

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

Doktori tézisek

**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 munkatárs

Budapest  
2018



## Bevezetés

A fehérjék működése szempontjából a megfelelő sejten belüli elhelyezkedés kulcsfontosságú tényező. A membránkötött fehérjék esetében a legnagyobb akadályt a hidrofil fehérjék és a hidrofób membránok egymáshoz kapcsolása jelenti. A PM belső felszínéhez kötődő fehérjéknél ennek az ellentétnek a feloldására számos mechanizmus alakult ki. Azok a fehérjék, melyek szekvenciájukban egy amfipatikus  $\alpha$ -hélixeket, vagy egy hidrofób hurkot tartalmaznak, könnyedén beépülhetnek a PM lipid környezetébe. Azoknál a fehérjéknél, melyek nem rendelkeznek jelentős számú hidrofób aminosav csoportokkal, más mechanizmus alakult ki a membránkötés elősegítése céljából.

Ezek a fehérjék a transzláció során, vagy azt követően lipid-módosításokon esnek át, melyek során hidrofób karakterű zsírsavláncok, vagy csoportok kovalens kapcsolódása történik specifikus aminosav oldalláncokhoz. Ezáltal a fehérjék lipofil karaktere erősödik. A többszörös lipidmódosítással rendelkező fehérjék stabil membránkötésre képesek, azonban a csak mirisztoilált vagy prenilált fehérjék kötődése gyenge kölcsönhatást mutat. Ebben az esetben stabil kötés csak további kölcsönhatások létrejöttékor lehetséges. Az esetek többségében ez egy további palmitoilációon keresztül valósul meg, azonban gyakori jelenség a fehérjék pozitívan töltött aminosavai és a PM negatívan töltött foszfolipidjei között kialakuló elektrosztatikus interakció is.

A PM citoszólikus felszínén két olyan foszfolipid fordul elő, melyek feji része a kompartmentre jellemző pH tartományban negatív töltéssel rendelkezik: a foszfatidil-szerin (PtdSer) és a foszfoinozitidek (PPIIns-ek) változatos csoportja. A PtdSer nagyobb mennyiségben található meg a PM-ban, a sejtek foszfolipid készletének a 3-10%-át teszi ki és egy negatív töltést hordoz. PPIIns származékok több eltérő mértékben foszforilált származékot foglalnak magukban és a sejt foszfolipid készletének kevesebb, mint 1%-át adják. A PtdSer nagy mennyiségének köszönhetően a PM általános negatív töltését biztosíthatja, pontos szerepéről ezidáig keveset tudunk. Ezzel szemben a PPIIns-ek szerteágazó szerepéről számos információval rendelkezünk. Felépítésüket tekintve egy diacilglicerol vázból, és az ahhoz foszfodiészter kötéssel kapcsolódó inozitol-gyűrűből állnak, melynek 3-as, 4-es és 5-ös pozíciójában reverzibilis foszforiláció történhet kinázok és foszfatázok részvételével, melynek eredményeképpen hét különböző PPIIns kialakulása lehetséges. A PM-ban három típus található meg nagy mennyiségben: a foszfatidil-inozitol 4-foszfát (PtdIns4P), a foszfatidil-inozitol 4,5-biszfoszfát

(PtdIns(4,5) $P_2$ ), körülbelül azonos mennyiségben, végezetül a (PtdIns(3,4,5) $P_3$ ), melynek mennyisége még a lipid mennyiségét növelő jelpályák aktivációja esetén is meglehetősen alacsony.

A PtdIns(4,5) $P_2$  és PtdIns(3,4,5) $P_3$  molekulák jól ismert szereplői a G-fehérje kapcsolt receptorok és a receptor tirozin kináz jelpályáknak, azonban szignalizációs hatásaikon kívül is számos sejtfunkcióban szerepelnek reguláló molekulaként. Részt vesznek ioncsatornák, például a  $K^+$ -csatornák és a kapacitív  $Ca^{2+}$ -beáramlás (SOCE) szabályozásában, a sejtek motilitásának és vezikuláris transzportjának irányításában, fontosak a sejtek fehérjeszintézisében és proliferációjában, de molekuláris „jelzésként” fehérjék membránkötését is elősegítik. Ezek a folyamatok specifikus és nem specifikus lipid-fehérje interakciók által valósulnak meg, melyekben a fehérjék preformált lipid-kötő doménjei, illetve a lipidek negatív töltésű feji részei és a fehérjék pozitívan töltött aminosavai között kialakuló elektrosztatikus interakció játszik szerepet.

A Ras fehérjék mutációi kiemelt jelentőséggel bírnak a sejtek daganatos elfajulásában, ennek megfelelően nagy figyelem hárul rájuk a biológiai kutatásokban. A kis G-fehérjékhez tartoznak, és funkciójukra általánosan igaz, hogy molekuláris kapcsolóként szabályozzák partnereik működését. Aktivációjuk során a fehérje N-terminális részén egy GDP/GTP csere történik, ami konformációváltást indukálva lehetőséget teremt további fehérjék szabályozására. A Ras-ok C-terminális irányító-szekvenciája felelős a membránkötés kialakulásáért, amelyben a szakaszon belüli aminosavakon kialakuló poszttranszlációs lipidmódosítások nyújtanak segítséget. A Ras természetes mutációinak vizsgálatakor kiderült, hogy azok csak a molekula N-terminális részén jönnek létre, ami az irányító-szekvenciák esszenciális szerepére utal a fehérje funkciójában. A H-Ras a transzlációt követően kétszeresen palmitoilálódik és egyszeresen prenilálódik, amely stabil membránkötést eredményez; míg a K-Ras esetében csak preniláció történik, így ebben az esetben a fehérje stabil PM-kötéséhez a C-terminális farokrégió pozitívan töltött aminosavai elengedhetetlenek. Korábbi munkákból ismert, hogy a szakasz pozitív aminosavainak lecserélése neutrális aminosavakra a fehérje PM lokalizációjának megváltozását, és a fehérjék endomembránokra történő áthelyeződését eredményezi, hasonlóan azokhoz a fehérjékhez, melyek csak prenil vagy mirisztoil csoportot tartalmaznak membránkötésük kialakításához.

Az irodalomban számos olyan ellentmondó példát találhatunk, melyek a Ras fehérjék intracelluláris átrendeződését mutatják be a PM belső felszínén található negatív töltések csökkentése után. Ezek alapján elmondható, hogy a PM PPI<sub>n</sub>s molekulái fontos szerepet töltenek be a PM lokalizáció szabályozásában, azonban az egyes PM PPI<sub>n</sub>s frakciók pontos funkciójáról, az átrendeződés intracelluláris útvonaláról, illetve az érintett endomembránok szerepéről kevés információval rendelkezünk. A PM PPI<sub>n</sub>s molekulái mellett egyre több adat jelenik meg a PtdSer szabályozó szerepéről is a folyamatban, amely a lipid mennyiségét és a negatív töltését figyelembe véve fontos tényező lehet a pozitív töltésű fehérjék PM lokalizációjának kialakításában.

A Ras fehérjék fokozott sejtproliferációt előidéző képessége három útvonal közreműködésével jöhet létre: 1.) az aktív Ras fokozza a PI3K enzim működését, ami a PM PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> szintjének emelkedéséhez és következményes Akt aktivációhoz vezet 2.) a MAPK kaszkád aktivációjával, ami a Raf fehérje direkt aktivációján keresztül valósul meg, illetve 3.) fokozhatja a Ral-GDS fehérje működését is, amely a Ral fehérje GDP/GTP cseréjét katalizálja, ezáltal elindítva a Ral-függő jelátviteli utakat. Az utóbbi jelátviteli útvonal csak kevésbé ismert széles körben, azonban egyre több irodalmi adat hangsúlyozza a jelentőségét a sejtek Ras-függő daganatos elfajulásának hátterében.

A monomer G-fehérjék endomembrán-függő szignalizációját számos közlemény alátámasztja. A Ras fehérjék esetében kimutatásra került, hogy képesek aktiválódni a Golgi felszínén, majd onnan fokozott sejtproliferációt előidézni az ERK fehérje foszforilációjának fokozódásán keresztül. Ezekben a munkákban a Ras fehérjék közül a H- és N-Ras izoformákat vizsgálták, a K-Ras esetében nem áll rendelkezésre ilyen adat. Ebben az is szerepet játszhat, hogy a fehérjéről alkotott elképzelésünk szerint az intracelluláris mozgása során nem fordul elő az organelum felszínén. A H- és az N-Ras példájából kiindulva, azonban elképzelhető a K-Ras szignalizációja is, ha az őket bekapcsoló fehérjék képesek az endomembrán-lokalizált K-Ras elérésére és aktiválják őket.

A kapacitív Ca<sup>2+</sup>-beáramlás (SOCE) fontos szerepet tölt be a sejtek Ca<sup>2+</sup>-háztartásában. A folyamat kezdeti lépése a sejt kalciumraktárának, az ER-nak a Ca<sup>2+</sup>-depléciója, amely fiziológiásan a PLC enzimek, és az őket aktiválni képes PM

receptorok stimulációjától függ. Az enzim működése során a PM  $\text{PtdIns}(4,5)P_2$  molekuláiból inozitol(1,4,5)-triszfoszfátot ( $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ ) képez, amely ezt követően az endoplazmás retikulumon (ER) elhelyezkedő receptorához kötve növeli az organelum  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabilitását. A folyamat során a raktárak ürülnek, amely az ER-ban található STIM1 fehérjének a lumenális oldalán, a  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékelésére specializálódott doménjében egy konformáció-változást indukál, ami a molekulák dimerizációját és oligomerizációját eredményezi. Ezek után a komplexek az ER-PM között kialakuló kontaktpontokba vándorolnak és interakcióba lépnek a PM Orai1 csatornáival, kiváltva azok megnyílását és a  $\text{Ca}^{2+}$ -ionok citoplazmába történő beáramlását. Irodalmi adatok alapján a folyamat szabályozásában a PM PPIns molekulái fontos szereppel bírnak, azonban a szabályozás pontos mechanizmusa és az egyes lipidek pontos szerepe nem ismert a folyamatban.

Ph.D. munkám során arra kerestem a választ, hogy a PM PPIns frakcióinak akut csökkentése milyen módon képes szabályozni a poszttranszlációs lipid-módosításokkal rendelkező perifériás PM-fehérjék sejten belüli elhelyezkedését és funkcióját, különös tekintettel a K- és H-Ras fehérjékre; illetve, hogy a PM PPIns molekuláinak csökkentése hogyan befolyásolja a SOCE működését.

## Célkitűzések

Az eddigiekben már említésre került, hogy számos irodalmi adat áll rendelkezésre a Ras fehérjék membránkötésének és a kapacitív  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás PM PPIns molekulák általi szabályozásáról, azonban az egyes PM foszfoinozitidek önálló szabályozó szerepe még nem teljesen tisztázott az említett folyamatokban. Munkacsoportunk és kollaborációs partnereink korábban létrehoztak egy olyan molekuláris technikát, aminek segítségével a PM PPIns molekuláinak összessége, vagy akár egyes elemei is akutan csökkenthetőek rapamycinnel indukálható módon. A rendszert felhasználva szeretnénk volna meghatározni az egyes foszfoinozitidek szabályozó szerepét a fent említett folyamatokban.

Céljaink eléréséhez az alábbi feladatok elvégzését tűztük ki magunk 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 PPIns depléciója során
- Az egyes PM PPIns molekulák szerepének vizsgálata a perifériás plazmamembrán-fehérjék lokalizációjában
- A Ras fehérjék gyors intracelluláris mozgását eredményező fiziológiai folyamatok vizsgálata
- A Ras fehérjék PPIns függő mozgásából eredő funkcionális következmények feltérképezése
- A PM PPIns molekulák szabályozó szerepének vizsgálata a SOCE folyamatában

# Módszerek

## Plazmidkonstrukciók

A vad-típusú M3 muszkarinos acetilkolin receptort (M3R) az S&T cDNS Resource Center-től rendeltük. A humán EGF receptort (EGFR), és a nem internalizáló 1A típusú patkány angiotenzin II receptort (AT1R- $\Delta$ 319) már korábban is használtuk.

A különböző plazmamembránhoz (PM) irányított Venus konstrukciók elkészítéséhez a jelölt fehérjék rövid irányító-szekvenciáit kódoló DNS-szakaszokat DNS-oligo (Sigma) formájában szintetizáltattuk meg: a Lyn fehérje N-terminális 14 aminosavát (AS), az Lck fehérje N-terminális 10 AS-át, a c-Src fehérje N-terminális 15 AS-át, illetve a K-Ras és a H-Ras fehérjék C-terminális 22 AS-át (K-Ras-CAAX és H-Ras-CAAX). A rövid DNS-szekvencia darabokat az N-terminális irányítószakaszok esetében N1-es, míg a C-terminálisok esetében C1-es plazmidba helyeztük be a monomer Venus fehérje elejére, illetve végére az NheI és BglII, illetve EcoRI és BamHI restriktív enzimekkel. A teljes hosszúságú, konstitutívan aktív mutáns Citrine-K-Ras G12V fehérjét, illetve a teljes hosszúságú vad típusú és konstitutívan aktív mutáns YFP-H-Ras WT és YFP-H-Ras G12V konstrukciókat John F Hancock professzortól kaptuk. A konstrukciókban lecseréltük a fluoreszcens fehérjéket az irányító-szekvenciáknál is használt monomer Venus fehérjére, melyhez a Ras fehérjék szekvenciáját polimeráz-lánreakcióval (PCR) sokszorosítottuk, majd a monomer Venust tartalmazó C3-as plazmidba ligáltuk SacI és KpnI restriktív enzimekkel. A hiányzó vad típusú és domináns negatív mutánsok (K-Ras WT, K-Ras S17N és H-Ras S17N) szekvenciáját a konstitutívan aktív mutáns felhasználásával, irányított mutagenézissel hoztuk létre.

A különböző endomembránokhoz irányított luciferáz konstrukciókhoz a következő fehérjék teljes hosszúságú formáját, vagy azok irányítószakaszait használtuk fel: a mitokondrium esetében a TOM 70 fehérje első 30 AS-át, a Golgi-hoz történő irányításnál a TGN38 fehérjét, az endoplazmás retikulum (ER) esetében a Sac1 fehérje C-terminális szakaszát, míg a korai endoszómáknál (EE) az EEA1 fehérje Fyve-doménjét. A TOM 70 fehérje első harminc AS-nak DNS-szekvenciáját megszintetizáltattuk, majd super Renilla luciferázt tartalmazó N1 plazmidba ligáltuk az NheI és BglII enzimekkel. A TGN38, Sac1, illetve EEA1 fehérjék fragmentumait már korábban használtuk. A fehérjék megfelelő darabjainak kódoló szekvenciáit PCR-rel



sokszorosítottuk, majd a super Renilla luciferázt tartalmazó N1-es plazmidba ligáltuk az NheI és BglII enzimekkel a TGN38-Luciferáz, vagy C1-es plazmidba helyeztük a Luciferáz-ER és a Luciferáz-EE fehérjék esetén EcoRI és BamHI enzimekkel.

A rapamicinnel indukálható PM lipid-depléciós rendszert, illetve a TGN38-FRB-mRFP konstrukciót, melyet a citoplazmatikus foszfatáz Golgira történő irányítására használtunk, illetve a munkában szereplő plazmamembrán lipid-, Ins(1,4,5) $P_3$ -(R265K) és  $Ca^{2+}$ -szenzorokat munkacsoportunk már korábban is használta.

### **Alkalmazott sejtvonalak**

A HEK 293T, COS-7 és HeLa sejtek (ATCC) tenyésztését 10cm-es petricsészékben végeztük 10%-os főtális borjúsérumot, valamint penicillint (50 U/ml) és sztreptomocint (50  $\mu$ g/ml) tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's médiumban (DMEM, Lonza), egy 37°C-os, 5% CO<sub>2</sub>-os párás levegőt biztosító inkubátorban.

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

A BRET mérésekhez használt HEK 293T sejteket tripszinezés után  $7 \times 10^4$ /lyuk koncentrációban, poli-L-lizinnel előkezelt (0,001%, 1 óra) 96 lyukú lemezre osztottam szét Opti-MEM (Gibco) csökkentett szérum tartalmú oldatban, amely már tartalmazta a transzfekeciós reagenst (GeneCellin, 1,5  $\mu$ l/lyuk) és a szükséges DNS konstrukciókat (0,15-0,2  $\mu$ g/lyuk). Hat óra elteltével a sejtekhez 100  $\mu$ l szérumot is tartalmazó DMEM oldatot pipettáztam. A kísérleteket 25-26 órával a transzfekeció vége után végeztem, melyek kezdete előtt a sejteken található médiumot 50  $\mu$ l módosított Krebs-Ringer oldatra cseréltem. A mérések 37°C-on, Thermoscientific Varioskan Flash Reader (PerkinElmer) szövetkultúra-edény leolvasó készülékkel történtek. A BRET mérések elején a luciferáz szubsztrátját, a cöleterazine h-t 40  $\mu$ l Krebs-Ringer pufferoldatban, 5  $\mu$ M-os végkoncentrációban adtam a sejtekhez. A mérések során használt vegyületeket módosított Krebs-Ringer oldatban hígítottam ki, és 10  $\mu$ l-es térfogatban pipettáztam a sejtekre. A méréseknél az eredményt 2-4 párhuzamos pont átlagértékeiből képeztük. A BRET-hányadosok számolásánál az 530, illetve a 485 nm-en mért intenzitások hányadosát vettük. A PM-hoz irányított Venus, és a különböző endomembrán rendszerekhez irányított luciferáz enzim közötti interakció mérésénél a rapamycinnel (300 nM), illetve carbachollal (10  $\mu$ M) stimulált és a kontroll (DMSO, illetve desztillált víz) pontok közötti BRET-hányados értékek különbségével jellemeztük az interakció

változását. A PM lipid szintjeinek mérésekor normalizálást végeztünk, a kiindulási BRET-hányados értékeket tekintettük 100%-nak, míg 0%-nak azt az értéket, melyet csak citoplazmatikus luciferázt tartalmazó sejteknél mértünk. 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 mérésekre szolgáló intermolekuláris szenzorok expressziójától is, amely mérések között változhat. A citoplazmatikusan elhelyezkedő  $\text{Ins}(1,4,5)P_3$  és  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzorok esetén a nem stimulált kontrollpontok spontán változásaira korrigáltam a stimulált pontok adatait, majd a stimulálás előtti utolsó három pont átlagértékére normalizáltam az értékeket.

### **Konfokális mikroszkópia**

A mérésekhez a HEK 293T sejteket  $3 \times 10^4$ , míg a COS-7 sejteket  $2 \times 10^4$  sejt/lyuk denzitásban poli-L-lizinnel előkezelt (0,001%, 1 óra) 8 lyukú IBIDI  $\mu$ -Slide-okra helyeztem 300  $\mu$ l szérumot is tartalmazó 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 0,2  $\mu$ g/lyuk, illetve a transzfekciós reagenst (Lipofectamine 2000, 0,33  $\mu$ l/lyuk), Opti-MEM médiumban. A transzfekció után 6 órával a transzfekciós elegyet ismét 300  $\mu$ l DMEM médiumra cseréltem. A méréseket 24-26 órával a transzfekció után, szobahőn végeztem módosított Krebs-Ringer pufferoldatban, egy Zeiss LSM 710-es típusú pásztázó konfokális mikroszkóp és egy 63-szoros nagyítású, 1.4-es numerikus apertúrájú immerziós objektív segítségével. A képek feldolgozásához Fiji és Photoshop (Adobe) szoftvereket használtam.

### **Sejtpermeabilizációs kísérletek**

A sejtpermeabilizációs kísérletekhez HeLa sejteket használtam, melyeket 25 mm átmérőjű fedőlemezekre helyeztem szérumot is tartalmazó DMEM médiumban,  $2 \times 10^5$ /fedőlemez denzitásban. A sejtek transzfekciója során, a médiumot a szükséges DNS konstrukciókat (0,5  $\mu$ g/ml) és a transzfekciós reagenst (Lipofectamine 2000, 2  $\mu$ l/ml) tartalmazó transzfekciós elegyre cseréltem. A transzfekció után 6 órával a sejtekre 1 ml DMEM médiumot pipettáztam. A méréseket 24-26 órával a transzfekció után, szobahőn végeztem intracelluláris médiumban. A permeabilizálás során a digitonint 25  $\mu$ g/ml végkoncentrációban alkalmaztam. A képek rögzítése és kiértékelése a konfokális mikroszkópia címnél leírtaknak megfelelően történt.

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

A plazmamembrán lipid-depléciójának hatását a sejtek proteinszintézisére COS-7 sejteken, [<sup>3</sup>H]-Leucin beépülési módszerrel vizsgáltam. 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 transzfekciós elegyre cseréltem, amely tartalmazta a jelölt DNS konstrukciókat és a transzfekciós reagenst (Lipofectamine 2000, 0,6  $\mu$ l/lyuk) Opti-MEM médiumban. 6 óra elteltével a sejteken található transzfekciós elegyet szérumot is tartalmazó DMEM médiumra cseréltem. Egy nap után a sejteken található médiumot szérumot nem tartalmazó DMEM oldatra cseréltem. 6 óra múlva a sejtekre friss, szérumot nem tartalmazó DMEM oldatot pipettáztunk, amely már tartalmazott 1  $\mu$ Ci/ml aktivitású [<sup>3</sup>H]-mal jelzett leucin izotópot és a lipid-depléciós rendszer aktiválásához szükséges 100 nM rapamycint is. A sejtek ingerlését nyolc óránként megismételtük, a rapamycint, 10  $\mu$ l-es térfogatban adtuk a sejtekhez. Egy nappal (24 órával) az első ingerlés után a sejteket jégre helyeztük, és kétszer jéghideg PBS oldattal átmostuk. Ezek után a sejteket 5%-os triklór-ecetsav oldattal fixáltuk, majd 0,5 M NaOH-dal szolubilizáltuk. A sejteket tartalmazó szuszpenziót 10 ml OptiPhase HiSafe3 (Perkin Elmer) szcintillációs folyadékba pipettáztuk. Az aktivitást Beckman LS5000 TD típusú műszerrel regisztráltuk.

## **Statisztikai analízis**

A  $\Delta$ BRET hányados adatok statisztikai vizsgálatához 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 varianciaanalízissel történt. Az egy-, illetve kétutas varianciaanalíziseknél a csoportok egyenkénti összehasonlításához Holm-Sidak post hoc tesztet végeztünk. Az Ins(1,4,5) $P_3$ - és a  $Ca^{2+}$ -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.

## Eredmények

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

A perifériás plazmamembrán (PM) fehérjék intracelluláris mozgásának követéséhez PM-hoz irányított Venus fehérjét készítettünk perifériás PM fehérjék irányító-szekvenciáinak felhasználásával. A konstrukciókban a szakaszokat az eredeti fehérjékben elfoglalt helyzetének megfelelően a Venus fehérje N-, illetve C-terminális végéhez kapcsoltuk. A Lyn fehérje N-terminális első 14 aminosava (Lyn<sub>1-14</sub>-Venus) egyszeresen mirisztoilálódik és palmitoilálódik, az Lck kináz N-terminális 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) egyszeresen mirisztoilálódik. A K- és H-Ras fehérjék PM kötésében a C-terminális szakasz játszik szerepet, így 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 prenilálódik és kétszeresen palmitoilálódik. Megjegyzendő, hogy a c-Src és a K-Ras fehérjék irányító-szekvenciáiban számos pozitív töltésű aminosavat is találunk. Az irodalmi adatoknak megfelelően az összes konstrukció PM-rajzolatot mutatott a fehérjéket kifejező HEK 293T sejtekben.

Munkacsoportunk korábban kifejlesztett egy olyan biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) alapú módszert, mellyel követhető volt egy luciferáz enzimmel jelölt PM-receptor útvonala és sorsa az ingerlése és az azt követő internalizálódása után a Venus fluoreszcens fehérjével jelölt endomembrán-rendszereken keresztül. 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.

A luciferáz endomembránokhoz történő irányításhoz az alábbi rezidens fehérjék irányító-szekvenciáit, illetve teljes hosszúságú formáit használtam fel: a TGN38-at (teljes szakasz) a Golgihoz, TOM 70-et (N-terminális első 30 aminosav) a mitokondriumokhoz, a Sac1-et (C-terminális 527-587 aminosav) az ER-hoz, míg az EEA1 fehérjét (C-terminális 1253-1411 aminosav, ami a FYVE-doménnek felel meg) a korai endoszómákhoz történő irányításhoz.

## **A PM PPIIns tartalmának akut manipulálása**

A PM PPIIns tartalmának akut csökkentéséhez a munkacsoportunk által széleskörűen használt rapamycin-függő heterodimerizációs rendszert (a legtöbb kísérletben egy 4- és 5-foszfátáz aktivitással egyaránt rendelkező Pseudojanin enzimmel), illetve alacsony (100 nM) koncentrációjú wortmannin kezelést használtam, amely a PM PtdIns(3,4,5) $P_3$  szintjének fenntartásáért felelős I-es típusú PtdIns 3-kinázt gátolva a PM PtdIns(3,4,5) $P_3$  szintjének izolált csökkentéséhez vezet.

Az alkalmazott beavatkozások hatását konfokális mikroszkóppal és BRET kísérletekben validáltam specifikus bioszenzorok felhasználásával, melyekben az alábbi lipidkötő domének szerepeltek: a SidM-2xP4M a PtdIns4 $P$ , a PLC $\delta$ 1-PH a PtdIns(4,5) $P_2$ , míg a Btk-PH a PtdIns(3,4,5) $P_3$  követéséért felelt. A kísérletek során 300 nM rapamycin adását követően a PJ enzim kihelyeződött a PM-hoz, és a PM PtdIns4 $P$ , PtdIns(4,5) $P_2$ , és PtdIns(3,4,5) $P_3$  tartalmának gyors csökkenését okozta. Alacsony (100 nM) koncentrációjú wortmannin kezelés hatására, azonban csak a PM PtdIns(3,4,5) $P_3$  frakciója csökkent, a másik két lipid frakciója érintetlen maradt. Megjegyzendő, hogy a wortmannin kezelés hatásosabbnak bizonyult a PM PtdIns(3,4,5) $P_3$  szintjének csökkentése szempontjából, mint előanyagának, a PtdIns(4,5) $P_2$ -nek a rapamycin-függő enzimatis bontása. Ez arra utal, hogy a PJ enzim nem képes a PM lipid-szintjét teljesen csökkenteni, ezáltal ilyen körülmények között még mindig van lehetőség a PtdIns(3,4,5) $P_3$  képzésre a PI3K enzim által.

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

Irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy az irányító-szekvenciájukban pozitív töltésű aminosavakat tartalmazó perifériás PM fehérjék elhagyják a PM-t, ha annak PtdIns4 $P$  és PtdIns(4,5) $P_2$  tartalmát csökkentjük. Ennek a jelenségnek a további vizsgálatához először konfokális méréseket végeztünk az elkészített PM-hoz irányított Venus konstrukciókkal. Kísérleteinkben a PM PtdIns4 $P$ , PtdIns(4,5) $P_2$  és PtdIns(3,4,5) $P_3$  szintjeit a depléciós rendszerünk aktiválásával hoztuk létre. Azt tapasztaltuk, hogy a Venus-K-Ras-CAAX és a c-Src $_{1-15}$ -Venus konstrukciók elhagyják a PM-t, míg a többi általunk használt konstrukciónál (Lyn $_{1-14}$ -Venus, Lck $_{1-10}$ -Venus, Venus-H-Ras-CAAX) nem tapasztaltunk változást.

A továbbiakban az PM-t elhagyó Venus konstrukciók és a luciferázzal jelölt endomembrán rendszerek közötti interakció-változást követtük BRET-technikával, HEK 293T sejtekben. Először az ER-hoz irányított luciferáz (Luc-ER) enzimet használtuk 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 mérések során az eredmények megegyeztek mikroszkópos kísérletek során tapasztaltakkal, tehát, csak a Venus-K-Ras-CAAX és a c-Src<sub>1-15</sub>-Venus konstrukciók esetében kaptunk a fehérjék mozgására utaló szignifikáns jelnövekedést.

A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy a Venus-K-Ras-CAAX melyik egyéb endomembránon jelenik meg a PM-től való eltávolodása után. Kísérleteinkben csak a Golgi és a mitokondriumok esetében tapasztaltunk szignifikáns jelnövekedést, azonban az utóbbi esetben ez jóval kisebb mértékű volt. A c-Src<sub>1-15</sub>-Venus esetében hasonló változásokat kaptunk. A Venus-H-Ras-CAAX esetében nem sikerült az interakció-növekedést kimutatni a Golgihoz képest a PM PPIs deplécióját követően.

### **A Venus-K-Ras-CAAX fehérje útvonalának és a Golgi PtdIns4P tartalmának vizsgálata a PM-ről a Golgira történő áthelyeződése során**

Irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy a lipofil természetű K-Ras fehérje intracelluláris mozgását „szolubilizáló faktorok”, a Galectin-3 és a PDE $\delta$  segítik a hidrofil citoplazmán keresztül, melyek megakadályozzák a fehérje véletlenszerű kötődését az endomembránokhoz. A Galectin-3 és PDE $\delta$  fehérjék szerkezetében egy olyan kúpszerű struktúra jön létre, amely képes a lipofil prenil-csoport megkötésére, ezáltal elrejtik a citoplazma hidrofil környezete elől. Annak vizsgálatához, hogy a méréseink során a K-Ras fehérje is ezt az útvonalat követi-e, az irodalomból ismert deltarasin vegyülettel kezeltük a sejteket, amely felépítését tekintve hasonlít a prenil-csoporthoz, így kompetitíven gátolja a K-Ras fehérjék kötődését. Kísérleteinkben a deltarasin kezelés szignifikánsan csökkentette a Venus-K-Ras-CAAX Golgin való megjelenését a PM PPIs depléciója során BRET-mérésekben. Az eredményeket mikroszkópos kísérletekben is megerősítettük COS-7 sejteken, ahol a fehérje intracelluláris vezikulákon történő megjelenését tapasztaltuk.

A Venus-K-Ras-CAAX fehérje citoplazmatikus frakciójának létét egy nagyon egyszerű kísérlettel próbáltuk megerősíteni. HeLa sejtekben tranziensen transzfektáltuk

a Venus-K-Ras-CAAX, illetve a H-Ras-CAAX konstrukciókat, majd a sejtek permeabilizálása után követtük a fehérjék mozgását. Azt tapasztaltuk, hogy a Venus-K-Ras-CAAX elhagyta az expressziót mutató sejteket, sőt, a konstrukciót előzetesen nem tartalmazó sejtekben is megjelent. A Venus-H-Ras-CAAX esetében ilyen változásokat nem tapasztaltunk.

Annak vizsgálatára, hogy a Venus-K-Ras-CAAX Golgi áthelyeződésében szerepet játszik-e az organelum membránjának PtdIns4*P* tartalma, a lipid-depléciós rendszerünket módosítottuk, és az eredetileg PM-hoz irányított FRB domének (Lck<sub>1-10</sub>-FRB-mRFP) mellet Golgihoz irányított formájukat (TGN38-FRB-mRFP) is kifejeztük HEK 293T sejtekben. A BRET mérések során az együttes lipid-depléció hatására szignifikánsan csökkent a Golgi membránjára áthelyeződő Venus-K-Ras-CAAX mennyisége, ami a Golgi lipid tartalmának szerepére utal az áthelyeződés folyamatában.

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

A korábban bemutatott PJ enzim PM-hoz irányítása során a PM PtdIns4*P*, PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> és PtdIns(3,4,5)*P*<sub>3</sub> tartalma is csökken. Az egyes lipidek lokalizációban betöltött szerepének vizsgálatához egyenként csökkentettük a PM PPIns frakcióit.

Először a PM PtdIns(3,4,5)*P*<sub>3</sub> molekuláit vizsgáltuk, melyek izolált csökkentését a korábban bemutatott wortmannin (100 nM) kezeléssel hoztuk létre. 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.

A PM PtdIns4*P* és PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub> tartalmának csökkentéséhez mutáns PJ enzimeket (PJ-4-foszfátáz és PJ-5-foszfátáz) használtunk, melyek a foszfátáz alegységek katalitikus régióiban található pontmutációk révén csak az egyik lipid bontására képesek. A PJ-4-foszfátáz alkalmazásakor, tehát a PM PtdIns4*P* frakciójának csökkentésekor jóval kisebb, de szignifikáns mértékű fehérjemozgást tapasztaltunk, mint a másik két enzim esetében. A PJ-5-foszfátáz által kiváltott PM PtdIns(4,5)*P*<sub>2</sub>

csökkentés nagyobb áthelyeződést eredményezett, mint a másik mutáns esetében, azonban a PJ hatásától ez is elmaradt.

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

A korábbi kísérletekben a K- és H-Ras fehérjék intracelluláris átrendeződésére az irányítószakaszaikkal módosított Venus fehérjék mozgásából következtettünk. A teljes hosszúságú formák viselkedésének vizsgálatához 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 HEK 293T sejteken. A kísérletek során az irányító-szekvenciák használatával megegyező eredményeket kaptunk. A méréseket megismételtük a fehérjék vad típusú és domináns negatív formáinál is, de azonos eredményt kaptunk, amely a transzlokációs folyamat Ras aktivitástól való függetlenségét mutatja.

### **A K-Ras 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 fiziológias viszonyokat jobban közelítő állapotokban, G<sub>q</sub>-kapcsolt és EGF-receptorok (EGFR) aktivációja, esetén is bekövetkezik-e a K-Ras fehérjénél tapasztalt sejten belüli átrendeződés. Ennek megfelelően, M3-as muszkarinos acetilkolin receptort (M3R) és EGFR-t expresszáltattunk HEK 293T sejtekben, a BRET mérésekhez szükséges Venus-K-Ras-CAAX, vagy Venus-K-Ras G12V és a Golgi-hoz irányított luciferáz mellett. Az M3R agonista carbachol, illetve az EGF stimulus hatására a sejtekben PLC enzimek aktiválódnak. Carbachol hatására a Venus fehérjék a Golgira helyeződtek át, amely tranziens kinetikát mutatott. A lipid-reszintézis folyamatában szereplő PI4KA enzim farmakológiai gátlásával (A1, 10 nM, 10 perces előkezelés) a Venus fehérjék mozgásának kinetikája megváltozott, és a Golgihoz irányított luciferázzal kialakított interakció a tranziens emelkedés helyett egy fenntartott, folyamatosan növekedést



mutatott. A tapasztalt változásokat mikroszkópos mérésekben is megerősítettük COS-7 sejteken, ahol hasonló változásokat kaptunk.

Egy korábbi munkánkban bemutattuk, hogy HEK 293T kifejezett EGFR-ok aktivációja csökkenti a PM  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  szintjét, egyrészt a PI3K, másrészt a PLC $\gamma$  aktiválásán keresztül,  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -ot és  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ -ot eredményezve. Ennek megfelelően, a receptor overexpressziója esetében sikerült kimutatnunk a Venus-K-Ras-CAAX PM-ról Golgira történő áthelyeződését BRET kísérleteinkben, azonban az endogén receptorok ingerlésekor nem tapasztaltunk változást. A PI4KA (A1, 10nM, 10 perc) gátlása során ugyanúgy fokozott mértékű transzlokációt mértünk, mint az M3R esetében. Ezek az eredmények megerősítették a PM PPIns depléciója során tapasztalt változásokat, miszerint a PM  $\text{PtdIns}4\text{P}$  és  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  tartalmának csökkenése a K-Ras transzlokációját váltja ki a Golgi membránjára.

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

A Ras fehérjék központi szerepet töltenek be számos sejtélettani folyamatban, és kitüntetett szerepük van a sejtek növekedésben, a sejtproliferációban, illetve a túlélési jelpályában. Annak vizsgálatához, hogy a K-Ras PM-ról Golgira történő áthelyeződése a PM lipid-depléciójának következtében jár-e bármilyen funkcionális következménnyel, a fehérjeszintézis megítélésére egy 24 órás [ $^3\text{H}$ ]-leucin beépülési tesztet végeztünk el.

Először összehasonlítottuk a domináns negatív és a konstitutívan aktív K- és H-Ras mutánsok (S17N és G12V) sejtproliferációra gyakorolt hatását. 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. Ezek után arra kerestük a választ, hogy a PM lipid-depléciója milyen hatással van a konstitutívan aktív K- illetve H-Ras indukálta sejtproliferációra. A PM lipid-depléciójához a 4- és 5-foszfátáz aktivitással is rendelkező PJ enzimet rapamycinnel a PM-hoz irányítottuk. Mivel a rapamycin gátolja az mTOR jelpályát, ami a leucin beépülést önmagában is gátolhatja, kontrollként egy katalitikusan inaktív enzimet használtunk. Az aktív Ras fehérjék rapamycin jelenlétében is képesek voltak nagyobb mértékű leucin beépülést kiváltani, azonban a lipid-depléció során ez a hatás

mérséklődött a K-Ras esetében. Az aktív H-Ras és a domináns negatív K-Ras esetében nem tapasztaltunk változást.

### **A PM együttes PtdIns4P és PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> depléciója gátolja a SOCE-t**

A SOCE PPIns függő működésének vizsgálatához két módszert használtunk. Először megvizsgáltuk, hogy a PM PPIns depléciójának milyen hatása van a SOCE-ra az AT1R nem-internalizáló mutánsának hormonális aktivációja esetén. A receptor aktivációja nem csak a citoplazmatikus Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> és Ca<sup>2+</sup>-szintek emelkedéséhez vezet, hanem csökkenti a PM PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> frakcióját is, melynek direkt szabályozó szerepe lehet a folyamatban. Ezért a stimulált sejtekben párhuzamosan regisztráltuk a citoplazmatikus Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> és Ca<sup>2+</sup>-változásokat a korábban bemutatott BRET alapú szenzorokkal, HEK 293T sejtekben. A PM PPIns szintjeinek módosítását a hormon stimuláció után a rapamycines rendszerünkkel végeztük, melyben egy 5-foszfátáz aktivitású enzim szerepelt a PM PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> szintjének további csökkentése céljából. A sejtek AngII-vel történő ingerlése növekedést eredményezett a citoplazmatikus Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> és Ca<sup>2+</sup>-szintekben, azonban a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> szintek további csökkentésekor egy gyors, párhuzamos esés következett be mindkét anyag esetében. Ez arra utal, hogy ilyen körülmények között a folyamat megszűnésének hátterében az Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> szubsztrátjának, a PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-nek a csökkenése állt. Ha a PM lipidek reszintézisét a korábban bemutatott A1 vegyülettel gátoltuk, akkor a Ca<sup>2+</sup>-szint csökkenés gyorsabban bekövetkezett, ami a folyamat direkt lipid-függésére utal.

A második megközelítésben az ER Ca<sup>2+</sup>-raktárának ürítését, és ezáltal a SOCE aktivációját nem hormonális stimulussal, hanem az ER Ca<sup>2+</sup>-pumpájának gátlásával, thapsigarginnal (Tg) értem el. Ebben az esetben a SOCE PPIns függésének vizsgálata egyszerűbb keretek között, a korábban alkalmazott PLC működés direkt lipid-csökkentő hatása nélkül történhetett meg. A BRET mérésekben tranziensen transzfektált HEK 293T sejteket használtunk, melyek a Ca<sup>2+</sup>-szenzorokon kívül tartalmazták a PM lipid-depléciós rendszerünket is eltérő aktivitású enzimekkel (FKBP-PJ, FKBP-PJ-4ptase, FKBP-PJ-5ptase vagy FKBP-PJ-dead). Tg (200 nM) adását követően nagymértékű Ca<sup>2+</sup>-jel alakult ki a sejtekben, melynek gátlása csak a PtdIns4P és PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> együttes csökkentése esetén valósult meg, a lipidek egyenként történő változtatása hatástalannak bizonyult.

## Következtetések

Eredményeink alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

- Adataink 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.

## 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: pp. 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:

Várnai P., **Gulyás G.**, Tóth D.J., Sohn M., Sengupta N., Balla T.

Quantifying lipid changes in various membrane compartments using lipid binding protein domains. *Cell Calcium* 64: pp. 72-82. (2017) IF: 3,707

(Összefoglaló közlemény)

Toth J.T., **Gulyas G.**, Toth D.J., Balla A., Hammond G., Hunyady L., Balla T., Varnai P. (2016) BRET-monitoring of the dynamics changes of inositol lipid pools in living cells reveals a PKC-dependent PtdIns4P increase upon EGF and M3 receptor activation. *Biochim Biophys Acta*. 1861(3):177-187. IF: 5,547

Toth D.J., Toth J.T., **Gulyas G.**, Balla A., Balla T., Hunyady L., 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: 2185-97. IF: 5,877

