A p190RhoGAP szabályozása foszfolipidekkel és foszforilációval

Doktori tézisek

Dr. Lévay Magdolna Krisztina

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Ligeti Erzsébet egyetemi tanár, az MTA levelező tagja

Hivatalos bírálók: Dr. Szűcs Mária, az MTA doktora
Dr. Tretter László egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gyires Klára egyetemi tanár, az MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sármay Gabriella egyetemi tanár, az MTA doktora
Dr. Füst György egyetemi tanár, az MTA doktora

Budapest
2010

BEVEZETÉS

A GTP hidrolízis egy alapvető fontosságú reakció a biológiában, számos - a sejt működéséhez elengedhetetlen - folyamat szabályozásának az alapja, mint a fehérjeszintézis, növekedés és differenciálódás, szenzoros működések, transzportfolyamatok, citoszkeleton átrendeződés. A kis G-fehérjék vagy más néven monomer G-fehérjék 20-40 kDa nagyságú enzimek, amelyek képesek a GTP-t hidrolizálni, GDP-re és anorganikus foszfátra hasítani. A kis G-fehérjék GTP kötött formában aktívak, GDP kötött formában inaktívak. A GTP hidrolízisével saját magukat inaktiválják, így korlátozott ideig aktív molekuláris „kapcsoló”-nak tekinthetők. A kis G-fehérjék „szupercsaládjának” öt családja ismert: a Ras, a Rho, a Rab, a Sar1/Arf és a Ran családok, amelyek mind funkcióikban, mind sejten belüli elhelyezkedésükben is jelentős különbségeket mutatnak.

A kis G-fehérjék GTP-áz ciklusára több szabályozófehérje is hathat. A kis G-fehérjék csak aktív formában képesek az effektor fehérjékhez kapcsolódni és ezzel a sejtválaszt beindítani. Az aktívvá válást a guanin nukleotid kicserélő faktorok (GEF-ek) segítik, amelyek katalizálják a GDP leválását, lehetővé téve ezzel a sejtben nagyobb koncentrációban jelen lévő GTP kapcsolódását a kis G-fehérjékhez. A GTP hidrolízis során a kis G-fehérjék inaktív állapotba kerülnek leállítva a jeltovábbítást. A kis G-fehérjék a heterotrimer G-fehérjékkel ellentétben igen gyenge saját GTP-áz aktivitással rendelkeznek, amely azonban GTP-áz aktiváló proteinek (GAP-ok) jelenlétében sokszorosára képes fokozódni. Egy adott kis G-fehérjére több különböző GAP is hathat és egy adott GAP is több kis G-fehérje szabályozásában játszhat szerepet. Hasonló diverzitást figyelhetünk meg a GEF-ek esetében is. Csak a Rho családban az eddig megismert GAP-ok száma több mint 70, a GEF-ek száma pedig meghaladja a 80-at. A GEF-eken és a GAP-okon kívül egyes kis G-fehérjéknél egy harmadik szabályozó fehérje is megfigyelhető: a guanin nukleotid

disszociáció inhibitor (GDI). Ez komplexben tartja a kis G-fehérjéket, amelyek így nehezen hozzáférhetőek lesznek a GAP-ok és a GEF-ek számára.

A Rho családjába tartozó proteinek a Rho, Rac és Cdc42, melyeknek több altípusa is ismert. Ezen fehérjék fontos szerepe az aktin citoszkeleton regulációja, amely elengedhetetlen a legtöbb biológiai folyamathoz, de ezen kívül részt vesznek egyéb sejtfunkciók szabályozásában is. A citoszkeletonra hatva a Rho kis G-fehérje család tagjai közreműködnek a sejtek migrációjában, alakváltozásában, a simaizomsejtek kontrakciójában, a sejtadhézió folyamatában, a vezikulamozgásban, a polaritás meghatározásában, a morfogenezisben, a neuritnövekedésben és a sejtciklus szabályozásában. Ezekben a folyamatokban elengedhetetlen A Rac és a Rho aktivitás térben és időben összehangolt szabályozása.

A kis G-fehérjék szabályozása sokszor regulátor proteinjeik szabályozásán keresztül megy végbe. A kis G-fehérjék szakirodalma egyre több figyelmet fordít a GTP-áz aktiváló proteinek vizsgálatára. A GAP-ok regulációja többféle mechanizmussal is létrejöhet, mint fehérje-fehérje illetve fehérje-lipid kölcsönhatások, foszforiláció, a GAP-ok sejten belüli transzlokációja, fehérje degradáció. A GAP-ok foszfolipidekkel történő regulációjának alapja lehet specifikus lipidkötő doménen keresztül megvalósuló, vagy elektrosztatikus erők közvetítette fehérje-lipid kapcsolat. A GAP-ok szabályozásának irodalmában jóval több példa van a specifikus fehérje-lipid kapcsolatra, mint az elektrosztatikus erőkön alapulóra. A GTP-áz aktiváló proteinek szerin/treonin vagy tirozin foszforilációja fokozhatja vagy gátolhatja a GAP-ok enzimatikus aktivitását, továbbá befolyásolhatja a fehérje sejten belüli lokalizációját, degradációját vagy más proteinekkel, illetve foszfolipidekkel való kölcsönhatását.

A p190RhoGAP a Rho kis G-fehérje családra ható 190 kDa nagyságú GTP-áz aktiváló protein. A p190RhoGAP családba két izoforma tartozik, a p190RhoGAP-A, illetve a p190RhoGAP-B. Mindkét izoforma szerkezetében három fő domén különböztethető meg: az N-terminális GTP-kötő domén, egy

hosszú középső domén, amely számos fehérje-fehérje kölcsönhatásban résztvevő motívumot és egy fontos tirozin-foszforilációs helyet (Y1105) tartalmaz, valamint egy C-terminális GAP domén. A p190RhoGAP GAP doménje *in vitro* fokozza a Rho családba tarozó Rho, Rac és Cdc42 fehérjék GAP aktivitását. *In vivo* a p190RhoGAP képes fokozni a Rho kis G-fehérje GTP-áz aktivitását és ezáltal gátolja a Rho-függő sejtfolyamatokat. Az, hogy a p190RhoGAP *in vivo* RacGAP aktivitással is rendelkezik-e, még nem eléggé bizonyított.

A p190RhoGAP kimutatható az idegrendszerben, a simaizomban, a vázizomban, a herében, a tüdőben, a lépben, a májban, a szívben, a vesében és a neutrofil granulocitákban. A legjelentősebb p190RhoGAP expressziót az agyban, a gerincvelőben és a szemben mutatták ki.

A p190RhoGAP aktivitás szabályozásának legelsőként leírt mechanizmusa fibroblasztokban a Y1105 aminosav Src katalizálta foszforilációja. A Y1105 aminosav foszforilációja fokozza a p190RhoGAP aktivitását. A p190RhoGAP fehérjét az Src kinázon kívül számos más tirozin kináz is képes foszforilálni.

Settleman munkacsoportja kimutatta, hogy a p190RhoGAP *in vitro* és *in vivo* is foszforilálódik a PKC által, és hogy a PKC aktivációt követően a p190RhoGAP a citoplazmából a membránba kerül, ahol az aktinnal kolokalizál. Arra azonban nincs adat, hogy ez a transzlokáció a p190RhoGAP PKC katalizálta direkt foszforilációjának eredménye-e vagy a PKC egy másik fehérjét foszforilál, aminek hatására a p190RhoGAP indirekt helyeződik ki a membránba.

Munkacsoportunk egy korábbi publikációjában a p190RhoGAP lipidekkel megvalósuló igen érdekes szabályozását írta le: a p190RhoGAP *in vitro* képes megváltoztatni szubsztrátspecificitását savas foszfolipidek, mint a PS, a PI és a PIP2 hatására: erősebb Rac GAP-ként és gyengébb Rho GAP-ként viselkedik. A foszfolipidek a Rac és a Rho kis G-fehérjékre csak a p190RhoGAP aktivitásának megváltoztatásán keresztül hatnak, a Rac és a Rho endogén GTP-áz aktivitását nem befolyásolják.

A glikogén szintetáz kináz 3 (GSK-3) egy szerin-treonin kináz, amely a glikogén metabolizmus szabályozásán kívül részt vesz a citoszkeleton szabályozásában, a sejtdifferenciáció, a sejtproliferáció, az apoptózis, a sejtciklus és a géntranszkripció regulációjában is. A GSK-3 döntő jelentősségű a sejtpolaritás meghatározásában és a sejtmigráció regulációjában is. Emlősökben a GSK-3-fehérjének két izoformája ismert, a GSK-3α és a GSK-3β.

A GSK-3 enzimaktivitására jellemző, hogy akkor képes a szubsztrátját foszforilálni, ha azt előzőleg már egy másik kináz foszforilálta. Ez az úgynevezett „priming" (előfoszforiláció, vagy kijelölő foszforiláció), amely egy, a GSK-3 foszforilációs helytől néhány aminosavval C-terminálisan elhelyezkedő aminosav foszforilációját jelenti.

CÉLKITŰZÉS

Kísérleteimben a p190RhoGAP szabályozásának vizsgálatát tűztem ki célul. Munkám során az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

1. A p190RhoGAP molekula mely szakasza felelős a RhoGAP és a RacGAP aktivitás lipidekkel történő szabályozásáért?

2. Mely aminosavakon foszforilálja a PKCα a p190RhoGAP molekulát?

3. A p190RhoGAP PKCα katalizálta foszforilációja befolyásolja-e a lipidkötést és a lipidek hatását a GAP aktivitásra?

4. Hogyan befolyásolja a p190RhoGAP lipidregulációja és PKCα katalizálta foszforilációja a sejt morfológiáját?

5. Hogyan befolyásolja a p190RhoGAP GSK-3β-val történő foszforilációja a molekula RhoGAP- és RacGAP aktivitását?

MÓDSZEREK

A protein konstruktok és fragmensek előállítása

A különböző hosszúságú p190RhoGAP konstruktokat PCR segítségével készítettem. A PCR termékeket EcoRI enzimmel vágtam és pGEX4T1 vektorba ligáltam. A p190(1191) alanin mutánsait irányított mutagenezissel készítettem. A konstruktokat hasítás és szekvenálás segítségével ellenőriztem. A GST-fúziós p190RhoGAP proteinfragmenseket, és a nem prenilált kis G-fehérjéket *Escherichia coli* baktériumban termeltettem. A prenilált kis G-fehérjék (Rac1 és RhoA) baculovírussal transzfektált Sf9 sejtek membrán frakciójából származtak.

A transzfekcióhoz használt plazmidok előállítása

A fluoreszcensen jelölt teljes hosszúságú vad típusú és polibázikus régió mutáns p190RhoGAP konstruktokat PCR segítségével készítettem. A PCR termékeket BspEI és EcoRI enzimekkel vágtam és EGFP-C1 és pmCherry C1 vektorokba ligáltam. A teljes hosszúságú alanin mutáns plazmidokat irányított mutagenezissel állítottam elő.

In vitro GTPáz aktivitás mérés

Az *in vitro* GTPáz aktivitás mérése során a kis G-fehérjét [γ-^{32}P]GTP-vel „töltöttem” alacsony Mg^{2+}-tartalmú oldatban. Ezután Mg^{2+} hozzáadásával „fixáltam” a radioaktív GTP-t a kis G-fehérjén, és Rac esetében 20°C-on 5 percig, Rho esetében 30 ^{o}C-on 15 percig inkubáltam. A reakcióelegyet nitrocellulóz membránon keresztül szűrtem, majd a membránt desztillált vizet tartalmazó küvettába helyeztem. A radioaktivitás mérése Beckman LS-5000TD folyadék szcintillációs számlálóban történt.

Lipid kötési vizsgálatok

A lipidkötést liposzóma kötési módszerrel, illetve PIP strip módszerrel vizsgáltam. A liposzóma kötési módszer során a vizsgált fehérjét

multilamelláris lipid vezikulákkal inkubáltam, a lipideket ultracentrifugálással ülepítettem. Az üledékben és felülúszóban kimutatható fehérje mennyiségét denzitometriával elemeztem, és az üledékben található - lipidhez kötődött - fehérje mennyiségét az össz fehérje mennyiség arányában ábrázoltam. Az ultracentrifugálásokhoz Beckman Optima™TL típusú ultracentrifugát használtam. A fehérjét Coomassie Blue-val festettem, a denzitometriához NIH Image J programot használtam. A PIP Strips módszer során a különböző foszfolipideket tartalmazó membránokhoz blokkolás után adtam hozzá a vizsgált proteint. A membránokat monoklonális anti p190A elsődleges, és anti-egér másodlagos antitesttel kezeltem, majd ECL módszerrel hívtam elő.

A PKCα katalizálta foszforiláció *in vitro* vizsgálata

A p190RhoGAP proteinfragmenseket PKCα-val inkubáltam [γ-^{32}P]ATP jelenlétében. A PKCα-t kis koncentrációban adott foszfatidilszerinnel aktiváltam, a PKCα gátlásához bisz-indolil-maleimid I-et használtam. A mintákat SDS-gélen futtattam meg, majd a gélt Coomassie Blue-val festettem és megszárítottam. A szárított gélen a radioaktív foszfátot phosphoimager analízissel detektáltam Bio-Rad GS-525 készülékkel. A PKCα katalizálta foszforilációt a GTP-áz akivitás mérés előtt hasonló módon végeztem, de a reakcióhoz nem radioaktív ATP-t használtam.

A GSK-3β katalizálta foszforiláció *in vitro* vizsgálata

A priming (előfoszforiláció) során a glutation-gyöngyhöz kapcsolt p190(1191)ΔPBR fehérje preparátumokat 15, 30, 60 percig inkubáltam 30 ^{o}C-on COS7 sejtekből származó citoszollal. A GSK-3β-val történő foszforiláció során a proteint [γ-^{32}P]ATP-vel és GSK-3β-val inkubáltam 15, 30, 60 percig 30 ^{o}C-on. A foszforiláció detektálása a PKCα-nál leírt módon történt. A GAP assay során 30 perc volt az előfoszforiláció, és 15 perc a GSK-3β katalizálta foszforiláció.

Sejtkultúra és transzfekció

A COS7 sejteket 5% CO2 tartalmú inkubátorban növesztettem 37 °C-on újszülött borjú szérumot, penicillint és streptomycint tartalmazó DMEM mediumban. A transzfekció előtti nap a sejteket fedőlemezre helyeztem. A tranziens transzfekció során a vad típusú és mutáns p190RhoGAP DNS plazmidok transzfekciójához FuGene HD vagy TurboFect reagenseket használtam. A sejteket a transzfekció utáni 24-72 órában vizsgáltam.

A sejtek immunfestése

A sejteket fedőlemezen növesztettem, majd fixáltam, permeabilizáltam. Blokkolás után a sejteket elsődleges, majd fluoreszcens másodlagos antitesttel inkubáltam. Az aktint phalloidinnal festettem. A tárgylemezekre Mowiol-reagenst cseppentettem és így fordítottam rá a fedőlemezt, majd száradás után konfokális mikroszkópban vizsgáltam.

Konfokális lézer mikroszkópia

A konfokális lézer mikroszkópos képeket LSM510 (Carl Zeiss) lézer scanning konfokális mikroszkóppal készítettem. Az excitáció 488 nm-en emittáló argon lézerrel, valamint 543 nm-en emittáló helium/neon lézerrel történt. Az emissziót 500–530-nm-es szűk sávú filterrel detektáltam Alexa488 és GFP esetén, illetve egy 560-nm felett átengedő széles sávú filterrel Alexa568 és pmCherry esetén. 1–3 µm optikai szeletvastagságú képeket készítettem.

EREDMÉNYEK

A p190RhoGAP szabályozása foszfolipidekkel és PKCα katalizálta foszforilációval

A lipidregulációért felelős szakasz feltérképezése GAP aktivitás méréssel

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint bizonyos foszfolipidek képesek gátolni a p190RhoGAP RhoGAP aktivitását és aktiválni a RacGAP aktivitását. A lipidregulációért felelős szakasz kimutatása céljából létrehoztam a p190RhoGAP C-terminális részének rövidebb fragmenseit: p190(1191) és p190(1252), és vizsgáltam ezen szakaszok GAP aktivitását Rac-ra és Rho-ra, valamint a foszfolipidek hatását a fehérje GAP aktivitására *in vitro* GTP-áz aktivitás mérés segítségével. Mindkét rövidebb fragmens GAP-ként visekedett. A foszfolipidekkel megvalósuló reguláció megfigyelhető volt a p190(1191) esetében, míg a p190(1252) fragmensnél elmaradt. A p190RhoGAP szekvenciájában a 1213 és 1236 aminosavak között található egy polibázikus szakasz. Létrehoztam a p190(1191) polibázikus régió deléciós mutánsát (p190(1191)ΔPBR), amelynek aktivitását a p190(1252) fragmenshez hasonlóan nem befolyásolták a foszfolipidek. Tehát elmondhatjuk, hogy a p190RhoGAP foszfolipidekkel történő regulációjáért a 1213 és 1236 aminosavak közti polibázikus régió felelős.

A p190RhoGAP lipidkötésének vizsgálata

Mivel a p190RhoGAP kis G-fehérjékre kifejtett hatását foszfolipidek befolyásolni képesek, megvizsgáltuk, hogy a p190RhoGAP képes-e *in vitro* lipidkötésre. A lipidkötés kimutatására kétféle módszert alkalmaztunk: a liposzóma kötési módszert és a lipidblot vizsgálatot. A két módszer különbözik egymástól, mivel liposzómakötés esetén oldatban lévő lipidvezikulákat vizsgálunk, míg lipidblot vizsgálat során a lipidek a PIP strip membránhoz kötötten találhatók. A liposzóma kötési vizsgálat során a p190(1191) az üledékben volt kimutatható, tehát lipidekhez kötődött mind PS, mind PI

esetében. A p190(1252) és a p190(1191)ΔPBR fragmensek ezzel szemben nem kötődtek a foszfolipidekhez. Kevert vezikulákkal való vizsgálat során 25%-os PS tartalom esetén már kimutatható volt a p190(1191) kismértékű lipidkötése, de a fehérjemolekulák nagyobb része csak akkor kötődött a vezikulákhoz, amikor azok 50%-ban tartalmaztak PS-t. Maximális lipidkötés 75% PS tartalom mellett volt megfigyelhető. PI esetében a PS-hez hasonló eredményt kaptunk A lipidblot vizsgálat során a p190(1191) többféle savas foszfolipidhez is képes kapcsolódni, míg a p190(1191)ΔPBR semmilyen lipidhez nem volt képes kötődni a lipid-blotton, ez is jelzi a polibázikus régió szerepét a fehérje-lipid kapcsolatban.

Megfigyeléseink alapján elmondhatjuk, hogy a p190RhoGAP lipidkötése nem specifikus, feltételezhetően elektrosztatikus jellegű fehérje-lipid kapcsolat, amelyért a fehérje polibázikus régiója felelős.

A p190 RhoGAP PKCα-val történő foszforilációjának vizsgálata

Scansite szoftvert használva a foszforiláció predikció eredményeként azt találtuk, hogy a p190RhoGAP a polibázikus régión belül tartalmaz két szerint és egy treonint (S1221, T1226, S1236), amelyek PKC foszforilációs helyek lehetnek. Ezért megvizsgáltuk radioaktív [γ-^{32}P]ATP segítségével, hogy ezeken az aminosavakon a PKCα valóban foszforilálja-e a p190RhoGAP molekulát. Kimutattuk, hogy a p190(1191) konstruktot képes a PKCα *in vitro* foszforilálni és ez specifikus PKC inhibitorral gátolható. Ezzel szemben a polibázikus régiót nem tartalmazó - így a kérdéses aminosavakat sem tartalmazó - proteinfragmenseken (p190(1252) és p190(1191)ΔPBR) nem volt kimutatható foszforiláció. A polibázikus régió megléte tehát nemcsak a lipidkötéshez és lipidregulációhoz szükséges, hanem a PKCα katalizálta foszforilációhoz is. Annak kimutatására, hogy a polibázikus régión belül a három aminosav valóban foszforilálódik-e, irányított mutagenezissel létrehoztuk a p190(1191) pontmutánsait, amelyekben a szerin és treonin aminosavakat alaninra cseréltük. Egyszeres, kétszeres, és háromszoros mutánsokat hoztunk létre, és vizsgáltuk

ezek PKCα katalizálta foszforilációját. Mindegyik egyszeres és kétszeres mutáns foszforilálódott, bár ennek mértéke az egyes mutánsok között eltérő volt. A 1236-os szerinen feltételezhetően kisebb mértékű a foszforiláció, mint a 1221-es szerinen és a 1226-os treoninon, mivel a kétszeres mutánsok közül a S1221A-T1226A foszforilálódott legkevésbé, amelyben a PKCα csak a 1236-os szerint foszforilálhatja. A háromszoros alanin mutáns esetében nem volt kimutatható foszforiláció. A PKCα képes foszforilálni tehát - bár különböző mértékben - a p190RhoGAP polibázikus régióján belüli S1221, T1226 és S1236 aminosavakat.

A PKCα-val történő foszforiláció hatása a p190RhoGAP lipidkötésére

A polibázikus régión belül található három aminosav foszforilációja megváltoztatja a töltéseloszlást ezen a szakaszon, amely befolyásolhatja az elektrosztatikus kölcsönhatásokat, így a lipidekkel való kapcsolatot is. Megvizsgáltuk tehát, hogy a p190RhoGAP PKCα katalizálta foszforilációja hogyan befolyásolja a molekula lipidkötését. A p190(1191) fragmens esetében foszforiláció hatására a lipidkötés mintegy 30%-ra csökkent, míg azonos körülmények között a nem foszforilált kontroll fehérje 90%-a kötődött lipidhez. PI esetében hasonló eredményeket kaptunk. Elmondhatjuk tehát, hogy a p190RhoGAP PKCα katalizálta foszforilációja jelentős mértékben gátolja a foszfolipidekhez kötődést.

A PKCα-val történő foszforiláció hatása a p190RhoGAP lipidregulációjára

A foszforiláció önmagában – lipidek jelenléte nélkül – nem befolyásolta a GAP aktivitást. Ezzel szemben a GAP lipidek hasására lértejövő szubsztrátspecificitás változását a foszforiláció kivédte. PS jelenlétében a nem foszforilált p190(1191) gyenge RhoGAP aktivitással és erős RacGAP akivitással rendelkezik, míg PKCα katalizálta foszforiláció hatására fokozódott a RhoGAP aktivitása, és csökkent a RacGAP aktivitása A PKCα katalizálta foszforiláció hatása kivédhető volt a PKC gátló bisz-indolil-maleimid

hozzáadásával, vagy ha a reakcióelegyből hiányzott a foszforilációhoz szükséges ATP. Azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a PKC-mediált foszforiláció nem befolyásolja a p190RhoGAP endogén GTPáz aktiváló hatását, de kivédi a lipidekkel megvalósuló szabályozást. A lipidhatás kivédése egybecseng a lipidkötés eredményével, a foszforiláció tehát a lipidekkel való elektrosztatikus kapcsolat csökkentése által fejti ki a hatását a p190RhoGAP GAP aktivitására.

A foszforilációs helyek szerepe a lipidkötés és GAP aktivitás változásában

Kíváncsiak voltunk, hogy a három PKC foszforilációs hely közül melyiknek a foszforilációja szükséges a lipidkötés csökkenéséhez és a szubsztrátspecificitás változásához, van-e a három aminosav közül valamelyiknek kiemelt szerepe. Ezért megvizsgáltuk a p190(1191) konstrukt különböző alanin mutánsainak lipidkötését és GAP aktivitását foszforiláció nélkül és foszforiláció esetén. A S1221A és a T1226A mutánsok esetében a foszforiláció nem befolyásolta a lipidkötést: a foszforilált fehérje ugyanolyan jól kötődött foszfolipid vezikulákhoz, mint a nem foszforilált kontroll. Ezzel egybevágó eredményt kaptunk a GTP-áz aktivitás mérése során is: a foszforiláció nem védte ki a lipidek hatására létrejövő szubsztrátspecificitás változást. Ugyanezeket a megállapításokat mondhatjuk el a kétszeres és háromszoros alanin mutánsok esetében is. Ezzel ellentétben a S1236A mutáns a vad típushoz hasonlóan viselkedett mind a liposzóma kötési módszerben, mind a GTP-áz aktivitás mérése során: a foszforiláció kivédte a protein lipidkötését és csökkentette a PS hatását a molekula GAP aktivitására. Tehát az egyes foszforilációs helyek szerepe különböző: a lipidkötés és GAP aktivitás csak akkor változik, ha mind a 1221-es szerin, mind a 1226-os treonin foszforilálódik, a 1236-os szerin foszforilációjának viszont alig van hatása. Érdemes megfigyelnünk, hogy ugyanez a 1236-os szerin a radioaktív ATP-vel végzett foszforilációs kísérletek során kevésbé foszforilálódott mint a 1221-es szerin és 1226-os treonin. Annak megerősítésére, hogy a foszforiláció a

polibázikus régió töltésviszonyainak megváltoztatásával fejti ki gátló hatását, létrehoztunk újabb p190(1191) mutánsokat, ahol a foszforilációs helyeket aszpartát aminosavakra cseréltük (S1221D, T1226D). PS jelenlétében ezeknek a mutánsoknak is fokozódott a RacGAP aktivitása, de a foszforiláció a GAP akivitást csak kis mértékben befolyásolta. Az aszpartát által megjelent negatív töltés gyengébb hatást fejtett ki, mintha ugyanabban a helyzetben egy nagyobb negatív töltésű foszfát csoport lenne.

Lipidkötés és PKCα-val történő foszforiláció hatása a sejtmorfológiára

Ahhoz, hogy a p190RhoGAP lipidkötésének és PKCα katalizálta foszforilációjának *in vivo* jelentőségéről információt kapjunk, COS7 sejteket transzfektáltunk GFP-hez kapcsolt teljes hosszúságú vad típusú vagy PKC-vel nem foszforilálható mutáns, illetve a polibázikus régiót nem tartalmazó mutáns p190RhoGAP cDNS-t tartalmazó plazmiddal. A vad típusú p190RhoGAP hatására az irodalmi adatoknak megfelelően a sejtek egy részében jellegzetes morfológiai változást, „dendritikus fenotípust" láttunk: a sejtek lekerekedtek és hosszú nyúlványokat alakítottak ki. Ez a sejtmorfológia a transzfekált sejtek felében volt megfigyelhető, a sejtek másik fele szétterült állapotban maradt. Amikor a sejteket a S1221A-T1226A „kettős mutáns" plazmiddal transzfektáltuk, a sejteknek mintegy 90%-a mutatott dendritikus fenotípust, míg szétterült sejt alig volt megfigyelhető. A polibázikus régiót nem tartalmazó plazmiddal való transzfekció esetén viszont a sejtek jelentős része szétterült fenotípust mutatott. Az eltérő fenotípus létrejötte a vad típusú és mutáns p190RhoGAP hatására arra enged következtetni, hogy a fehérje polibázikus régiójának és az ezen keresztüli szabályozásnak fontos szerepe van a sejt morfológiájának kialakításában.

A p190RhoGAP szabályozása GSK-3β katalizálta foszforilációval

A p190RhoGAP foszforilációja GSK-3β-által

Együttműködő partnerünk munkacsoportja azt találta, hogy a GSK-3β *in vitro* és *in vivo* is foszforilálni képes a p190RhoGAP-ot a 1472-es szerin, 1476-os szerin és 1480-as treonin aminosav oldalláncokon. Az előfoszforiláció a 1476-os szerinen, a 1480-as treoninon és a 1483-as szerinen jöhet létre valószínűleg a p38MAPK vagy az ERK közreműködésével.

A p190(1191)ΔPBR proteinfragmenst használva az előfoszforiláció és a foszforiláció időfüggésének vizsgálata alapján meghatároztam az optimális kísérleti körülményeket, amelyeket a GTPáz aktivitás mérése során alkalmaztam (30 perc előfoszforiláció és 15 perc foszforiláció GSK-3β-val).

A GSK-3β katalizálta foszforiláció hatása a p190RhoGAP GAP aktivitására

Megvizsgáltam GSK-3β katalizálta foszforilációt követően a p190(1191)ΔPBR fragmens RhoGAP és RacGAP aktivitását. Előfoszforiláció hiányában GSK-3β hozzáadására sem a RhoGAP, sem a RacGAP aktivitás nem változott, míg amikor citoszollal történő előfoszforilációt is alkalmaztam, a p190(1191)ΔPBR RhoGAP és RacGAP aktivitása egyaránt csökkent. A GSK-3β katalizálta foszforiláció hatása a p190RhoGAP aktivitására független a kis G-fehérje poszttranszlációs módosításától, a GAP hatás csökkenése kimutatható volt akkor is, amikor a kísérlethez nem prenilált Rac-ot használtam. Ezzel szemben a lipidek hatása - így a PKC-vel történő foszforiláció hatása is - csak prenilált Rac esetében érvényesül.

KÖVETKEZTETÉSEK

PhD dolgozatomban a p190RhoGAP szabályozásának vizsgálatával kapcsolatos munkámat ismertettem. Vizsgáltam a p190RhoGAP foszfolipidekkel, PKCα-val és GSK-3β-val megvalósuló regulációját, feltérképeztem a molekula azon szakaszait, amelyeken ezek a szabályozási folyamatok megvalósulnak és ezen szakaszok szerepét a sejtek morfológiájának kialakításában.

PhD munkám első részében kimutattam, hogy a p190RhoGAP lipidkötéséért és lipidregulációjáért - foszfolipidek jelenlétében létrejövő RacGAP hatás fokozódásért és RhoGAP hatás csökkenésért - a molekula GAP doménjétől N terminális szakaszán lévő polibázikus régió felelős. Kimutattam továbbá, hogy ezen a polibázikus szakaszon található három olyan aminosav (S1221, T1226, S1236), amelyeken a PKCα foszforilálni képes a p190RhoGAP molekulát, és a 1221-es szerin és a 1226-os treonin foszforilációja az elektrosztatikus kapcsolat gátlásán keresztül kivédi a foszfolipidek hatását. A polibázikus régiónak és a régió foszforilációjának fontos szerepe van a sejt morfológiájának kialakításában: polibázikus régió hiányában a sejtek laposak, szétterültek, PKC-foszforiláció hiányában a sejtek lekerekednek, nyúlványosak lesznek.

Kísérleteim második részében a p190RhoGAP GSK-3β katalizálta foszforilációját vizsgáltam. Kimutattam, hogy a GSK-3β *in vitro* is képes foszforilálni a p190RhoGAP molekulát, amely foszforilációhoz előfoszforiláció szükséges. GSK-3β-val történő foszforiláció hatására a p190RhoGAP mind RacGAP, mind RhoGAP aktivitása csökken.

Kísérleti eredményeim hozzájárulnak a p190RhoGAP igen komplex szabályozásának feltérképezéséhez. Érdekes megfigyelni, hogy maga egy szabályozó protein is milyen összetett módon szabályozódik, és hogy a különböző enzimek hatására létrejövő foszforilációk eltérő módon befolyásolhatják a molekula RhoGAP és RacGAP aktivitását.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A tézisek alapjául szolgáló publikációk:

***Lévay M**, Settleman J, Ligeti E.*

Regulation of the substrate preference of p190RhoGAP by protein kinase C-mediated phosphorylation of a phospholipid binding site.
Biochemistry (2009) 48:8615-8623

IF: **3.379**

.

*Jiang W, Betson M, Mulloy R, Foster R, **Lévay M**, Ligeti E, Settleman J*

p190A RhoGAP is a glycogen synthase kinase-3-beta substrate required for polarized cell migration
J. Biol. Chem. (2008) 28:20978-20988

IF: **5.52**

Az értekezéshez témájához nem kapcsolódó egyéb közlemények:

*Mezei G, **Lévay M**, Sepler Z, Héninger E, Kozma GT, Cserháti E.*

Seasonal changes of proapoptotic soluble Fas ligand level in allergic rhinitis combined with asthma.
Pediatr. Allergy Immunol. (2006) 17:444-449

IF: **2.723**