., Wright, L., Saba, S. G., Yim, D., Fein, A., Perez de Castro, I., Li, C., Thompson, C. B., Cox, A. D., and Philips, M. R. (2006) PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol Cell* **21**, 481-493

196. Chiu, V. K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J. B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R. L., 2nd, Cox, A. D., and Philips, M. R. (2002) Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol* **4**, 343-350

197. Balla, A., Erdelyi, L. S., Soltesz-Katona, E., Balla, T., Varnai, P., and Hunyady, L. (2011) Demonstration of angiotensin II-induced Ras activation in the trans-Golgi network and endoplasmic reticulum using bioluminescence resonance energy transfer-based biosensors. *J Biol Chem* **286**, 5319-5327

198. Jin, T., Ding, Q., Huang, H., Xu, D., Jiang, Y., Zhou, B., Li, Z., Jiang, X., He, J., Liu, W., Zhang, Y., Pan, Y., Wang, Z., Thomas, W. G., and Chen, Y. (2012) PAQR10 and PAQR11 mediate Ras signaling in the Golgi apparatus. *Cell Res* **22**, 661-676
199. Lorenzo, P. S., Kung, J. W., Bottorff, D. A., Garfield, S. H., Stone, J. C., and Blumberg, P. M. (2001) Phorbol esters modulate the Ras exchange factor RasGRP3. *Cancer Res* **61**, 943-949
200. Caloca, M. J., Zugaza, J. L., and Bustelo, X. R. (2003) Exchange factors of the RasGRP family mediate Ras activation in the Golgi. *J Biol Chem* **278**, 33465-33473
201. Lu, S., Jang, H., Muratcioglu, S., Gursoy, A., Keskin, O., Nussinov, R., and Zhang, J. (2016) Ras Conformational Ensembles, Allostery, and Signaling. *Chem Rev* **116**, 6607-6665
202. Varma, S., and Khandelwal, R. L. (2007) Effects of rapamycin on cell proliferation and phosphorylation of mTOR and p70(S6K) in HepG2 and HepG2 cells overexpressing constitutively active Akt/PKB. *Biochim Biophys Acta* **1770**, 71-78
203. Calimeri, T., and Ferreri, A. J. (2017) m-TOR inhibitors and their potential role in haematological malignancies. *Br J Haematol*
204. Koveal, D., Schuh-Nuhfer, N., Ritt, D., Page, R., Morrison, D. K., and Peti, W. (2012) A CC-SAM, for coiled coil-sterile alpha motif, domain targets the scaffold KSR-1 to specific sites in the plasma membrane. *Sci Signal* **5**, ra94
205. Falsetti, S. C., Wang, D. A., Peng, H., Carrico, D., Cox, A. D., Der, C. J., Hamilton, A. D., and Sebti, S. M. (2007) Geranylgeranyltransferase I inhibitors target RalB to inhibit anchorage-dependent growth and induce apoptosis and RalA to inhibit anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol* **27**, 8003-8014
206. Maleth, J., Choi, S., Muallem, S., and Ahuja, M. (2014) Translocation between PI(4,5)P2-poor and PI(4,5)P2-rich microdomains during store depletion determines STIM1 conformation and Orai1 gating. *Nat Commun* **5**, 5843
207. Jing, J., He, L., Sun, A., Quintana, A., Ding, Y., Ma, G., Tan, P., Liang, X., Zheng, X., Chen, L., Shi, X., Zhang, S. L., Zhong, L., Huang, Y., Dong, M. Q., Walker, C. L., Hogan, P. G., Wang, Y., and Zhou, Y. (2015) Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca(2)(+) influx. *Nat Cell Biol* **17**, 1339-1347
208. Quintana, A., Rajanikanth, V., Farber-Katz, S., Gudlur, A., Zhang, C., Jing, J., Zhou, Y., Rao, A., and Hogan, P. G. (2015) TMEM110 regulates the maintenance and

remodeling of mammalian ER-plasma membrane junctions competent for STIM-ORAI signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E7083-7092

209. Calloway, N., Owens, T., Corwith, K., Rodgers, W., Holowka, D., and Baird, B. (2011) Stimulated association of STIM1 and Orai1 is regulated by the balance of PtdIns(4,5)P(2) between distinct membrane pools. *J Cell Sci* **124**, 2602-2610

210. Sharma, S., Quintana, A., Findlay, G. M., Mettlen, M., Baust, B., Jain, M., Nilsson, R., Rao, A., and Hogan, P. G. (2013) An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Nature* **499**, 238-242

211. Cao, X., Choi, S., Maleth, J. J., Park, S., Ahuja, M., and Muallem, S. (2015) The ER/PM microdomain, PI(4,5)P(2) and the regulation of STIM1-Orai1 channel function. *Cell Calcium* **58**, 342-348

212. Carrasco, S., and Meyer, T. (2011) STIM proteins and the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Annu Rev Biochem* **80**, 973-1000

213. Derler, I., Jardin, I., Stathopoulos, P. B., Muik, M., Fahrner, M., Zayats, V., Pandey, S. K., Poteser, M., Lackner, B., Absolonova, M., Schindl, R., Groschner, K., Etrich, R., Ikura, M., and Romanin, C. (2016) Cholesterol modulates Orai1 channel function. *Sci Signal* **9**, ra10

214. Pacheco, J., Dominguez, L., Bohorquez-Hernandez, A., Asanov, A., and Vaca, L. (2016) A cholesterol-binding domain in STIM1 modulates STIM1-Orai1 physical and functional interactions. *Sci Rep* **6**, 29634

215. Maekawa, M., and Fairn, G. D. (2015) Complementary probes reveal that phosphatidylserine is required for the proper transbilayer distribution of cholesterol. *J Cell Sci* **128**, 1422-1433

## 11 Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**Gulyas, G.**, Radvanszki, G., Matuska, R., Balla, A., Hunyady, L., Balla, T., and Varnai, P. (2017) Plasma membrane phosphatidylinositol 4-phosphate and 4,5-bisphosphate determine the distribution and function of K-Ras4B but not H-Ras proteins. *J Biol Chem* 292, 18862-18877 **IF: 4,125**

**Gulyas, G.\***, Toth, J. T.\*, Toth, D. J., Kurucz, I., Hunyady, L., Balla, T., and Varnai, P. (2015) Measurement of inositol 1,4,5-trisphosphate in living cells using an improved set of resonance energy transfer-based biosensors. *PLoS One* 10, e0125601 **IF: 3,057**  
(\* megosztott elsőszerezős közlemény)

### Egyéb közlemények:

Varnai, P., **Gulyas, G.**, Toth, D. J., Sohn, M., Sengupta, N., and Balla, T. (2017) Quantifying lipid changes in various membrane compartments using lipid binding protein domains. *Cell Calcium* 64, 72-82 **IF: 3,707** (összefoglaló közlemény)

Toth, J. T., **Gulyas, G.**, Toth, D. J., Balla, A., Hammond, G. R., Hunyady, L., Balla, T., and Varnai, P. (2016) BRET-monitoring of the dynamic changes of inositol lipid pools in living cells reveals a PKC-dependent PtdIns4P increase upon EGF and M3 receptor activation. *Biochim Biophys Acta* 1861, 177-187 **IF: 5,547**

Toth, D. J., Toth, J. T., **Gulyas, G.**, Balla, A., Balla, T., Hunyady, L., and Varnai, P. (2012) Acute depletion of plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate impairs specific steps in endocytosis of the G-protein-coupled receptor. *J Cell Sci* 125, 2185-2197 **IF: 5,877**

## 12 Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Prof. Várnai Péternek szeretném megköszönni, hogy annak idején laborjába fogadott TDK-hallgatóként, bevezetett a tudomány és a kutatás világába. Az évek során végtelen türelmet és megértést tanúsított felém, ami nem lehetett mindig egyszerű, amikor a fejemben cikázó új gondolatokat, a teljes átgondoltság hiányában megosztottam vele. Ajtaja mindig nyitva állt előttem, igazi segítő kezet nyújtott, ha arra volt szükségem, de azt is pontosan tudta mindig, hogy mikor kell szenvednem egy kicsit a tanulás és a fejlődés érdekében. A kapcsolatunk az évek során baráti alakult, amely a közös sörözésekben, illetve a közös dödöllekészítésben csúcspontot ért el a labor munkatársainak legnagyobb meglepetésére.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet igazgatójának, Prof. Hunyady Lászlónak is, aki annak idején lehetőséget adott a TDK-s éveim megkezdésére, és munkámat mindvégig a szeme sarkából figyelve támogatta.

Köszönet illeti Ligeti Erzsébet professzorasszonyt, aki a Celluláris és molekuláris élettan program vezetőjeként figyelemmel kísérte és támogatta tevékenységemet.

Külön köszönettel tartozom TDK-hallgatóimnak, elsősorban Dr. Radvánszki Glóriának, de Rácz Rékának is a rengeteg energiát, és ellentmondást nem tűrő hozzáállást, amit a felettébb eredményes munkájuk során tanúsítottak.

Kiemelt köszönet illeti a volt és jelenlegi munkatársakat, elsősorban Dr. Tóth Dánielt és Dr. Tóth Józsefet, akik barátságukkal, megértésükkel és tudásukkal rengeteget segítettek a laborban zajló közös munka során. Nem lehet eléggé megköszönni a többi munkatársnak sem, Dr. Szalai Bencének, Dr. Erdélyi Lászlónak, Dr. Tóth Andrásnak, Dr. Balla Andrásnak, Dr. Turu Gábornak, Dr. Gyombolai Pálnak, Dr. Cserző Miklósnak, Dr. Szakadati Gyöngyinek és Soltész-Katona Eszternek a felemelő hangulatot és a szoros baráti viszonyt, amely nélkül elképzelhetetlen lett volna a doktoranduszként eltöltött öt és fél év. Szeretném megköszönni a laborban dolgozó összes asszisztensnek a segítő munkájukat, elsősorban Szabolcsi Katának, aki precíz hozzáértéssel segítette a napi munkámat a laborban. Köszönöm az Élettani Intézet összes munkatársának is az ösztönző és baráti hangulatot, amely folyamatos fejlődésre és munkára ösztönöztek.

Végül pedig szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak, akik sok-sok türelemmel, szeretettel és végtelen odaadással biztosították számomra a nyugodt légkört és szellemi táplálékot, ami lehetővé tette számomra a munkához szükséges feltöltődést.