

XXXI. OTDK Biológiai Szekció 2012.

Új kapcsoló a Rho-család aktivitásában: egy transzmembrán proteoglykán

készítették:

Bárkovics Bonita, III. évf.

Semmelweis Egyetem, ÁOK,

Kaszás Krisztina, III.évf.

Nyugat-Magyarországi Egyetem, Savaria Egyetemi Központ

Biológus szakirány

Témavezető: Dr. Szilák László docens,

NyME, SEK

1. Tartalomjegyzék

2. Bevezetés.....	3
2.1. G fehérjék csoportosítása	3
2.1.1. Nagy GTP-ázok	3
2.1.2 Szabályzó GTP-ázok.....	3
2.1.2.1 Heterotrimer G fehérjék.....	4
2.1.2.2 Kis GTP-ázok	4
2.1.2.3 Kis GTP-ázok csoportosítása.....	5
2.2 Rho GTP-ázok.....	6
2.2.1 Rho GTP-ázok aktiválási ciklusa.....	7
2.2.2 Kis GTP-ázok aktivitásának szabályzása.....	7
2.2.2.1 GEF regulációja.....	8
2.2.2.2 GAP gátlás.....	8
2.2.2.3 Szabályozás GDI-n keresztül.....	8
2.3 A transzmembrán syndecan-4 szerepe a jelátvitelben.....	9
2.3.1 A syndecan család ismertetése.....	9
2.3.2 Syndecan-4 szerepe a szignál átvitelben.....	11
2.3.3. A syndecan-4 szerepe a Rac1 aktivitás kialakításában.....	11
3. Célkitűzés.....	12
4. Anyagok és módszerek.....	13
4.1 Humán szöveti sejtek fenntartása, transzfekció ismertetése.....	13
4.2 Western blot és Rac/Rho aktivitás esszé.....	13
4.3 Használt DNS konstrukciók.....	14
5. Eredmények	15
5.1 A syndecan-4 foszforilációs állapota befolyásolja a Rac1 aktivitását.....	15
5.2 Rho-GDI foszforilációjának vizsgálata.....	16
6. Összefoglalás és diszkusszió	18
7. Felhasznált irodalom.....	19
8. Nyilatkozat.....	22

2. Bevezetés

A guanine nukleotid kötő fehérjét röviden G fehérjének nevezzük. A sejtben gyakorlatilag minden fontosabb folyamatban szerepük van, a sejtosztódástól a differenciációig. A G fehérjék konformációja alternál a GTP és a GDP kötött forma között. A G fehérjék képesek autokatalízissal a GTP-t GDP-vé hidrolizálni ezért GTP-ázoknak is nevezhetjük őket. A hidrolízis sebessége változó, bizonyos faktorok gyorsíthatják, vagy éppen lassíthatják.

A G fehérjét többféle képpen csoportosíthatjuk, például méret szerint, funkció szerint, előfordulásuk alapján. Működési elvük azonban közös. Van egy enzim, a guanin cserélő faktor (GEF), amely a G fehérjére specifikusan képes a GDP – GTP cserét katalizálni (Bos és mtsai., 2007).

2.1 G fehérjék csoportosítása

Az egyik csoportosítási lehetőség az aktivitás szerinti osztályozás. Ezek szerint megkülönböztetünk GTP-kötő motor fehérjét (dinaminok) és szabályozó G fehérjét, amik lehetnek receptor-kapcsolt heterotrimer G fehérjék, valamint kis GTP-ázok.

2.1.1 Nagy GTP-ázok

A nagy GTP-ázokhoz tartoznak a dinamin család tagjai. Ezek motor fehérjék, GTP hidrolízissal a vezikulák lefűződését katalizálják. A befűzések nyaki részénél dinamin dimerek spirálisan összekapcsolódnak, mintegy gallért formálva és egy rotációs, csavaró mozgással addig szorítják a membránt, amíg a vezikula leszakad a plazmamembránról (Molecular Biology of the Cell, 5. kiad.).

2.1.2 Szabályzó GTP-ázok

A szabályozó GTP-ázokat két részre oszthatjuk, a szignál transzdukcióban direkt résztvevő receptor-kapcsolt heterotrimer G fehérjék családjára, és kis GTPázokra. Közös

jellemzőjük, hogy általában egy lipid láncon keresztül membránhoz horgonyozódnak (Bos és mtsai., 2007).

2.1.2.1 Heterotrimer G fehérjék

A heterotrimer G fehérjék a hét transzmembrán domaint tartalmazó receptorokhoz kapcsolódnak. A receptor alapállapotban a GDP kötött $G\alpha$, és ehhez szorosan kapcsolódó $G\beta$ és $G\gamma$ alegységekből álló trimert köti. Megfelelő ligand kapcsolódása következtében a receptorban konformációs változás következik be és GEF-ként fog funkcionálni, azaz lecseréli az α alegységben a GDP-t GTP-re. Ekkor megváltozik az $G\alpha$ alegység konformációja, és a trimer szétesik. A GTP-kötött α elválik a $G\beta\gamma$ heterodimertől és a receptorról disszociálnak. Az aktív $G\alpha$ az effektorain keresztül másodlagos jelátviteli molekulák képződését indukálja, mint cAMP, vagy IP₃ (inozitol-trifoszfát), diacilglicerol, szabályozva például a neurotranszmittereket, ioncsatornák működését.

A $G\alpha$ -t két fő csoportra oszthatjuk a stimuláló, és az inhibitor tulajdonságú $G\alpha_i$ csoportra. A stimuláló csoportba a $G\alpha_s$, G_q , $G_{12/13}$ tartoznak. A $G\alpha_s$ aktiválja az adenilát cikláz, a G_q a phospholipáz C β -t, a $G_{12/13}$ pedig a Rho GTP-ázokat (ld később).

2.1.2.2 Kis GTP-ázok

A kis GTPázok alatt főként a Ras szupercsaládot értjük. Általában 21 kDa méretű fehérjék, amelyek kapcsolóként működnek. GTP vagy GDP kötött állapotuktól függ a konformációjuk, így megkülönböztetünk két állapotot: a GTP-kötött aktív, és a GDP-kötött inaktív. A GDP – GDP cserét a GEF enzimek katalizálják. A GTP hidrolízisének sebességét a GTP-áz aktiváló proteinek (GAP) fokozzák, akár több nagyságrenddel lecsökkentve a GTP-kötött forma életidejét. A Ras család kivételével a kis GTP-ázok is membránkapcsoltak egy tetraterpén lipidfarkon keresztül. Az aktivitásuk szabályzásába még egy faktor a GDP disszociációs inhibitor (GDI) kapcsolódik be (1. ábra). Nagyon gyakran a különböző GTP-áz alcsaládok tagjai képesek egymást kereszt-aktiválni, pl. $G\alpha$ – Ras, $G\alpha$ – Rho.

2.1.2.3 Kis GTP-ázok csoportosítása

A kis GTP-ázokat gyakran emlegetik úgy, mint Ras szupercsalád tagjai. Általában nyolc további családba soroljuk őket: **Ras, Rab, Arf, Rho, Ran, Rheb, Rap, Rad.**

Ras családba HRas, KRas és NRas tartozik. Mivel effektor proteinjeik a sejtciklus szabályzó enzimek (pl. MAPK) aktiválásában vesznek részt, így domináns aktív mutációjuk bizonyos ráktípusoknál (pl. pancreatikus tumornál) 90%-ban a kiváltó oknak bizonyult. A rosszindulatú daganatos elváltozások 30 %-nak a kialakulásáért a Ras mutációk tehetők felelőssé (Downward, 2003).

Rab család talán a legnépesebb, eddig kb. 70 tagja ismert. Fő funkciójuk a membrán-vezikula áramlás, vezikula-lefűződés, membrán fúzió szabályozásban van. Jellemző a család elemeire a sejtorganellumokra való nagyfokú specifikitásuk, vagyis markerei lehetnek az egyes sejtorganellumoknak. Így a Rab5C a korai endoszóma, Rab7 kései endoszóma és retrográd transzport, Rab11 recirkuláló endoszóma, Rab35 intercelluláris híd specifikus markerei. A különböző Rab GTP-ázok biztosítják a motorfehérjék (dinein, kinezin) és a vezikulák kapcsolatát, vagyis, mint útvonal jelzőként funkcionálnak. Nagy valószínűséggel a vezikulák belső lumenében lévő, szállításra váró molekulák (cargo) meghatározzák a vezikula-membrán külső felszínén a specifikus Rab GTP-ázokat (Stenmark és Olkkonen, 2001)).

Arf csoport tagjai fő regulátorai a vezikula biogenezisnek és intracelluláris vezikula szállításnak. Az Arf GTP-ázok aktiválásának blokkolása a Golgi hálózat felbomlásához vezet.

Rho család legismertebb tagjai a RhoA, Rac1, és Cdc42. Szerteágazó folyamatokban játszanak fontos szerepet, úgy mint differenciáció, sejtosztódás, apoptózis stb. Későbbiekben részletesen elemezzük szerepüket.

Ran GTP-áz sok szempontból elkülönül a többi GTP-áztól, egyrészt, mert nincs a membránhoz horgonyozva, hiányzik a lipid, másrészt eddig csak egy eleme ismert. Szerepe a

magi transzport irányításában van. A Ran-GDP forma a nukleáris importot, a Ran-GTP forma pedig a magból történő exportot teszi lehetővé.

Rheb GTP-ázt a TOR kináz szabályzójaként fedezték fel, azonban már több effektora ismert, pl. C-Raf, TSC2 stb. Rheb GTP-áz nagyobb koncentrációban az agyi idegsejtekben fordul elő, neve is innen ered (Ras homolog enriched in brain/ feldúsult Ras homológ az agyban). Szerepét és a neuroplaszticitásban írták le. A TOR irányításával a növekedés, tápanyag forgalom és sejtciklus fenntartásában jut eszcenciális szerephez.

Rap GTP-áz a cAMP szintézisben, Ca felszabadításban, és a diacil-glicerol képzésben játszik szerepet. Lévéen Ras homológ (Ras related protein) sokáig Ras antagonistának gondolták, azonban mára bebizonyosodott, hogy semmiben sem interferál a Ras-al, más GEF-ek, GAP-ek aktiválják, és az effektorai is eltérőek. A sejtben a belülről kifelé irányuló szignálutakban tölt be fontos szerepet, így az integrinek, fokális adhéziók, és egyéb sejtadhéziók szerveződésében, létrejöttében (Jeyaraj és mtsai., 2012).

Rad GTP-ázok kicsit nagyobbak a Ras család tagjainál 35 kDa méretűek. Idetartoznak még a Gem, Kir GTP-ázok is. Először II. típusú diabetesben szenvedők vázizmából izolálták, innen ered az elnevezése (Ras associated with diabetes/ diabetésszel asszociált Ras). Rad effektora a calmodulin és a calmodulin-dependens protein kináz (CaMKII). Szívizomban szabályozza a myocardium L-típusú Ca csatorna aktivitását és gyengíti a β -adrenerg receptor (β -AR) aktivitását.

2.2 Rho GTP-ázok

A Rho családot klasszikusan 3 fő csoportra osztjuk Rho, Rac, Cdc42. Jelenleg 12 izoformát különböztethetünk el (Rho (A, B, C); Rac1,2,3; Cdc42; TC10; TCL; Chp(1,2); RhoG; Rnd(1,2,3); RhoBTB(1,2); RhoD; Rif; TTF). A közülük a legjobban jellemzettek a RhoA, Cdc42, Rac1. Aktivitásuk nagyon precízen szabályozott legalább 34 Rho – GEF (Schiller, 2006) és több, mint 70 inaktiváló GAP (GTPase- aktiváló protein) ismert (Kandpal, 2006), ugyanakkor

csak 3 Rho-GDI-t (1-3) azonosítottak, amelyek kapcsolódni tudnak a család összes elemével (DeMardirossian and Bokoch, 2005).

2.2.1 Rho GTP-ázok aktiválási ciklusa

A guanin cserélő faktorok (GEF) nagy affinitással kötik a GDP-vé hidrolizált GTP-áz formát. A GEF enzimek fellazítják a GDP- GTP-áz közötti kötéseket, majd a sejtben kb. egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációjú GTP kiszorítja a GDP-t. Ennek következtében GTP töltött GTP-ázban konformáció változás következik be, ami viszont a GTP-kötött aktív formának a disszociációját idézi elő (Bos et al., 2007).

Habár GTP-ázokról beszélünk, de az endogén GTP-áz aktivitás igen csekély, azaz a GTP hidrolízise lassú, így a GTP-kötött forma igen stabil. A folyamatot több nagyságrenddel felgyorsítják a GTP-áz aktiváló proteinek (GAP). Szemben a GEF-ekkel a GAP-ek szerkezete nem konzervált, a különböző GAP-ek eltérő módon fokozzák a GTP-áz aktivitást éppen ezért bioinformatikai felismerésük nem egyszerű (Bos et al., 2007).

GEF-ek és GAP-ek nagyon fontosak az aktiválási körfolyamatban, azonban létezik még egy szabályozó szint, amit a GDP disszociációs inhibitorok (GDI) testesítenek meg. Nevük onnan ered, hogy hozzákapcsolódnak a GDP töltött GTP-ázokhoz ezzel meggátolva a GDP – GTP cserét. Működési mechanizmusuk közös, a lipid-farkon keresztül kiextrahálják a kis GTP-ázokat a membránból a citoplazmába. Tehát négy biológiai funkciót is ellátnak: gátolják a GDP disszociációt, a GTP töltött formánál akadályozzák a hidrolízist, szabályozzák a membránban lévő GTP-ázok mennyiségét, kiextrahálva, vagy éppen visszavezetve a citoszolban lévő GTP-ázokat, és végezetül chaperonként védik a GTP-ázokat (DeMardirossian és Bokoch, 2005; Boulter et al., 2010). Habár a Rho GTP-áz család igen népes mégis csak három human Rho-GDI ismert, Rho-GDI 1-3 (Garcia-Mata et al., 2011).

2.2.2 Kis GTP-ázok aktivitásának szabályozása

Kis GTP-ázok aktiválási- dezaktiválási ciklusa a biokémiai körfolyamatokhoz hasonlóan több helyen gátolható. Azonban a ciklus megakasztása egy pontban a teljes körfolyamat leállítását eredményezi. A kis GTP-ázok körfolyamatának három kulcs lépés van: GDP-GTP csere, GTP

hidrolízis, és GDP-kötött forma extrakciója, tehát praktikusán ezeken a pontokon szabályozódik a ciklus.

2.2.2.1 GEF regulációja

A GDP – GTP cserét katalizáló enzimeknél felfedeztek egy természetes antibiotikumot, a Brefeldin A-t, ami GEF gátlónak bizonyult. A Brefeldin A egy nagy molekula, amely egy Arf-GEF-családot blokkol. Ma már az Arf-GEF-eket e szerint osztályozzák, hogy gátlódnak-e vagy sem. BrefeldinA jelenlétében a Golgi hálózat megszűnik, ez viszont lehetőséget ad a Golgi tanulmányozásra. A működési mechanizmusa az, hogy a Brefeldin A stabilizálja a terciér complexet, Arf-GTP-GEF, vagyis a GTP töltött Arf nem képes disszociálni az enzimről, mintegy csapdába kerül. Emiatt viszont a működő enzim elfogy a sejtől (Bos és mtsai., 2007)..

A PIX egy CDC42/Rac1 GEF. Amennyiben aktív CDC42-t köt, akkor csak Rac1-GDP-t fogad el szubsztrátjának, vagyis megszűnik CDC42-GEF-ként funkcionálni.

Egy igen érdekes és bonyolult a DOCK180-ELMO rendszer, ami egy Rack1 aktiváló komplex. RhoG-GTP bekötődik az ELMO-ba, ami így aktív konformációba kerül. Az aktivált ELMO olyan változást okoz a DOCK180-ban, amely Rac GEF-ként fog működni (Katoh és Negishi, 2003).

2.2.2.2 GAP gátlás

Mivel a GAP-ek szerteágazó szerkezettel és mechanizmussal rendelkeznek így nehéz egységes példán keresztül bemutatni szabályzásukat. A migrációban és a sejtek letapadásában szerepet játszó p190- RhoGAP-et többek között a GSK3 β kináz szabályozza. A citolinezisen szerepet játszó MgcRacGAP (Cyk-4) aktivitása alternál, alap esetben a Rac1, illetve ha az Aurora B kináz foszforilezi, akkor a RhoA aktivitását szabályozza (Bernards and Settleman, 2004).

Az α -Chimaerin egy Rac1-GAP, azonban csak diacil-glicerol kötés után válik aktívvá (Marland és mtsai, 2011). Tehát egy másodlagos szignálmolekula kapcsolja be.

2.2.2.3 Szabályozás GDI-n keresztül

A guanin disszociációs inhibitor kiextrahálja a kis-GTP-ázokat a membránból. Először a GDI lipid farokkal kémiai kötést alakít ki, aminek következtében a lipid a GDI-ra tekeredik, majd ezt követően kialakul egy kölcsönhatás a guanin nukleotidokkal is. Emiatt a GEF és más effektorok interakciója gátlódik, a GDI-kis-GTP-áz komplex vízoldható lesz és ezzel a citoszólba kerül. A kis-GTP-áz visszalépését a membránba a GDI speciális foszforilációja szabályozza. A Rho-család esetében 3 GDI ismert.

A Pak1 (p21 aktivált kináz) Rac1 és CDC42 effektor enzim. A Rac1-GDI kötés fellazítás a Pak1 – GDI foszforilálását követően (Ser174) a Rac1-GDP visszakerül a membránba, és ezzel az aktiválási körfolyamatba (DerMardirossian és Bokoch, 2004).

A RhoA-GDI kapcsolatot is egy foszforiláció szabályozza. A PKC α egy diacil-glicerol és Ca²⁺ szabályozás alatt álló kináz. Az aktivált PKC α a Ser96-t foszforilálja, aminek hatására a RhoA aktiválódik (Knezevic és mtsai, 2007). További vizsgálatok kiderítették, hogy ez a foszforiláció felszabadítja a RhoG-t is, amely pedig az előző fejezetekben jellemzett ELMO-DOCK180 komplexet aktiválja (Elfenbein és mtsai, 2009).

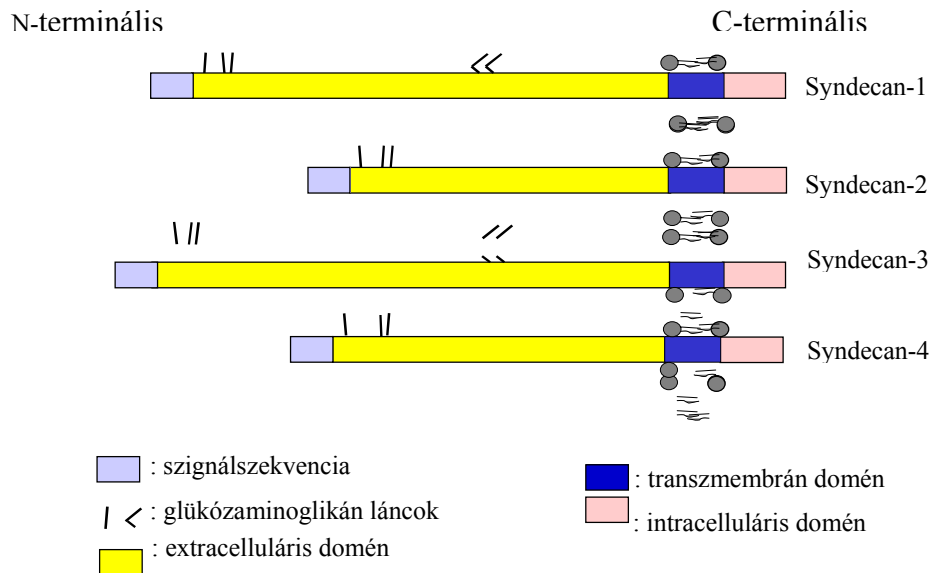
2.3 A transzmembrán syndecan-4 szerepe a jelátvitelben

2.3.1 A syndecan család ismertetése

A syndecanok I.-es típusú transzmembrán hepánszulfát-proteoglycanok. Négy egymáshoz közeli tagja van: a syndecan-1, -2, -3, -4. A syndecanok előfordulása szövetspecifikus: a syndecan-1 endothel, epithel, a syndecan-2 főként a fibroblaszt, a syndecan-3 pedig a csontszöveti és idegsejtekre jellemző, viszont a syndecan-4 szinte minden szöveti típusban kimutatható (Bernfield et al. 1992).

A szerkezeti felépítésük (1. ábra) hasonló; a cukor oldalláncokat hordozó, variábilis, N-terminális extracelluláris domain kapcsolódik a meglehetősen konzervált, rövid (kb. 30 aminosav hosszú) transzmembrán (TM) és citoplazmás (CD) domainekhez. A C terminális szakasz utolsó négy aminosava EFYA, ami a II. típusú PDZ fehérjék felismerő szekvenciája, több szerkezeti fehérjéhez történő kapcsolódást biztosít, pl. ZO, PAR, Tiam családokhoz.

1. ábra: A syndecan fehérjék szerkezete



Az N-terminális, variábilis extracelluláris doménhez kapcsolódnak a heparán-szulfát, esetenként kondroitin-szulfát oldalláncok. A transzmembrán és a C-terminális citoplazmás domének rövidek, szerkezetük nagyfokú hasonlóságot mutat. Egy szignál peptiddel kezdődnek (szürke), amit a variábilis domain (sárga) követ, majd a transzmembrán (kék) és a citoplazmás (rózsaszín) domain jön.

2.3.2 Syndecan-4 szerepe a szignál átvitelben

A syndecan-4 egyik legfontosabb és a legintenzívebben tanulmányozott szerepe a jelátvitelben van. Fontos szerepet tölt be a $\beta 1$ integrinek köré szerveződő fokális adhéziókban, szervezi a sejt – mátrix kapcsolódást. Hiányában a sejtek migrációs készsége sérült.

A sejtosztódásban a mitotikus fázisban létrejövő intercelluláris hídban koncentrálnak és foszforiláció-függő módon befolyásolja a citokinezt (Keller-Pintér és mtsai, 2010).

Syndecan-4 megtalálható a zonula occludens alatti zonula adherens régióban, vagyis szerepe lehet az epiteliális szövet kialakításában, illetve az epitél sejt kapcsolat fenntartásában.

A syndecan-4 citoplazmás domainjének membránhoz közeli része kötődhet a protein-kináz-C-alfa (PKC α) enzimhez és phophatidyl-inositol 4,5-bisfoszfáthoz (PIP2). A komplex létrejöttével az enzim szuperaktiválódik (Oh és mtsai., 1997). A PKC és a syndecan-4 kapcsolata a syndecan-4 szerin¹⁷⁹ foszforilációján keresztül szabályozódik (Couchman, 2003).

Köti a membrándinamikában fontos nagy GTP-áz dynamin II-t, ezzel befolyásolja a dynamin lokalizációját és így az endocitózist.

Syndecan-4 KO sejtekben a Rac1 kis GTPáz aktív formája megemelkedik, vagyis fontos szerepe van a Rac1 aktivitás, illetve a Rac1 – RhoA aktivitások antagonisztikus szabályzását figyelembe véve, a RhoA aktivitás szabályzásában. Rac1 – RhoA aktivitások pedig meghatározzák a sejtek morfológiáját, differenciációját, migrációs képességét.

2.3.3. A syndecan-4 szerepe a Rac1 aktivitás kialakításában

Az eddigi tapasztalatok szerint syndecan-4 hiánya az aktív Rac1 szint emelkedéséhez vezetett, ezért valószínű, hogy syndecan-4-nek a Rac1 aktivitás leszabályzásában van. Az eddig tanulmányozott – FGF2-el stimulált, vagy sebzéssel indukált esetekben viszont az alap Rac1 szint emelkedését találták. A Rac1 aktiválását a RhoG- ELMO-DOCK180 rendszerrel hozták összefüggésbe oly módon, hogy a syndecan-4 aktiválja a PKC α -t, ami ennek következtében foszforilálja a Rho-GDI-t, amely pedig szabaddá teszi a RhoG-t (Elfenbein és mtsai., 2009, Bass és mtsai., 2011). Szerintünk ez a mechanizmus nem magyarázza, hogy a syndecan-4 egyrészt csökkenti alap aktivitást biztosítson a Rac1-nek, másrészt, hogy gyors változásokat lereagálhasson.

3. Célkitűzés

A syndecan-4 a sejtciklusban betöltött szerepének vizsgálata során észrevettük, hogy a foszfoformát utánzó Ser179Glu mutáns teljesen másképp viselkedik, mint a nem-foszforilálható Ser179Ala syndecan-4 (Keller-Pintér és mtsai, 2010). A két mutánst expresszáló sejtvonalak eltérő fenotípust mutattak. Előzetes megfigyeléseink lapján feltételeztük, hogy a különböző syndecan-4 mutáns közvetlenül befolyásolja a Rac1 aktivitását.

A jelen munkában megvizsgáljuk a különböző syndecan-4 mutánsok okozta Rac1 és RhoA aktivitások változását. Megpróbálunk választ adni, vajon állhat-e a Rho-GDI-1 Ser174 foszforilációja a tapasztalt biokémiai folyamatok hátterében.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Humán szöveti sejtek fenntartása, transzfekció ismertetése

MCF7 adenokarcinoma sejteket 10 %-os borjú savóval (FBS, GIBCO) kiegészített DMEM/F12 (PAA) tápfolyadékban növesztjük 37 °C-on, 5 % CO₂ jelenlétében CO₂ termosztátban. A megfelelő DNS konstrukciókat Roche FuGene6-tal juttattuk be a sejtekbe. A transzfekciónál a gyártó ajánlását követtük.

A transzfektált sejteket felhasználhatjuk, mint ideiglenes (tranzien) transzfektált sejtek, illetve a vektoron lévő szelekciós gén segítségével (itt neomicin) stabil vonalakat izoláltunk. Ekkor a harmadik naptól 500 µg G418 antibiotikummal egészítettük ki a tápfolyadékot. Ebben az esetben a sejtek kromoszómaiba épül be a kívánt gén-konstrukció és a promoterétől függően termelte a bevitt gént.

4.2 Western blot és Rac/Rho aktivitás esszé

A Rac GTP-áz aktivitását Rac aktivációs esszével határoztuk meg (Upstate, Millipore Corporate, Billerica, MA, USA). A mintáinkból a Rac1-GTP-t agaróz gyöngyökhöz fuzionált Rac1 effektor p21 aktivált kináz (PAK-1) p21 kötő doménjével (PBD) kötöttük ki, RhoA-t pedig rhotekin fuzionált agaróz gyönggyel.

A kísérletekhez vt-SDC4-GFP, Ser179Ala, Ser179Glu, Ser179AlaΔFYA és Ser179GluΔFYA konstrukciókat expresszáló MCF-7 sejteket használtunk. A sejteket a szövetkultúra tenyésztőedényekben jéghideg lízispufferben tártuk fel (25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na-ortovanadát és proteáz inhibitor koktél (Sigma-Aldrich)). Az edényeket jégen tartva a sejteket gyorsan lekapartuk, majd lecentrifugáltuk a törmeléket (13000 rpm, 4 perc, 4 °C). Ezt követően a felülúszókhoz hozzáadtuk az agaróz gyöngyöt, és gyenge rázás mellett 4 °C-on 45 percig inkubáltuk a mintáinkat. Az inkubálást követően a gyöngyöket háromszor megmostuk 4 °C-os lízispufferben, majd a pelletet 2x Laemmli mintapufferben reszuspendáltuk, 5 percig forraltuk, majd Western blotot végeztünk. A Rac1/RhoA-t egér monoklonális antitestekkel (Upstate/Invitrogen), a Rho-GDI-1-et, és Ser174Rho-GDI-1-et poliklonális nyúl antiszérummal (SantaCruz) detektáltuk.

A különböző syndecan-4 konstrukciókat expresszáló sejtek Rac1 GTP-ázának GTP-vel való telítéséhez a lizátumokat 5mM EDTA jelenlétében 100 µM gamma-S-GTP-vel 30 °C-on 15

percet inkubáltuk, majd 30 mM MgCl₂-t adtunk a mintákhoz. A GDP telítéshez az előbbivel azonos körülmények között a mintáinkat 1 mM GDP-vel inkubáltunk. Tehát a mintákat immunoblottal (Western-blot) értékeljük ki, amit standard recept szerint végeztünk. Röviden a 70%-ban konfluens sejteket PBS-ben oldott 0,02%-os EDTA-val felszedtük, majd centrifugáltuk (2000 rpm, 5 perc, 4 °C-on). Ezt követően a pelletet mostuk PBS-sel, majd lizáltuk 25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM Na-fluorid, 1mM Na-ortovanadát és proteáz inhibitor koktél (Sigma-Aldrich) tartalmú pufferrel. A sejtörmelék centrifugálását követően (4 perc, 13000 rpm, 4 °C) a szupernatánsokat 8-12 % SDS-poliakrilamid gélen szeparáltuk 25 mM TRIS, 250 mM glicin, 0,1% SDS tartalmú pufferben (pH 8,3), majd nitrocellulóz vagy PVDF membránra (Millipore) transzferáltuk 25 mM TRIS, 192 mM glicin, 0,01% SDS, 10% metanol összetételű pufferben. A transzfer befejeztével a membránt egy éjszakán keresztül blokkoltuk 5 % sovány tejport vagy 5 % BSA-t tartalmazó TBST (0,1% Tween 20-szal kiegészített TBS (50 mM TRISHCl pH 7,4; 160 mM NaCl)) oldattal. Ezután a membránt 1,5 órán át inkubáltuk a primer ellenanyaggal, melyet 1 % tejport vagy 3% BSA-t tartalmazó TSBT-ben hígítottunk ki. Háromszor 15 perc TBST-vel történő mosást követően az 1 %-os tejport tartalmazó TBST-ben hígított szekunder antitesttel inkubáltuk a membránt 45 percen keresztül. Ezt követően háromszor 15 perc mosás után az immunreakciót kemilumineszcencián alapuló ECL Western blotting detection reagent kit (Amersham/GE Healthcare) és röntgen film (Agfa) segítségével tettük láthatóvá. A filmeket Quantity One (Bio-Rad) szoftverrel analizáltuk.

4.3 Használt DNS konstrukciók

A syndecan-4 mutánsok pCMV vektorba (Clontech) lettek beépítve (Keller-Pintér és mtsai., 2010). Szerkezetüket a következő táblázatban mutatjuk:

vt-SDC4-GFP:	MYRMKKKDEG S Y DLGKKPIYKKAPT N EFYA
Ser179Ala:	MYRMKKKDEG A Y DLGKKPIYKKAPT N EFYA
Ser179Glu:	MYRMKKKDEG E Y DLGKKPIYKKAPT N EFYA
Ser179AlaΔEFYA:	MYRMKKKDEG A Y DLGKKPIYKKAPT N
Ser179GluΔEFYA:	MYRMKKKDEG G Y DLGKKPIYKKAPT N

5. Eredmények

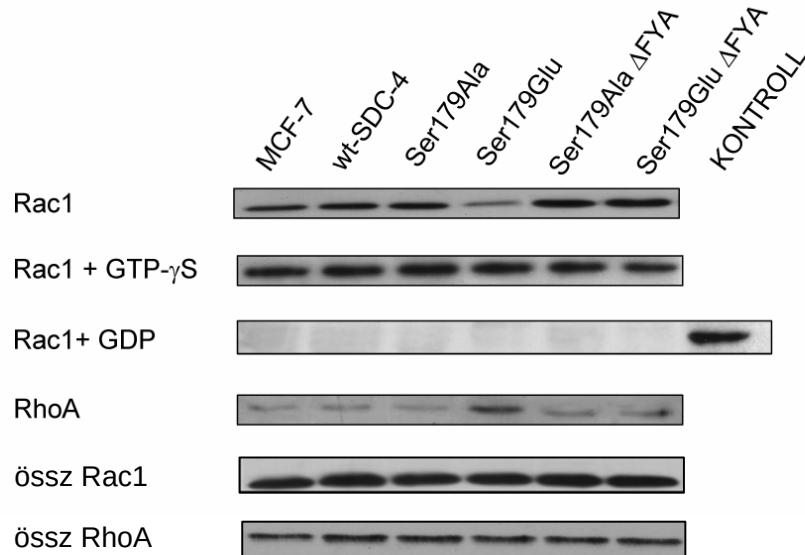
5.1 A syndecan-4 foszforilációs állapota befolyásolja a Rac1 aktivitását

A Rho GTP-ázok családjának (Rac, Rho, Cdc42) aktivitása szerepet játszik a sejtek migrációjában és az epithel sejtek polarizációjában. Korábbi közlemények alapján a syndecan-4 befolyásolja az aktív, GTP kötött Rac1 szintet (Tkachenko és mtsai 2004, , Elfenbein és mtsai 2009), de arról nincs adat, hogy a Ser179 foszforilációja szerepet játszana szabályozásban. Az aktív Rac1 mennyiségét a Rac-esszével határoztuk meg, amelynek az az elve, hogy a Rac1 effektor p21 aktivált kináz (PAK) p21 kötő doménje (PBD) csak a Rac1-GTP-t köti; így a gyantához kapcsolt PBD csak az aktív Rac1-et köti meg a mintánkból, a Rac1-GDP-t nem. Az aktív RhoA szintet hasonló elven mértük, de itt rhotekin volt az agaróz gyöngyhez kapcsolva. A rhotekin specifikusan a RhoA-GTP-hez kötődik.

Meghatároztuk tehát a különböző mutánsokat kifejező sejtvonalakban az aktív Rac1 szintet (2. ábra). Kontrollként a nem transzformált MCF7 sejteket használtunk. Mivel az MCF7-ben igen alacsony az endogén syndecan-4 ezért az alap Rac1-GTP viszonylag magasabb. A kísérletből látszott, hogy csak a Ser179Glu konstrukciót termelő sejtvonalban csökkent az aktív Rac1 szint. Viszont a kettős mutáns, amikor a PDZ kötőhely hiányzott a fehérjéről a sejtekben mért Rac1-GTP szintje egy kicsit magasabbnak adódott a nem-kezelt MCF7-nél (2. ábra). A Rac esszé specifikusságának bizonyításáért a sejtszuspenziót telítettük GTP- γ S vagy GDP-vel. A GDP hozzáadásával gyakorlatilag lecsökkent a kihúzott Rac1. A GTP- γ S, mivel a tio kötés miatt nem hidrolizál GDP-vé, így feldúsul az aktív forma. Amennyiben nem a GEF katalizálta lépés előtt blokkolódik a ciklus, úgy a működő GEF enzimek képesek GTP- γ S-re cserélni. A 2. ábrán látható, hogy a GTP- γ S telítés azonos szintre hozta az aktivált Rac1 szintet, míg a GDP kezelés esetében eliminálta a Rac1 jelet.

A RhoA szintjét tanulmányozva azt találtuk, hogy a legnagyobb mennyiségben a Ser179Glu mutánst termelő sejtek tartalmazták (2. ábra).

2. ábra Syndecan-4 mutánsok befolyásolják az aktív Rac1 és RhoA szinteket a különböző sejtvonalakban.



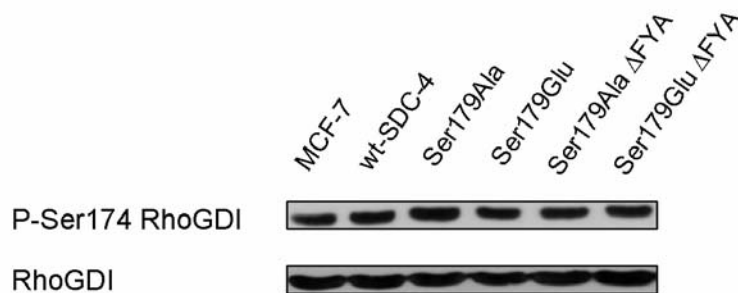
Az aktív Rac1 (Rac1-GTP) mennyiségét vizsgáltuk kezeletlen MCF7, wt-syndecan-4, Ser179Ala, Ser179Glu, Ser179ΔAla, és Ser179ΔGlu konstrukciókat expresszáló MCF-7 sejteken. A felső sor a Rac1-GTP-t szintjét, majd GTP-γS, és GDP telítés esetén. Az aktív RhoA (RhoA-GTP) komplementje az aktív Rac1 mintázatnak, a foszfomimikáló Ser179Glu mutánst termelő vonalban van eltérés. Az alsó két sorban a sejt kivonat 20 %-ból detektálható összes Rac1 és RhoA tartalmat mutatja, nincs szignifikáns eltérés a különböző vonalak esetében. A kísérlet során a különböző sejtvonalakat azonos körülmények között tartottuk, és sejtvonalakként 5×10^6 sejtet dolgoztunk fel.

5.2 Rho-GDI foszforilációjának vizsgálata

A Rac1-GDP a Rho-GDI-1-el képez komplexet. A Rho-GDI-1 a Rac1-et a Pak1 foszforiláció után engedi el (DerMardirossian és mtsai., 2004). Megnéztük vajon a Ser179Glu mutáns termelése esetén változik-e a foszforiláció. Amennyiben a foszforilációs szignál kisebb lenne, ez arra utalna, hogy a Rac1-GDP GDI-1 kötött formában feldúsulna, és ezzel a körfolyamat megakadna, vagy legalábbis kialakulna egy szűk keresztmetszet, ahol a Rac1 feltorlódna. A 3. ábra mutatja, hogy nincs különbség a foszforilációs szintben a különböző

klónok esetében, vagyis a GDI ciklus nem gátolt. Ez azt jelenti, hogy a Pak1 működését nem zavarták meg a mutáns syndecan-4-et termelő klónok.

3. ábra Rho-GDI-1 foszforilációja



Western (immun) blot technikával megvizsgáltuk a Rho-GDI-1 Ser174 foszforilációs állapotát. Kontrollként az összes Rho-GDI-1-et is kimutattuk. Látható, hogy sem mennyiségben, sem a foszforilációs állapotban nincs eltérés a különböző syndecan-4 mutáns klónokat termelő sejtvonalakban. A kísérlet során a különböző sejtvonalakat azonos körülmények között tartottuk, és sejtvonalakként 5×10^6 sejtet dolgoztunk fel, aminek sorrendben 20, illetve 10 % -át vittük fel.

6. Összefoglalás és diszkusszió

Az aktív Rac1 mennyiségét a syndecan-4 mutációk egyértelműen befolyásolták. A kezeletlen minták közül a legmagasabb Rac1 aktivitást a PDZ kötőhelyben mutált Ser179Ala és Ser179Glu vonalban kaptuk, míg a legalacsonyabb értékeket a foszfomimetikus Ser179Glu mutáns esetén detektáltuk. Ez azt jelenti, hogy legalább két kötés szükséges a gátlás létrejöttéhez. Mivel a Rho-GDI-1 Ser174 foszforilációja nem változott a különböző sejtvonalakban, így a GDI-Rac kölcsönhatás minősége nem változott, vagyis nagy valószínűséggel egy fontos GEF – syndecan-4 kölcsönhatás okozhatja a gátlást. Mivel több GEF is szóba kerülhet, a foszfo-syndecan-4 által gátoltnak a tisztázása a jövő feladata. A gamma-S-GTP-vel történő inkubálással (mely pozitív kontrollként is használható a Rac-esszé során), valamennyi Rac1 tartósan GTP kötött állapotba került. A γ S-GTP kezelést követően a detektált aktív Rac1 mennyisége egyenlő volt a különböző sejtvonalakban, illetve a GDP telítést követően a detektálhatóság alá csökkent. Ezek a kísérletek is egyértelműen egy potenciálisan meghatározó, speciális GEF szabályzásra utalnak.

Elfenbein és mtsai javasoltak egy bonyolult mechanizmust, ami szerint a PKC α – syndecan-4 aktiváció idézné elő a Rac1 aktivációt (Elfenbein és mtsai., 2009). Ez a mechanizmus nem magyarázza a syndecan-4 Rac1 csökkentő képességét. Ráadásul a javasolt mechanizmus – PKC α általi foszforilált Rho-GDI-1 Ser96 a RhoA-t is serkenti, tehát a modellben egy időben zajlana két ellentétes irányú folyamat Rac1 és RhoA aktiválás.

Összegzés képpen megállapíthatjuk, hogy felfedeztünk egy új a Rho család aktivitását szabályozó mechanizmust. Ez kihatással van a sejtek polarizációjára, differenciációjára. Megállapítottuk, hogy a syndecan-4 képes közvetlenül, a Ser179 foszforilációján keresztül szabályozni az aktív Rac1-et, ezzel a RhoA-t is. Általában a Rac1 és CDC42 kis GTPázok egymást helyettesíthetik az effektor fehérjékben, így implicite a CDC42 lokális aktivitását is befolyásolja, hiszen a foszfo-syndecan-4 jelenlétében lecsökken a Rac1, teret adva a kisebb koncentrációjú CDC42-nek.

7. Felhasznált irodalom

- Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 129: 865-877.
- Bass MD, Williamson RC, Nunan RD, Humphries JD, Byron A, Morgan MR, Martin P, Humphries MJ. (2011) A syndecan-4 hair trigger initiates wound healing through caveolin- and RhoG-regulated integrin endocytosis. *Dev Cell*. Oct 18;21(4):681-93.
- Bernards A, Settleman J. (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol*. 14:377-85.
- Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. (1992) Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol*. 8: 365-393.
- Boulter E, Garcia-Mata R. (2010) RhoGDI: A rheostat for the Rho switch. *Small GTPases*. 1:65-68.
- Couchman JR. (2003) Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4: 926-937.
- DerMardirossian C, Schnelzer A, Bokoch GM. (2004) Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. *Mol Cell*. 15: 117-127.
- DerMardirossian C, Bokoch GM. (2005) GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol*. 15: 356-363.
- Downward J (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy". *Nat. Rev. Cancer* 3: 11–22.
- Jeyaraj SC, Unger NT, Chotani MA. (2011) Rap1 GTPases: an emerging role in the cardiovascular. *Life Sci.*; 88:645-52.

Kandpal RP. (2006) Rho GTPase activating proteins in cancer phenotypes. *Curr Protein Pept Sci.* 7:355-65.

Katoh H, Negishi M. (2003) RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature.* 424: 461-464.

Keller-Pinter A, Bottka S, Timar J, Kulka J, Katona R, Dux L, Deak F, Szilak L. (2010) Syndecan-4 promotes cytokinesis in a phosphorylation-dependent manner. *Cell Mol Life Sci.* 67:1881-94.

Knezevic N, Roy A, Timblin B, Konstantoulaki M, Sharma T, Malik AB, Mehta D. (2007) GDI-1 phosphorylation switch at serine 96 induces RhoA activation and increased endothelial permeability. *Mol Cell Biol.* 27:6323-33.

Elfenbein A., Rhodes J.M., Meller J., Schwartz M.A., Matsuda M., Simons M. (2009) Suppression of RhoG activity is mediated by a syndecan 4-synectin-RhoGDI1 complex and is reversed by PKC α in a Rac1 activation pathway. *J Cell Biol*, 186, 75–83.

Garcia-Mata R, Boulter E, Burridge K.(2011) The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:493-504.

Marland JR, Pan D, Buttery PC.2011 Rac GTPase-activating protein (Rac GAP) α 1-Chimaerin undergoes proteasomal degradation and is stabilized by diacylglycerol signaling in neurons. *J Biol Chem.* 2011 Jan 7;286(1):199-207.

Molecular Biology of the Cell, 5. kiad., szerk.: Alberts, Johnson, Lewis, Roberts, Walter

Oh ES, Woods A, Lim ST, Theibert AW, Couchman JR. (1998) Syndecan-4 proteoglycan cytoplasmic domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate coordinately regulate protein kinase C activity. *J Biol Chem.* 273:10624-10629.

Schiller MR. (2006) Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases--GEFs what's the link. Cell Signal. 2006 Nov;18(11):1834-43.

Stenmark H, Olkkonen VM (2001). "The Rab GTPase family". Genome Biol. 2: 3007.1-3007.7.

Tkachenko, E., Lutgens, E., Stan, R.V. and Simons, M. (2004). Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. J Cell Sci. 117, 3189-3199.

8. Nyilatkozat a pályázók egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez.

Bárkovics Bonita (SE, ÁOK) végezte a humán szövettan fenntartását, a Rac és Rho-esszéket.

Kaszás Krisztina (NyME, SEK) a kapott sejtlizátumból kimutatta a GDI, és foszfoGDI fehérjéket. Bekapcsolódott a szövettanba.

.....

Bárkovics Bonita

.....

Kaszás Krisztina