

Development of intracellular organelle markers using modified glycolipid-binding peptides in mammalian cells

Yong-Woo Jun, Jin-A Lee^{1, *} and Deok-Jin Jang^{*}

Department of Ecological Science, College of Ecology and Environment, Kyungpook National University

¹Department of Biological Science and Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University

(Received May 30, 2014; Revised December 10, 2014; Accepted December 10, 2014)

세포내 특정 소기관 타기팅 마커 개발을 위한 당지질-결합 펩타이드 변형 및 세포내 타기팅 분석

전용우 · 이진아^{1, *} · 장덕진^{*}

경북대학교 생태환경대학 생태과학과

¹한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템과학과

(2014. 5. 30. 접수, 2014. 12. 10. 수정, 2014. 12. 10. 승인)

Abstract: Intracellular organelles in eukaryotic cells play important roles in many cellular functions. Intracellular trafficking of many proteins to specific intracellular organelles is tightly regulated by various mechanisms in cells. Therefore, elucidating the targeting mechanism of novel markers for intracellular organelles is important for cellular physiology and pathology. In this study, we tried to identify the peptides which could bind to specific glycolipid in cellular membrane using GFP-fused glycolipid-binding peptides, and analyzed their cellular localization. As a result, we could identify mitochondria-, Golgi- or plasma membrane-targeting peptides. Furthermore, we found that the plasma membrane-targeting peptide was localized to the plasma membrane via electrostatic interactions. Thus, our results suggest that various glycolipid-binding peptides could be used as intracellular organelles markers.

요약: 진핵세포내 막성세포소기관들은 각각 고유한 세포의 중요한 기능들을 담당하고 있다. 이들 기관에 분포하는 단백질들은 세포질에서 발현된 후, 정교한 조절에 의해서 다양한 세포내 소기관으로 운송된다. 따라서, 세포내에 존재하는 막성세포소기관의 마커를 개발하고, 이들의 타기팅 기전을 알아내는 것은 세포 생리 및 병리학적 기전 연구에 중요한 도구가 될 수 있다. 본 연구에서는 기존에 보고된 당지질-결합 펩타이드들과 이들의 변형을 통한 세포내 타기팅을 분석하였다. 그 결과 이러한 당지질-결합 펩타이드들은 미토콘드리아, 원형질막, 골지체로 위치하는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 펩타이드가 세포내 기관을 마커로 이용될 가능성을 확인할 수 있었다. 또한, 원형질막에 타기팅하는 펩타이드 마커의 경우는, 정전기적인 상호작용에 의해 원형질막에 선택적으로 타기팅됨을 알 수 있었다. 본 연구결과를 통해 당지질-결합 펩타이드들이 다양한 세포내 운송과 관련한 연구에 세포소기관의 위치 및 모양을 분석할 수 있는 마커로 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

Key words: glycolipid-binding peptide, intracellular organelles, marker, plasma membrane, electrostatic interaction.

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)54-530-1213; +82-(0)42-629-8785 Fax : +82-(0)54-530-1218; +82-(0)42-629-8789

E-mail : jangdj@knu.ac.kr, leeja@hnu.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

진핵세포내에는 다양한 막성 세포소기관이 존재하며, 이들은 세포 내에서 그들의 고유의 기능을 수행한다. 세포질에서 합성되는 단백질을 중 일부는 그들 고유의 신호서열에 의해 특정 세포소기관으로 운송된다. 예를 들어 소포체로 가는 신호서열을 가진 분비성 또는 막투과성 단백질은 소포체로 이동해, 소포체의 내강이나 소포체 막에서 발현되고, 미토콘드리아로 타기팅되는 신호를 가진 단백질들은 미토콘드리아로 수송되어 미토콘드리아로 타기팅된다. 소포체에 타기팅된 단백질은 KDEL과 같은 소포체내 잔류(retention) 신호가 존재하면 소포체에 머물게 되고,¹ SXYQRL과 같은 골지체 잔류신호가 존재하면 골지체에 머물게 된다.² 이처럼 진핵세포내 특정 막성세포소기관으로의 단백질 수송은 아주 긴밀하고 정교하게 조절되고 있다.

세포내 막성세포소기관을 구성하는 막성분은 세포소기관에 따라 다른 분포 양상을 보인다. 예를 들어, PIs (phosphoinositides)에 속하는 PI(4,5)P₂와 PI(3,4,5)P₃는 원형질막의 세포질 표면에 주로 분포하고, PI4P는 골지체에 주로 분포하고, PI3P는 엔도솜(endosome)에 주로 분포한다.^{3,4} 따라서, 이러한 PIs에 결합하는 단백질은 특정 세포소기관에 분포하게 된다. 또한, 세포내 막성소기관의 막은 그 특성이 세포소기관마다 다르다. 원형질막의 세포질 표면은 세포내에서 가장 음전하를 띄는 지질층을 이루고, 그 다음으로 엔도솜막, 소포체막 순으로 전하를 띄게 된다. 따라서, 이전의 연구를 통해 막에 타기팅되는 펩타이드로 이루어진 탐침내의 순 전하량을 조절하면, 양전하를 많이 띄는 순서로 해서 원형질막, 엔도솜, 소포체막의 순으로 세포내 타기팅이 달라짐을 확인하였다.⁵ 본 연구실에서 연구된 단백질인 균소의(*Aphysia*)의 phosphodiesterase 4 (ApPDE4) short-form의 경우는 정전기적인 상호작용 기전에 의해서 가장 음전하를 띄는 원형질막에 타기팅됨을 알 수 있었다.⁶

많은 단백질이 막성세포소기관의 막으로 타기팅되기 위해서는 특정 지질과 결합을 하거나, 비특이적인 지질 결합을 하게 된다. 예를 들어, GAD65는 N-말단을 통해 골지체로 타기팅이 되고,⁷ hPDE4A1은 N-말단의 24 개의 아미노산으로 인해 골지체에 타기팅된다.⁸ 또한, AKAP의 N-말단은 미토콘드리아의 외막 타기팅에 중요한 역할을 수행한다.⁹ 이처럼 짧은 펩타이드들이 특정 지질과의 결합을 통해 타기팅되는 것이 아니라, 비특이적인 결합이지만, 특정 세포소기관에 타기팅

될 수 있다. 본 연구자에 의해 연구된 균소의 ApPDE4 long-form도 N-말단의 16 또는 20 개의 아미노산이 원형질막과 골지체막의 타기팅에 중요함을 확인할 수 있었다.⁶ 세포막에는 다양한 종류의 당지질들이 존재하며, 이들과 결합하는 펩타이드들도 많이 알려져 왔다. 이전의 연구에서 펩타이드와 지질 결합 분석을 통해서 ApPDE4 long-form의 N-말단 펩타이드와 결합하는 지질을 조사해본 결과 PI4P, sulfatide, cadiolipin등이 결합할 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.⁶ Sulfatide는 당지질중의 하나이며, 이를 통해서 펩타이드와 당지질 결합이 세포내 타기팅에 필요한 핵심 기전이 될 가능성을 생각해 볼 수 있었다.

따라서, 본 연구에서는 당지질에 결합할 수 있는 당결합 펩타이드를 이용하여 세포내 특정 소기관에 타기팅하는 마커를 개발하고, 이를 검증하고자 하였다. 그 결과, 미토콘드리아, 원형질막, 골지체로 타기팅할 수 있는 다양한 당지질-결합 펩타이드를 변형/분석하고, 동정할 수 있었으며, 원형질막에 타기팅하는 펩타이드 마커의 경우는, 정전기적인 상호작용에 의해 원형질막에 선택적으로 타기팅 되는 핵심 기전을 밝힐 수 있었다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. DNA 제작

실험에 사용한 당지질-결합 펩타이드는 각각의 펩타이드 염기서열을 확인한 후, 프라이머와 PCR을 이용해 제조하였다. 이를 이전의 연구에서 제조했던 pcDNA3. 1(+)-EGFP에 HindIII/XbaI에 넣어 EGFP 융합 construct를 제조하였다. 그 이외의 논문에서 사용된 다른 DNA들에 대한 정보는 이전 논문에 언급되어 있다.⁶

2.2. 세포 배양 및 DNA transfection

HEK293T 세포는 10% FBS + Penicillin/streptomycin + DMEM 배양액에서 37 (w/ 5% CO₂) 세포 배양기를 이용해 배양하였다. DNA transfection을 위해 HEK293T 세포로 4 well chamber로 옮기고 Ca²⁺-phosphate법을 이용해 Transfection을 수행하고 다음날, 공초점 현미경 (Carl Zeiss)을 이용해 영상을 획득하였다.

2.3. 시약

Antimycin A (Sigma)는 PBS에 200 nM을 녹여 40 분간 처리하였고, rapamycin (sigma)은 DMEM+10%

FBS에 1 μ M를 DMEM에 녹여 1-5 분간 처리하였다. Sphingosine (Sigma)은 DMEM에 75 μ M을 녹여, 40분 간 처리하여 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. GFP에 융합한 당지질-결합 펩타이드의 제조 및 발현

당지질과 결합하는 펩타이드를 이용한 세포내 소기관 타겟팅을 연구하기 위해, 기존에 보고된 당지질-결합 펩타이드들을 조사하여 정리하였다(Fig. 1A). 예를 들어, Ab펩타이드는 아밀로이드 베타에서 유래된 펩타이드로 galactosylceramide (Galcer)나 sphingomyelin (SM)에 결합하는 것으로 보고되고 있다.¹⁰ Pr펩타이드는 프리온(prion)에 존재하는 부위로, 이들도 Galcer나 SM에 결합하는 것으로 보고되고 있다.¹⁰ P3는 합성된 펩타이드로 ganglioside GM들중 ganglioside GM1에 선택적으로 결합하는 것으로 알려져 있다.¹¹ Sul펩타이드의 경우에는 헤파린(heparin)과 sulfatide에 결합하는 펩타이드로 알려졌다,¹² 콜레스테롤에 결합하는 펩타이드인 SAA1도 알려졌다.¹³ 본 연구에서는 이들 펩타이드들을 이용해, 살아있는 세포내에서 세포내 위치를 파악하기 위해, GFP와 융합 construct를 만들어 이들이 세포내 특정 세포소기관으로 타기팅되는지 확인하고자 하

였다.

이들의 염기서열 정보를 이용해, GFP와 융합된 당지질과 결합 펩타이드를 포유류 세포주인 HEK293T 세포에 발현시켰다(Fig. 1). Fig. 1B에서 보듯이 P3 펩타이드의 경우만 세포내 punctate한 구조로 타기팅됨을 확인할 수 있었고, 나머지는 GFP와 유사한 발현패턴이 확인되었다. 이러한 타기팅이 어느 세포소기관인지 알아보기 위해 다양한 세포소기관 마커와 같이 발현시켜 비교해 보았다. Fig. 1C에서 보여지듯이 P3-EGFP의 경우에는 미토콘드리아 마커인 mitotracker와 같이 존재함을 확인할 수 있었다. 즉, P3-EGFP는 미토콘드리아에 타기팅됨을 확인할 수 있었다.

3.2. 당지질-결합 펩타이드의 변형을 통한 세포소기관 타기팅 마커 제조 및 발현

일반적으로 세포내 특정 세포소기관에 타기팅 되기 위해선 특정 세포소기관에 타기팅할 수 있는 신호서열이 필요하다. 또한, 세포소기관 막에 타기팅되기 위해서는 특정 소기관에 위치하는 특정 지질과의 결합성을 가진 부위와 세포막에 결합할 수 있는 소수성 부위가 있어야 안정적으로 특정소기관 막에 위치할 수 있다. 본 연구에서는 두 가지 방식으로 펩타이드의 소수성을 증가시키는 전략을 구사하였다. 첫 번째로 펩타이드의 N-말단에 원형질막에 타기팅되는 GAP43

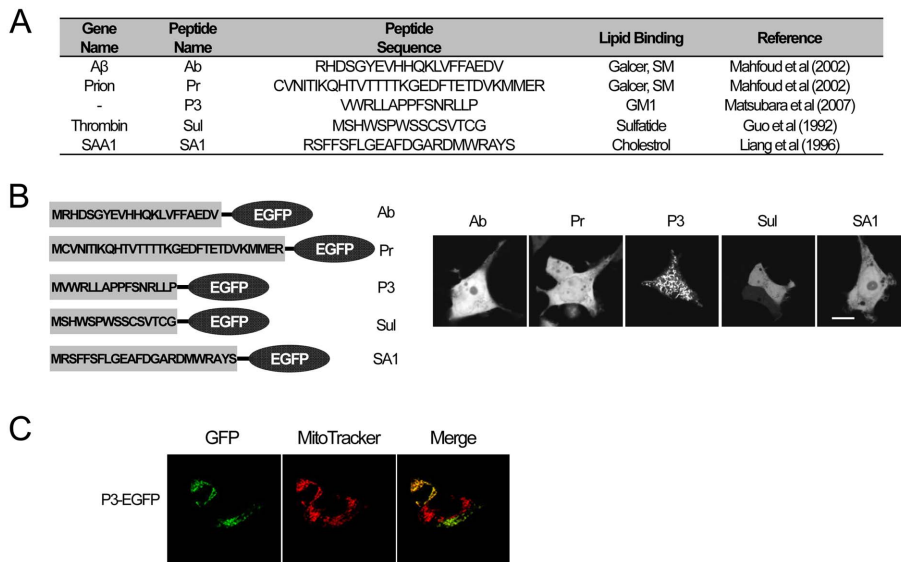


Fig. 1. Generation and cellular localization of GFP-fused glycosphingolipid-binding peptides. (A) Summary of the information of glycosphingolipid-binding peptides, (B) Diagrams of construction (left) and cellular expression of GFP-fused glycosphingolipid-binding peptides, (C) Mitochondria localization of P3-EGFP in HEK293T cells. P3-EGFP was colocalized with Mitotracker, a mitochondria marker in HEK293T cells. Scale bars, 20 μ m.

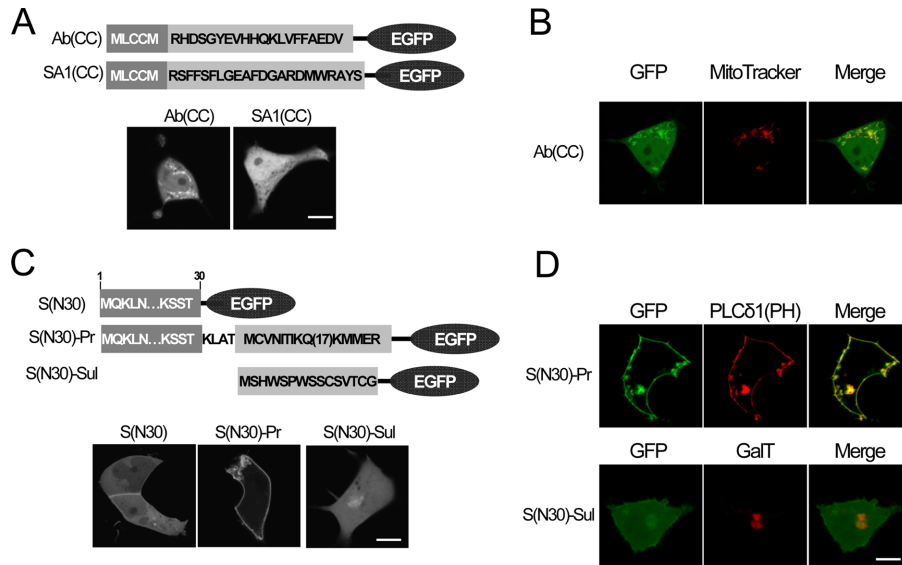


Fig. 2. Generation and cellular localization of GFP-fused modified glycosphingolipid-binding peptides. (A) Diagrams of construction (left) and cellular expression of MLCCM added, GFP-fused glycosphingolipid-binding peptides, (B) Identification of intracellular localization of Ab(CC)-EGFP. Ab(CC)-EGFP was colocalized with Mitotracker, a mitochondria marker in HEK293T cells. Scale bars, 20 μ m, (C) Diagrams of construction (left) and cellular expression of S(N30) added, GFP-fused glycosphingolipid-binding peptides. Scale bars, 20 μ m, (D) Identification of intracellular localization of GFP-fused modified glycosphingolipid-binding peptides. S(N30)-Pr-EGFP was co-localized with PLC δ 1(PH)-mRFP, a plasma membrane marker in HEK293T cells. S(N30)-Sul-EGFP was partially localized with GalT-mRFP, a Golgi marker in HEK293T cells. Scale bars, 20 μ m.

의 N-말단에 위치한 MLCCM 염기서열을 첨가시켰다. 이 염기서열을 첨가시키면, 펩타이드의 소수성을 증대시킬 수 있다. 두 번째로는 균소의 ApPDE4 short-form의 N-말단 30 개의 아미노산(S(N30))을 첨가시켰다. 본 연구실에서 이전의 연구를 통해, 균소의 ApPDE4 short-form의 N-말단 30개의 아미노산(S(N30))은 그 자체적으로는 막으로 가지는 못하지만, 다른 부위의 막타기팅을 도와줄 수 있음을 확인할 수 있었다.⁶ 따라서, 이 N-말단의 30개 아미노산을 당지질-결합 펩타이드와 융합을 시키면 펩타이드의 소수성을 증가시킬 수 있다.

Fig. 2A에서 보여주듯이 Ab와 SA1펩타이드의 경우는 MLCCM서열을 붙여 변형된 construct인 Ab(CC)-EGFP와 SA1(CC)-EGFP를 제조하였다. 그 결과 Ab(CC)-EGFP의 경우에는 Ab-EGFP와는 달리 세포내 punctuate한 구조에 타기팅됨을 확인할 수 있었다. 반면, SA1(CC)-EGFP의 경우는 GFP와 비슷한 발현패턴을 보였다. 이러한 타기팅이 어느 세포소기관인지 알아보기 위해 다양한 세포소기관 마커와 같이 발현시켜 비교해 보았다. Ab(CC)-EGFP의 경우에는 미토콘드리아

마커인 mitotracker를 처리해 보았다. Fig. 2B에서 보여지듯이 Ab(CC)-EGFP의 경우에는 미토콘드리아 마커인 mitotracker와 같이 존재함을 확인할 수 있었다. 따라서, Ab(CC)-EGFP의 경우 미토콘드리아에 타기팅됨을 알 수 있었다.

Pr, Sul펩타이드의 경우는 N-말단에 ApPDE4 short-form의 S(N30)-Pr-EGFP를 넣고, GFP융합 construct를 제조하여 각각을 세포에 발현시켰다(Fig. 2C). 실험을 수행한 결과, S(N30)-Sul-EGFP은 원형질 막으로 생각되는 곳으로 타기팅됨을 확인할 수 있었다. S(N30)-Sul의 경우는 원형질막과 세포내에 약하게 타기팅됨을 확인할 수 있었다. 이러한 타기팅이 어느 세포소기관인지 알아보기 위해 다양한 세포소기관 마커와 같이 발현시켜 비교해 보았다. S(N30)-Pr-EGFP은 원형질막 마커인 PLC δ 1(PH)-mRFP와 같이 분포됨을 확인할 수 있었고, 이는 S(N30)-Pr-EGFP이 원형질막에 타기팅된다는 것을 알 수 있었다. S(N30)-Sul-EGFP의 경우는 골지 마커인 GalT-mRFP와 발현시켜 확인해 보았는데, Fig. 2D에서 볼 수 있듯이 S(N30)-Sul-EGFP은 골지 마커인 GalT-mRFP와 부분적으로 같이

분포됨을 확인할 수 있었다. 따라서, S(N30)-Sul-EGFP은 원형질막과 골지체로의 타기팅을 부분적으로 유도한다는 사실을 알 수 있었다.

3.3. Pr 펩타이드의 원형질막 타기팅 기전

Fig. 2D에서 S(N30)-Pr-EGFP가 원형질막에 타기팅 되는 것을 확인하였다. 이러한 원형질막 타기팅이 어떤 기전에 의해 일어나는 것일까? 이를 확인하기 위

해 우선은 antimycin A를 처리해 보았다. Antimycin A는 세포내 ATP합성을 억제하는 약물로, 이것을 세포에 처리하면, 세포내에서 phosphoinositol의 인산화에 의해 발생하는 지질인 PI4P, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃등이 만들어지지 않는다. 이 antimycin A를 처리해보니 S(N30)-Pr-EGFP의 발현이 원형질막에서 세포질로 변화됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 따라서, S(N30)-Pr-EGFP의 타기팅이 ATP에 의해 만들어지는 PIs에

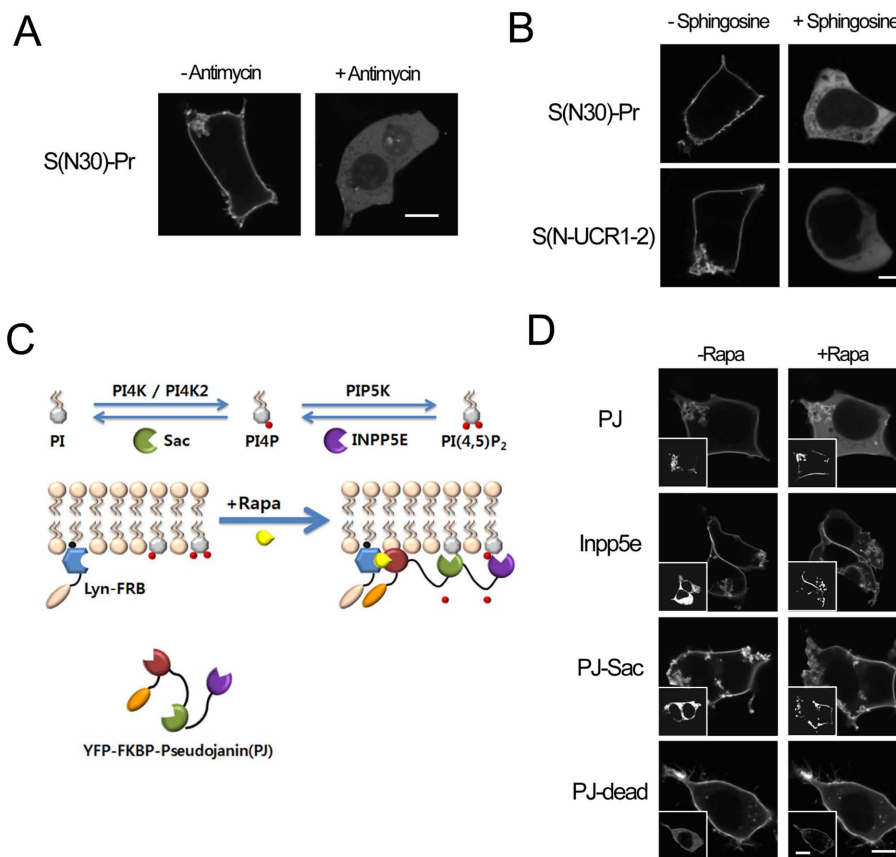


Fig. 3. Plasma membrane localization of S(N30)-Pr-EGFP via electrostatic interaction mainly generated by PI4P and PI(4,5)P₂ in plasma membrane. (A) Effects of PI depletion by antimycin on plasma membrane localization of S(N30)-Pr-EGFP. Images were acquired before and after 10 μM antimycin treatment for 40 min. Membrane localization of S(N30)-Pr-EGFP is changed from plasma membrane to cytosol by antimycin A treatment. Scale bar, 20 μm, (B) Plasma membrane localization of S(N30)-Pr-EGFP is changed by treatment with sphingosine, one of the basic lipids. The images were acquired before and after treatment with 75 μM sphingosine in PBS. Scale bar, 20 μm, (C) Schematic diagrams of PJ system. In the absence of rapamycin (Rapa), lyn11-FRB and mRFP-FKBP-PJ are localized to the plasma membrane and cytosol, respectively. In the presence of Rapa, Rapa-FRB can be associated through FKBP, leading to the plasma membrane targeting of mRFP-FKBP-PJ, depleting PIs, (D) Cellular localization of S(N30)-Pr-EGFP in the absence or presence of rapamycin in HEK293T cells. S(N30)-Pr-EGFP was co-transfected with PJ, PJ-Sac, INPP5E, and PJ-Dead. Yeast Sac1 dephosphorylates PI4P and INPP5E converts PI(4,5)P₂ to PI4P. Membrane localization of S(N30)-Pr-EGFP is switched to the cytoplasm by PJ recruitment, but not PJ-Sac and INPP5E (right). Thus, an electrostatic interaction contributes to S(N30)-Pr-EGFP recruitment to the plasma membrane and PI4P and PI(4,5)P₂ are also involved in charging the plasma membrane. Scale bar, 20 μm.

의해 유도될 가능성을 확인할 수 있었다.

원형질막은 세포내에서 가장 음전하를 띠는 부위이다. PIs중 PI(4,5)P₂와 PI4P와 PI(3,4,5)P₃가 많이 분포하고 있다. 따라서, S(N30)-Pr-EGFP의 원형질막 타기팅이 정전기적인 인력에 의해 타기팅되는지를 확인하기 위해 염기성 지질인 스프링고신(sphingosine)을 처리해보았다. 대조군으로는 정전기적인 인력으로 원형질막으로 타기팅된다고 알려진 ApPDE4 short-form을 사용하였다. Fig. 3B에서 볼 수 있듯이, S(N30)-Pr-EGFP이 ApPDE4 short-form과 마찬가지로 스프링고신 처리에 의해 원형질막에서 세포질쪽으로 변하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 S(N30)-Pr-EGFP은 아마도 정전기적인 인력에 의해 원형질막으로 타기팅되는 것임을 알 수 있다.

포유류의 원형질막 안쪽층에는 음전하를 띠는 PI4P와 PI(4,5)P₂와 PI(4,5)P₃가 다양으로 존재하고, 이들이 정전기적인 인력을 발생하는 것으로 알려져 있다. Pseudojanin (PJ) 시스템을 이용하면 rapamycin처리에 의해 세포막에 존재하는 PI4P, PI(4,5)P₂를 선택적으로 제거할 수 있다. PJ 시스템은 rapamycin이 있으면 복합체가 형성될 수 있는 FRB와 FKBP가 이용된다(Fig. 3C). Lyn 인산화효소의 N-말단 11개 아미노산을 FRB와 결합해 원형질막에 타기팅되는 Lyn11-FRB를 만들고, YFP에 FKBP와 PJ를 붙여 세포질에 발현되는 YFP-FKBP-PJ를 만든다. PJ는 PI4P를 phosphoinositol로 탈인산화시킬 수 있는 sac 탈인산화효소와 PI(4,5)P₂와 PI(3,4,5)P₃를 PI4P와 PI(3,4)P₂로 탈인산화시킬 수 있는 Inpp5e 탈인산화효소로 이루어져 있다(Fig. 3C). 따라서, rapamycin 처리에 의해 YFP-FKBP-PJ가 Lyn11-FRB가 있는 원형질막으로 이동하고, PJ에 의해 원형질막에 존재하는 PI(4,5)P₂와 PI4P를 모두 PI로 치환시킬 수 있다(Fig. 3C). 반면, PJ-Sac은 Sac 탈인산화효소만 제대로 기능을 해, PI4P를 PI로 치환시키지만, PI(4,5)P₂를 변화시키지 못한다. PJ-Inpp5e는 Inpp5e 탈인산화효소만 제대로 작용해, PI(4,5)P₂나 PI(3,4,5)P₃를 PI4P나 PI(3,4)P₂로 치환시킨다. 반면, 막에 존재하는 PI4P는 변화시키지 못한다, PJ-DEAD는 이 두 가지 탈인산화 효소가 모두 제대로 작용하지 않아, 아무런 변화가 나타나지 않는다(Fig. 3C). 이 시스템을 이용해 실험을 수행한 결과 S(N30)-Pr-EGFP는 PJ에 의해서만 원형질막에서 세포질로 재배치되고, PJ-Sac과 Inpp5e에 의해서는 변화되지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 3D). 이러한 사실은 S(N30)-Pr-EGFP이 원형질막에 가기 위해서는 PI4P, PI(4,5)P₂모두 요구됨을 알 수 있었

다. 요약해서 말하면 S(N30)-Pr-EGFP는 PI4P, PI(4,5)P₂에 의해 주로 만들어지는 정전기적인 힘에 의해 원형질막에 타기팅됨을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구를 통해 다양한 세포소기관에 타기팅하는 펩타이드를 확인할 수 있었다. 합성된 P3-EGFP는 미토콘드리아에 타기팅하고, Ab(CC)-EGFP의 경우도 미토콘드리아에 타기팅됨을 확인할 수 있었다. 이들의 미토콘드리아 타기팅은 미토콘드리아의 외막이 아닌 다른 부위임도 알 수 있었다. 또한, S(N30)-Sul-EGFP은 약하게 골지에 타기팅되고, S(N30)-Pr-EGFP은 원형질막에 타기팅됨을 확인할 수 있다. 이러한 타기팅은 원형질막에 존재하는 PI4P, PI(4,5)P₂에 의한 만들어지는 정전기적인 힘이 작용하여 나타남을 알 수 있었다. 본 연구를 통해 당지질에 결합하는 펩타이드의 변형을 통해 이들 펩타이드가 다양한 세포소기관의 마커로 개발 이용될 수 있음을 알게 되었다.

감사의 글

본 연구는 한남대학교 교비 학술 연구비(Hannam Research Program, 2014)에 의해서 지원되었습니다.

References

1. T. Nilsson and G. Warren, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**(4), 517-521 (1994).
2. K. Bos, C. Wraight and K. K. Stanley, *EMBO J*, **12**(5), 2219-2228 (1993).
3. D. J. Jang, S. W. Park and B. K. Kaang, *BMB Rep.*, **42**(1), 1-5 (2009).
4. G. Di Paolo and P. De Camilli, *Nature*, **443**(7112), 651-657 (2006).
5. T. Yeung, G. E. Gilbert, J. Shi, J. Silvius, A. Kapus and S. Grinstein, *Science*, **319**(5860), 210-213 (2008).
6. K. H. Kim, Y. W. Jun, Y. Park, J. A. Lee, B. C. Suh, C. S. Lim, Y. S. Lee, B. K. Kaang and D. J. Jang, *J Biol Chem.*, **289**(37), 25797-25811 (2014).
7. J. Kanaani, G. Patterson, F. Schaufele, J. Lippincott-Schwartz and S. Baekkeskov, *J. Cell Sci.*, **121**(Pt 4), 437-449 (2008).
8. G. S. Baillie, E. Huston, G. Scotland, M. Hodgkin, I.

- Gall, A. H. Peden, C. MacKenzie, E. S. Houslay, R. Currie, T. R. Pettitt, A. R. Walmsley, M. J. Wakelam, J. Warwicker and M. D. Houslay, *J. Biol. Chem.*, **277**(31), 28298-28309 (2002).
9. Y. Ma and S. S. Taylor, *J. Biol. Chem.*, **283**(17), 11743-11751 (2008).
10. R. Mahfoud, N. Garmy, M. Maresca, N. Yahy, A. Puigserver and J. Fantini, *J. Biol. Chem.*, **277**(13), 11292-11296 (2002).
11. T. Matsubara, K. Iijima, M. Nakamura, T. Taki, Y. Okahata and T. Sato, *Langmuir*, **23**(2), 708-714 (2007).
12. N. H. Guo, H. C. Krutzsch, E. Negre, T. Vogel, D. A. Blake and D. D. Roberts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **89**(7), 3040-3044 (1992).
13. J. S. Liang, B. M. Schreiber, M. Salmona, G. Phillip, W. A. Gonnerman, F. C. de Beer and J. D. Sipe, *J. Lipid Res.*, **37**(10), 2109-2116 (1996).