

## Kutatási beszámoló 2006-2009

Kutatásaink alapvetően a pályázathoz benyújtott munkaterv szerint történtek. Először ezen eredményeket foglalom össze. Az eredeti tervektől történt eltérést a beszámoló végén összegzem.

### *A p50GAP intracelluláris eloszlásának és sejtélettani szerepének vizsgálata*

A p50GAP és a transferrin receptor (TfR) között korábban észlelt kolokalizációról kinetikai vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy csak a késői endoszómákon jön létre, míg a TfR endocitózis kezdeti szakaszában a két fehérje elkülönült vezikula populációban található. A lokalizációban a p50GAP Sec-14 doménje játszik szerepet, a GAP-domén viszont nem rendelkezik meghatározó jelentőséggel. A p50GAP lehetséges in vivo szubsztrátjai vonatkozásában megállapítottuk, hogy nyugvó sejtekben a Cdc42 kis G-fehérje és a p50GAP azonos vezikula populáción helyezkedik el, de a Golgi szerkezet megzavarása (nocodazol vagy brefeldin A kezeléssel) esetén a két fehérje eltérő lokalizációt mutat. Tehát sejten belül valószínűleg nem a Cdc42 a p50GAP szubsztrátja. A kis G fehérjék közül a Rab család két tagjával (Rab11 és Rab5) találtunk olyan kolokalizációt, ami az érintett vezikulák manipulálása esetén is tartósan bizonyult. BRET módszer alkalmazásával mindkét Rab fehérjével pozitív jelet kaptunk, ami szoros molekuláris interakcióra utal. In vitro körülmények között a Rab fehérjék nem bizonyultak a p50GAP szubsztrátjának. Ezen kísérleteinkkel először mutattunk ki molekuláris kapcsolatot a Rho/Rac család valamint a Rab fehérjecsalád között.

Lentivírus alkalmazásával megpróbáltuk a p50GAP kifejezését a korábban hatásosnak bizonyult siRNS szakaszok segítségével leszorítani. Az eljárás azonban nem hozott nagyobb mértékű expresszió-csökkenést, mint korábbi eljárásaink. A lentivírussal kezelt sejteken sem találtunk egyértelmű fenotípus-változást. Így ezt a kísérleti irányt abbahagytuk.

Sikeres volt viszont a p50GAP fluoreszcens formájának kifejezése (overexpression) HeLa sejtekben. Megállapítottuk, hogy az így módosított sejtekben a transferrin felvétel lassul a kontroll sejtekhez képest. A hatás kifejezésében a p50GAP lokalizációja volt lényeges, mivel a Sec14-domén lokalizációs szignáljának módosítása kivédte, viszont a GAP-doménben a kritikus arginin módosítása nem befolyásolta a transferrin felvétel változását.

Eredményeinket a Journal of Biological Chemistry folyóiratban tettük közzé (**Sirokmány et al.2006**), valamint ebből a témából készítette el dr. Sirokmány Gábor a **PhD értekezését**.

### *RacGAP szerepe a fagocita NADPH oxidáz szabályozásában*

Nyilvános adatbázisokban felfedeztünk egy potenciálisan RacGAP aktivitással rendelkező fehérjét, az ARHGAP25-öt, amely csak hemopoetikus sejtekben fejeződik ki. Fúziós fehérje formájában előállítottuk a fehérjét teljes hosszúságban, valamint az izolált GAP doménjét és először in vitro körülmények között teszteltük az aktivitásukat. Megállapítottuk, hogy a lehetséges szubsztrátok közül elsősorban Rac-al reagál, míg Rho-ra valamint CDC42-re gyakorlatilag nem fejt ki GAP-hatást. A teljes hosszúságú fehérje valamint az izolált GAP-domén azonos aktivitású mind prenilált, mind nem-prenilált Rac-on, tehát a p50GAP-pal és p190GAP-pal ellentétben, ennek a fehérjének a hatását a kis G-fehérje preniláltsági foka nem befolyásolta.

A fenti fehérjéken kívül előállítottuk az ARHGAP25-nek egy feltehetőleg immunogén, más GAPok aminosav szekvenciájától eltérő szakaszát is. Mindezekkel a fehérjékkel nyulakat immunizáltunk, és 2 különböző poliklonális antitestet nyertünk. Mindkét antitest nagy érzékenységgel felismeri a tisztított fehérjét, de mindkét esetben a specificitással

problémáink adódtak. Ezért elkezdtük egy monoklonális antitest kifejlesztését, amely azonban négyszeri próbálkozás után és további várhatóan immunogén fehérje-szakaszok felhasználásával sem járt sikerrel, bár az ország összes, antitest-termelésben tapasztalattal rendelkező kutatójával konzultáltunk. Így a tervezett immunfestési kísérletek kivitelezhetetlenné váltak.

Sikerült viszont hatásos siRNS-t előállítani, amely PLB sejtekben igen jelentősen lenyomta az endogén fehérje szintjét. A kezelt sejtekből stabil klónt állítottunk elő, amely megőrizte az alacsony ARHGAP25 szintet. Azonban a PLB sejtek differenciálódása során az ARHGAP25 fehérje szintje megemelkedett, de további siRNS kezeléssel és klónozással végül sikerült olyan stabil sejtvonalat előállítani, amely nagyobb kópia-számban tartalmazza az siRNS-t, és a differenciált sejtben is alacsonyan tartja a fehérjét.

A csökkent ARHGAP25 szinttel rendelkező PLB sejtek funkcionális vizsgálata során megállapítottuk, hogy a teljes szérummal opsonizált élesztő fagocitózisa az alacsony ARHGAP25 tartalmú sejtekben szignifikánsan magasabb, mint a kontroll siRNS-szekvenciákkal kezelt sejtekben. A szérum 56 °C-on történő kezelését követően a fagocitózis mértéke jelentősen lecsökkent, és a különbség a csendesített és normál ARHGAP25-tartalmú sejtek között minimális lett. Ez az eredmény arra mutat, hogy az ARHGAP25 a komplement-receptoron keresztüli fagocitózis szervezésében játszhatna szerepet.

Ezt a feltevésünket tovább teszteltük a szuperoxid-termelés mérésével. A csendesített és normál ARHGAP25-tartalmú sejtek között nem találtunk különbséget, ha a protein kináz C-t direkt stimuláló forbolészterrel (PMA) stimuláltuk a sejteket. Viszont ha szérummal opsonizált zimozán volt a stimulus, akkor az alacsony GAP-tartalmú sejtek lényegesen több szuperoxidot termeltek mint a kontroll sejtek. A különbséget teljes szérummal opsonizált baktériumokat mint stimuláló ágenszt alkalmazva is megfigyeltük.

Eddigi kísérleteink alapján megalapozottnak látszik, hogy az ARHGAP25 a fagocitákon kifejeződő CR3 komplement receptorból kiinduló jelpályában szerepel. Az élettani funkció specificitásának jellemzéséhez a CR3 receptor célzott liganddal történő stimulálása mellett néhány további aktiváló ágens (TNF $\alpha$ , integrin-ligandok) hatását is meg kívánjuk vizsgálni. A feladatot nehezíti, hogy a PLB sejtek nem rendelkeznek a fagocitákra jellemző kemotaktikus (pl. fMLP) receptorokkal.

Eddigi eredményeinket hazai **konferenciák**on (Magyar Élettani Társaság ill. Magyar Immunológiai Társaság Vándorgyűlése, Semmelweis Egyetem PhD Napok) mutattuk be, és tervezzük előadás bejelentését a jövő évi Európai Fagocita Konferenciára is. A MÉT-en bemutatott poszter kísérleti anyaga a beszámoló végén található. Az ARHGAP25 funkció specificitásának jellemzésével kiegészített adataink nyújtják az első információt fagocita sejtekben arról, hogy az ismeretlen, de mindenképpen nagy számú (10-50?) Rac/Rho családra ható GAP fehérje egyike egy specifikus jelpályában vesz részt. Az új információ jelentőségének megfelelő színvonalú folyóiratban (J. of Immunology, J. of Leukocyte Biology) próbáljuk az eredményeinket közölni.

### ***A p190GAP szabályozása***

A fehérje 3 különböző szakaszát állítottuk elő GST fúziós konstrukt formájában és fejeztük ki baktériumban. Két fehérje (aa1135-1499 valamint aa1191-1499 szakaszok) esetében teljesen azonos lipid regulációt tapasztaltunk, mint amit korábban a baculovírusban kifejezett 1135-1499 szakasz esetében írtunk le. Tehát a regulációs mechanizmus vizsgálatára sikeresen tudtuk alkalmazni a baktériumban kifejezett fehérjéket. A harmadik protein (aa 1252-1499) esetében foszfolipidek nem befolyásolták a GAP aktivitást. Miután a p190GAP 1213 és 1236 aminosavak közötti szakasza összesen 11 pozitív töltésű aminosavat tartalmaz, felmerült, hogy ez a polibázikus régió lehet felelős a lipid érzékenységért. Feltételezésünket

egy deléciós mutáns ( $\Delta$ 1213-1236) segítségével igazoltuk. Ez a fehérje magas Rac- és RhoGAP aktivitással rendelkezik, amit foszfolipidek nem befolyásolnak.

A protein kináz C (PKC) foszforilációs helyeinek meghatározása céljából először megvizsgáltuk a fenti fehérje-szakaszok foszforilációját. A 1135-1499 valamint a 1191-1499 fragmensek esetén magas, PKC gátlószerral teljes mértékben gátolható foszforilációt kaptunk. A 1252-1499 valamint a  $\Delta$ 1213-1236 fehérjék azonos körülmények között nem foszforilálódtak. Tehát a foszforilációs hely a 1213 és a 1236-os aminosav közé esik. Ezen a szakaszon 2 szerin és egy treonin található. Elkészítettük mindhárom aminosav alanin valamint aszparagin mutánsait. Mindhárom egyes-mutáns fehérje (S1221, T1226, S1236) mutatott foszforilációt. Ezt követően elkészítettük mindhárom lehetséges kettős-mutánt, amelyek továbbra is foszforilálódtak. A hármas-mutáns fehérjében nem tapasztaltunk foszforilációt. Tehát a PKC a p190GAP-ban 3 aminosav foszforilációját hozza létre, és ezek a módosítások egymástól függetlenül következnek be.

A fehérje lipid-kötésének vizsgálatát kereskedelmi forgalomban elérhető lipid blotokkal kezdtük el. Megállapítottuk, hogy a 1135-1499 valamint 1191-1499 szakaszok egyforma intenzitású kötődést mutatnak az összes foszfoinozididhez, míg a 1252-1499 valamint a  $\Delta$ 1213-1236 fehérjék nem mutatnak lipid-kötést. A planáris lipid blotokkal kapcsolatos kritikák ismeretében egy lipid-vezikula kötési módszert is beállítottunk. A megkötődött és az oldatban maradt fehérjét centrifugálással történő elválasztás után SDS-PAGE-ban mutatjuk ki és mennyiségét denzitometriásan határozzuk meg. Ezzel a módszerrel egyértelműen sikerült kimutatni a vad-típusú fehérje kötődését foszfatidilszerinhez (PS), és a PS/PC arány változtatásával megállapítottuk, hogy ez a kötés alacsony affinitású.

A továbbiakban a PKC-vel katalizált foszforiláció hatását vizsgáltuk a GAP aktivitásra, valamint a lipid kötésre. Megállapítottuk, hogy a foszforiláció önmaga nem befolyásolja a p190GAP aktivitását, viszont kivédi a lipidek módosító hatását. Tehát solubilis formában a p190 hatékony RhoGAP és gyenge RacGAP, PS jelenlétében viszont gyenge RhoGAP és aktív RacGAP. A foszforilált fehérje azonban PS jelenlétében is hatékony RhoGAP és gyengül a RacGAP aktivitása. Lipid-kötési kísérleteinkben megállapítottuk, hogy PKC-vel történő foszforiláció megakadályozza a p190 kötődését PS vezikulákhoz.

A korábban elkészített, a PKC-foszforilációs helyeken alanint vagy aszparagint tartalmazó mutánsaink segítségével megállapítottuk, hogy a három, PKC-vel foszforilálható aminosav nem egyforma szerepet játszik a szabályozásban: a foszfolipid kötés módosításához a S1221 valamint T1226 aminosavak foszforilációja szükséges, míg a S1236 foszforilációja nem befolyásolja a lipid kötési képességet. A kritikus pozíciókban aszparagin nem tudja helyettesíteni a foszforilálható aminosavakat.

Kísérleteinkben először mutattuk ki, hogy a kovalens módosítás önmagában nem befolyásolja egy GAP fehérje katalitikus aktivitását, viszont meghatározza lokalizációját, és ezen keresztül a p190 szubsztrát specificitását.

Az eredményeinket összefoglaló kéziratot 2007-ben elküldtük a Journal of Biological Chemistry-nek, amely sejtes rendszerben végzett kiegészítő kísérleteket kívánt. A különböző mutánsainkat tartalmazó fehérjéket zöld vagy piros fluoreszcens fehérjékhez kapcsoltan kifejeztük COS valamint NIH3T3 sejtekben és megvizsgáltuk eloszlásukat. Időközben megszereztünk olyan fluoreszcens próbákat, amelyek a PS felszín, valamint a foszfolipid felszín töltéssűrűségének jellemzésére voltak képesek. Konfokális mikroszkópos vizsgálatokban meghatároztuk a vad-típusú és a mutáns p190 fehérjék kolokalizációját ezen próbákkal. Ezen kísérleti eredményeinkkel kiegészített kéziratunkat még mindig nem fogadta el a JBC. Ezután közel egy éven keresztül összesen 6 folyóiratnak küldtük be az adott előírásoknak megfelelően módosított kéziratot, míg végül 2009 júniusában a Biochemistry c. folyóirat elfogadta (**Lévay et al. 2009**).

Egy további munkában megvizsgáltuk a GSK-3 enzimmel történő foszforiláció hatását a p190 fehérje GAP aktivitására. Azt találtuk, hogy a PKC-vel történt foszforilációtól eltérően, a GSK-3-al végzett kovalens módosítás csökkenti mindkét szubsztrátra (Rho valamint Rac) kifejtett GAP-hatást. Ezek az eredmények 2008-ban megjelentek a Journal of Biological Chemistry-ben (**Jiang et al. 2008**).

P190GAP-on végzett kísérleteink nyújtják az első kiterjedt vizsgálatot arról, hogy egy GAP molekula eltérő helyen, eltérő enzimmel történő módosítása nagymértékben eltérő hatással járhat. Ebből a kísérleti anyagból készíti el dr. Lévay Magdolna a PhD értekezését, amelyet várhatóan jövő év elején fog benyújtani a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolájában.

### ***A neutrofil granulociták élő funkciójának szabályozása***

Eredeti célkitűzésünk a p190GAP szerepének vizsgálata volt. A tervezett kísérleteket el is végeztük Dr. Mócsai Attila munkacsoportjával együttműködésben. Megszereztük a p190A<sup>-/-</sup> egértörzset Settleman professzor bostoni munkacsoportjától. Ezek az egerek többnyire halva születnek, vagy a születést követő néhány órán belül elpusztulnak. Granulocitáik vizsgálata így csak az embriókból kinyert csontvelő átültetését követően lehetséges. Mócsai dr. beállította idehaza az egerek besugárzását és csontvelő transzplantációját, és a saját munkacsoportja végezte a granulocita-funkciók részletes vizsgálatát. A mi munkacsoportunk az ölési tesztekét végezte el, amelyekben semmilyen különbséget nem tapasztaltunk a normál, nem-kezelt állatok sejtjeihez képest. A standard módon alkalmazott baktériumölési tesztünket több irányban is módosítottuk, annak érdekében, hogy esetleges kicsi különbségeket is detektálni tudjunk, de semmilyen körülmények között nem találtunk különbséget. Tehát a p190GAP részvétele nem tűnik szükségesnek a neutrofil granulociták baktériumölési tevékenységéhez.

A **negatív eredmények** közlése nem kecsegtet sok reménnyel, de az összes adat együttes közlésével megpróbálkozunk.

A kutatási periódusban viszont felmerült egy érdekes újabb probléma: a témában korábban alapvető felfedezéseket tevő A.W.Segal munkacsoportja nagyhatású közleményt jelentetett meg a Nature-ben arról, hogy a fagociták baktériumölésében alapvető szerepet játszana egy Ca<sup>2+</sup>-al aktiválható, nagy-pórusú K<sup>+</sup> csatorna. Kísérletei egy részét megismételtük, de nem tudtuk eredményeit reprodukálni. Eredményeinket bemutattuk nemzetközi konferenciákon is (Európai Fagocita Konferencia, Gordon Konferencia), ahol kiderült, hogy egyetlen munkacsoportnak sem sikerült a Nature-ben megjelent eredmények közül bármit is reprodukálnia. Egy közös közleményt készítettünk, amelyben 4 különböző laboratórium elektrofiziológiai, immundetektálási, valamint funkcionális méréseit összegeztük. Hosszú küzdelem után a J. of General Physiology-ban jelent meg a közlemény (**Femling et al. 2006**).

Segal professzor felvetéséből kiindulva részletesen megvizsgáltuk mind a humán vérből, mind az egér csontvelőből preparált neutrofil granulociták baktériumölési képességét eltérő ion-összetételű (alacsony ill. magas K<sup>+</sup> vagy Cl<sup>-</sup> tartalmú) közegben. Sem a K<sup>+</sup> sem a Cl<sup>-</sup> koncentráció nem gyakorolt lényeges hatást a baktériumölésre. Eredményeinket a Seminars in Immunopathology-ban közzöltük (**Rada et al. 2008**).

### ***A prenil csoport szerepe a kis G-fehérje és GAP interakcióban***

Korábbi kísérleteinkben a p50GAP esetében jelentős különbséget tapasztaltunk a rovarsejtben kifejezett, poszttranszlációsán módosított (preniláció, hasítás, metilálás) valamint a baktériumban kifejezett, módosítatlan G-fehérjével való interakcióban. Újabb

kísérleteinkben kimutattuk, hogy ez nem kizárólag a p50GAP-ra jellemző tulajdonság, mivel a p190GAP esetében ugyancsak jelentős különbséget tapasztaltunk a prenilált és nem-prenilált Rac-ra és Rho-ra kifejtett GAP-aktivitásban. Ezenfelül nem-prenilált G-fehérjék alkalmazásakor az előzőekben részletezett lipidreguláció sem figyelhető meg.

A preniláció módosító hatása azonban nem tekinthető a Rho/Rac családra ható GAP fehérjék általános tulajdonságának, mivel az általunk felfedezett ARHGAP25 esetében ez nem volt megfigyelhető.

A prenil csoport szerepére vonatkozó adatainkat a *Methods in Enzymology* speciális, a Rho/Rac családdal foglalkozó kötetében jelentettük meg (**Ligeti and Settleman, 2006**).

### ***Oxidált lipidek hatása a NADPH oxidáz működésére***

Ezek a kísérletek nem szerepeltek a pályázat eredeti munkatervében. A Bécsi Orvosegyetem Immunológiai Intézetének munkacsoportja keresett meg azzal a megfigyeléssel, hogy oxidált foszfolipidek gátolják izolált granulociták szuperoxid termelését. Azonban a mechanizmust nem tudták azonosítani, mivel nem tudták az oxidált izolált körülmények között aktiválni. A mi laboratóriumunk viszont a korábbiakban több közleményben is beszámolt ilyen eredményekről. Ezért javasoltak nekünk együttműködést.

In vitro aktiválási rendszerünkben vizsgálva az oxidált foszfolipidek hatását megállapítottuk, hogy azok gátolják az aktív enzim-komplex összeépülését a membránhoz kötött és citoszolikus alegységekből, viszont nem befolyásolják a kialakult fehérje-komplex katalitikus aktivitását.

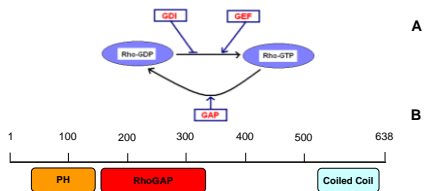
Az eredményeinket tartalmazó közlemény 2008-ban jelent meg a *Journal of Immunology*-ban (**Blüml et al. 2008**).

# Az ARHGAP25 a Rac kis G fehérjén keresztül szabályozza a neutrofil granulociták fagocita funkcióit

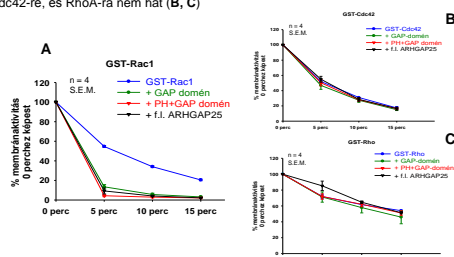
Csépányi-Kömi Roland\*, Lázár Enikő, Sirokmány Gábor, Geiszt Miklós, Ligeti Erzsébet  
Simmelweis Egyetem, Élettani Intézet

\*rcsepanyi@gmail.com

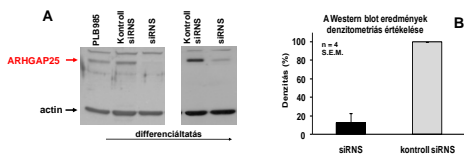
1. ábra: A; a monomer G fehérjék szabályozói; B; az ARHGAP25 doménszerkezete



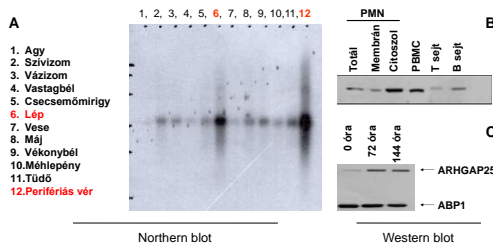
3. ábra: az ARHGAP25 *in vitro* a Rac kis G fehérje GTP hidrolízisét serkenti (A), Cdc42-re, és RhoA-ra nem hat (B, C)



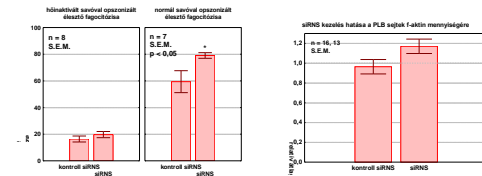
4. ábra: siRNS kezeléssel mintegy 20%-ára csökkentették az ARHGAP25 fehérje mennyiségét a PLB985 sejtekben. Kontrollként a hatékony siRNS szekvencia minimális módosítását alkalmaztuk (A, B).



2. ábra: az ARHGAP25 lépben és a perifériás vér sejtjeiben található jelentős mennyiségben (A). Kimutatható granulocitákban (PMN), mononukleáris sejtekben (PBMc), T és B sejtekben (B). PLB985 neutrofil sejtvonalban expressziója a differenciáltatás során növekszik (C).



5. ábra: a hatékony siRNS-sel kezelt PLB sejtek fagocitáló képessége - a kontroll siRNS-sel kezelt sejtekhez képest - hőinaktivált savóval opsonizálva csak csekély, míg normál, kevert savóval opsonizált élesztőket esetében szignifikáns különbséget mutatott (A). Az siRNS kezelés hatására megemelkedett a PLB sejtekben az f-aktin mennyisége (B).



6. ábra: PMA stimulárra adott szuperoxid-termelést mérve nem tudtuk kimutatni szignifikáns eltérést a hatékony és a kontroll siRNS-sel kezelt klónok között (A). Opsonizált zymosanral stimulálva jelentős különbség mutatkozott (B), amely az opsonizáló savó hőinaktiválásának hatására eltűnt (C).

