

Záróbeszámoló

„A Rho/Rac család GTPáz fehérjéire ható aktiváló proteinek kifejeződése és részvétele specifikus sejtműködésekben” c. kutatási témáról

A kutatási terv fő célkitűzése a kis G-fehérjék Rac/Rho családjára ható GTPáz aktiváló fehérjék (GAPok) szöveti eloszlásának és specifikus élettani hatásainak vizsgálata volt. A kutatási periódusban a pályázat munkatervében vállalt fő feladatokat teljesítettük.

1. A Rac/RhoGAPok kifejeződése különböző szövetekben.

Nyilvános adatbázisokra alapozva proteomikai kutatást végeztünk. A humán genom projekt adatai alapján mintegy 70 fehérje rendelkezik olyan konszenzus-szekvenciával, ami Rac/RhoGAP aktivitásra utal. Ezen lehetséges fehérjék kb. 50%-a még nem került kifejezésre, tehát tényleges Rac/RhoGAP aktivitásuk nem ismert. Saját kutatásainkban a lehetséges 70 fehérje közül 54 fehérjét sikerült azonosítani EST adatbázisokban és meghatároztuk ezek előfordulási gyakoriságát egészséges, valamint tumor szövetekben. Összehasonlítható körülmények között végzett mikroarray kísérletek adatbázisaiban 45 Rac/RhoGAP fehérjét sikerült azonosítanunk. Ezek kifejeződési szintjét a GAPDH szintre vonatkoztatva fejeztük ki 20 szövetre vonatkozóan. Ezenfelül összegyűjtöttük 70 Rac/RhoGAP-ra vonatkozóan a különböző adatbázisokban szereplő hivatkozási számot, az összes szinonim nevet, a kromoszómális lokalizációt valamint a fehérje várható hosszát. Adatainkat az egységes nomenklatúra alkalmazásával közöltük a **Small GTPases** című, a szakterület profiljába vágó, a közelmúltban indított folyóiratban. Kutatásainkkal elsőként nyújtottunk információt a különböző szövetek és sejtféleségek Rac/RhoGAP „repertoire”-jára vonatkozóan. Ez a szöveti „GAP-térkép” jelentősen támogatja saját munkacsoportunk és mások további kutatásait is.

2. Rac/RhoGAPok specifikus élettani szerepe.

Az általunk kidolgozott adatbázis hívta fel a figyelmünket az ARHGAP25 fehérjére, amely Northern blot analízisben vérsejt-specifikusnak bizonyult, és

granulocitákban jelentős mennyiségűnek tűnt. Előkísérleteinkben megklónoztuk ezt a fehérjét és megállapítottuk, hogy a család tagjai közül kizárólag a Rac fehérjével reagál. Tehát egy vérsejt-specifikus RacGAPot azonosítottunk.

Sikerült saját fejlesztésben megbízható antitestet kifejleszteniünk és ezzel meghatároztuk a fehérje kifejeződését. Minden vizsgált vérsejt-típusban (granulocita, T és B limfocita, monocita) megtalálható, és kifejeződik a granulocita-funkciók vizsgálatára alkalmazott modell sejtben, a PLB-ben is. Hiányzik viszont a másik gyakran használt modell sejtéből, a COS-Phox sejtéből. Az ARHGAP25 sejtéletteni szerepét ebben a két modell sejtben vizsgáltuk.

A COS-Phox sejtek kifejezik a fagocita NADPH oxidáz enzim összes alkotórészét, valamint rendelkeznek IgG-kötő Fc receptorral és jól transzfektálhatóak. Ebben a modell sejtben elsőként az ARHGAP25 sejtben belüli szubsztrát-specifitását vizsgáltuk. A Rac-aktivitás fokozódására jellemző sejt-fodrozódást és a fibrilláris aktin felszaporodását a lamellipódiumokban konfokális mikroszkópban, festett sejteken vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a fluoreszcens jelzéssel ellátott ARHGAP25-öt kifejező sejtekben kevesebb, mint 30%-ra csökkent az EGF-fel stimulált fodrozódás. A Rho-aktiválódást jelző stressz rost képződésben viszont nem láttunk különbséget. Tehát az ARHGAP25 sejt körülmények között – az in vitro mérésekkel megegyezően – RacGAP hatásának bizonyult.

Ezt követően megvizsgáltuk az ARHGAP25-öt kifejező COS-Phox sejtek fagocitózis képességét konfokális mikroszkópos mérésekben. Fluoreszcensen jelzett, opsonizált élesztőt alkalmazva, a transzfektált sejtek szignifikánsan kisebb arányban és kevesebb számú részecskét vettek fel, mint a nem transzfektált kontroll sejtek, vagy a hatástalan GAP domét tartalmazó ARHGAP25-tel transzfektált sejtek.

Meglepő módon, egy másik RacGAP, a p50GAP (újabb nomenklatúrában ARHGAP1) transzfekciója nem csökkentette a COS-Phox sejtek fagocitózisát, bár ez a fehérje hasonlóan intenzív RacGAP hatással rendelkező sejt körülmények között, mint az ARHGAP25. Előkísérleteink szerint viszont a p190GAP az ARHGAP25-höz hasonlóan csökkentette a fagocitózist. Itt tehát a RacGAP-ok közötti „munkamegosztás” egy konkrét jelét detektáltuk.

PLB sejtekben az ARHGAP25 a differenciáció során jelenik meg, és 7. napon, amikor a neutrofilokra jellemző funkciók maximálissá válnak, az ARHGAP25 is jól

detektálható. Ezekben a sejtekben a fehérje csendesítését a differenciáció során alkalmazott ismételt shRNS kezeléssel értük el. A csendesített sejtekben a teljes szérummal opsonizált élesztő fagocitózisa szignifikánsan emelkedett. Ugyancsak emelkedett az ARHGAP25-csendesített sejtekben a polimerizált aktin mennyisége, valamint a fagocitózist kísérő szuperoxid termelés. A fagocitózis fokozódását az ARHGAP25 csendesítését követően primer humán monocitákban is megfigyeltük.

Mind transzfektált COS-Phox sejtekben, mind izolált humán neutrofil granulocitákban az ARHGAP25 dúsulását észleltük a fagoszómák körül. ARHGAP25 transzfekciós és a csendesítési kísérleteink ellentétes irányú változást eredményeztek a vizsgált sejtek fagocitózisában. A COS-Phox sejtekben Fc receptor fejeződik ki, méréseink szerint a PLB sejtek viszont elsősorban komplement-receptort tartalmaznak. Mindezek alapján megállapítottuk, hogy az ARHGAP25 a fagocitózis negatív szabályozója, ami feltehetőleg mindkét típusú opsonin-receptor (Fc-és komplement-receptor) által elindított szignál-útban szerepel. Eredményeinket a **Blood** folyóirat (IF= 9,8) közölte 2012-ben.

A sejt kultúra laboratóriumunkban bekövetkezett súlyos fertőzés következtében a kutatási periódus végére sajnos mindkét jól bevált modell sejt vonalunkat (csendesített PLB és transzfektált COS-Phox) elvesztettük. A hosszas transzfekciós-szelekciós eljárás megisméltése – ami még mindig csak modell sejteket eredményezett volna – helyett más kísérleti megközelítést határoztunk el. Az ARHGAP25 élettani szerepének tanulmányozásában több eredmény várható teljes állatmodell vizsgálatától. Ezért beszereztük az ARHGAP25 gén-deficiens egértörzset. A tenyésztést sikerült beállítanunk, és megkezdjük az izolált granulociták vizsgálatát. Ez a megközelítés primer sejteken több funkció párhuzamos és élettani meghatározását teszi lehetővé.

3. Rho/RacGAP fehérjék szabályozása.

A p190GAP fehérjéről korábban, in vitro körülmények között megállapítottuk, hogy a polibázikus részen keresztüli foszfolipid kötés megváltoztatta a szubsztrát-specifitását, csökkentve a RhoGAP és növelve a RacGAP hatást. A polibázikus részen belüli szerin és treonin aminosavak foszforilációs szintje befolyásolja a savanyu foszfolipidekhez történő kötődést. Ez egy eddig példa nélküli szabályozási

mechanizmus, ami a Rac és Rho fehérjék számos sejtben megfigyelt antagonizmusát helyileg nagyon finoman szabályozhatja. Megfigyeléseink ellentétesek voltak a néhány korábbi, szintén sejtes rendszerben közölt eredményre alapozott általános hittel, amely szerint a p190GAP csak a Rho-fehérjére hat. Jelen kutatási periódusban sejtes rendszerben végzett kísérleteinkkel egyértelműen bebizonyítottuk, hogy a p190GAP sejten belül is képes RacGAP-ként működni, és ebben a polibázikus régió kulcs-szerepet játszik, hasonlóan a korábban, in vitro körülmények között nyert eredményeinkhez.

Elsőként specifikus kötőfehérje alkalmazásával (PAK-pull-down módszer) megállapítottuk, hogy a teljes p190 fehérje kifejezése nagymértékben csökkenti az aktív, GTP-t kötött Rac fehérje mennyiségét, de ez nem következik be, ha a transzfekeció a polibázikus domént nem tartalmazó mutánsal történik. Fordított eljárásban, a p190GAP hiányában (deficiens egerekből származó sejteken) az aktív Rac mennyisége növekedett. Ezt követően biológiai hatás alapján, a Rac fehérje ismert, fodrozódást serkentő hatása alapján bizonyítottuk, hogy a polibázikus régió szükséges a RacGAP aktivitáshoz. Kontroll méréseinkben bemutattuk, hogy a RhoGAP hatáshoz nem szükséges a polibázikus domén, ellenkezőleg hiányában fokozódik a RhoGAP hatás. Ezen kísérleteinket szintén specifikus kötőfehérje (Rhotekin pull-down) alkalmazásával, valamint a Rho fehérje aktivitását tükröző biológiai tesztekkel (stressz-rost képződés, sokmagvú sejtek keletkezése) végeztük. A közlemény a **Cellular Signaling** c. folyóiratban jelent meg 2013-ban.

A p190GAP fehérje kritikus aminosavainak (S1221 és T1226) foszforilációját in vivo körülmények között hely-specifikus foszfo-antitestek segítségével egy amerikai munkacsoporttal együttműködve kezdtük meg. Párhuzamosan végeztünk kísérleteket áramlási citométerben, ahol nagy sejtszámon tudtuk a foszforilálódás tényét megállapítani, és konfokális mikroszkópban, ahol a foszforilált és nem foszforilált fehérje sejten belüli megoszlását tudtuk vizsgálni. Eddig csak a protein kináz C-t direkt stimuláló PMA hatását vizsgáltuk, ami a S1221 egyértelmű foszforilációját eredményezte. Jelenleg az eredmények proteomikai megerősítésére várunk, azt követően kezdjük meg a különböző fiziológiás stimulusok vizsgálatát.

Megkezdjük a p190GAP foszforiláció szerepének vizsgálatát a fehérje korábban leírt áthelyeződésében is. Előkísérleteink szerint a polibázikus régió hiánya nem befolyásolta a sejtmembránhoz történő lokalizációt. A különböző töltésű régiókat

jelző fluoreszcens próbákkal kapott eredményeink nem teljesen egyértelműek, így ezen a területen további vizsgálatok szükségesek.

A pályázat benyújtásakor terveztük a p50GAP szabályozásának további vizsgálatát. Elsősorban a korábbi, in vitro vizsgálataink alapján leírt auto-inhibíció megerősítését és a kis G-fehérje szubsztrát prenilációs állapotának meghatározó szerepét kívántuk alátámasztani. Egy német munkacsoporttal együttműködve a fehérje kristályosítását próbáltuk meg. Ehhez mi elkészítettünk jelentős számú rövidített és módosított konstruktot, de sajnos a kifejezett fehérjék egyikét sem sikerült kristályosítani. Ezért ezt a kutatási irányt átmenetileg felfüggesztettük.

4. Publikációs tevékenység.

A kísérleti adatok kapcsán említett közleményeken kívül további jelentős publikációkat készítettünk. A témavezető felkérést kapott az igen rangos ***Physiological Reviews*** folyóirattól a GAPok élettani és patológiai szerepét összefoglaló közlemény készítésére. Ez 2012-ben jelent meg. Ugyancsak felkérésre készített a munkacsoport egy kommentárt a Rac/RhoGAPok átfedő ill. specifikus funkcióiról a ***Small GTPases*** folyóirat számára, valamint a kis G fehérjét szabályozó fehérjék eltéréseiről endokrin kórképekben a ***Molecular Endocrinology*** folyóirat számára. A biológiai folyamatok leállításában szereplő mechanizmusokat a skandináv ***Acta Physiologica*** felkérésére, a neutrofil granulociták közelmúltban megismert funkcióit a ***Pflüger's Archiv*** számára foglaltuk össze. A témavezető a ***Wiley*** kiadó felkérésére egy angol nyelvű farmakológia tankönyvben megjelenő fejezetben foglalta össze a kis G-fehérjéhez kötött szabályozás farmakológiai szempontjait. A tankönyv várhatóan 2014 második felében jelenik meg.

A kutatási periódusban ***két PhD disszertáció, egy BSC és négy orvosi diplomamunka*** született.