

Az ARHGAP25 - egy új GTPáz aktiváló fehérje - sejtélettani szerepének vizsgálata humán fagocitákban

Doktori értekezés

Csépányi-Kömi Roland

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Prechl József tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Dr. Sőti Csaba egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Falus András egyetemi tanár, az MTA
rendes tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sármai Gabriella egyetemi tanár, az
MTA doktora

Dr. Prohászka Zoltán egyetemi tanár, az
MTA doktora

Budapest
2013

1 Tartalomjegyzék

2	Rövidítések jegyzéke	4
3	Bevezetés	8
3.1	A természetes immunrendszer fagocita sejtjei – a neutrofil granulociták	9
3.2	A kórokozók elpusztításának főbb mechanizmusai	12
3.2.1	A fagocitózis	12
3.2.1.1	A mintázatfelismerő receptorok szerepe a fagocitózisban.....	13
3.2.1.2	A komplement receptoron keresztüli fagocitózis	15
3.2.1.3	Az Fc receptoron keresztüli fagocitózis.....	17
3.2.2	Degranuláció	19
3.2.3	Szuperoxid termelés.....	20
3.3	A neutrofilek működésének zavarai.....	21
3.4	A guanin-nukleotid kötő fehérjék jellemzése	22
3.4.1	A kis G-fehérjék szerkezete és működése.....	23
3.4.2	A kis G-fehérjék családjai.....	25
3.4.2.1	A Ras család.....	25
3.4.2.2	A Rab család	27
3.4.2.3	Az Arf család	28
3.4.2.4	A Ran család	29
3.4.2.5	A Rho család	29
3.4.2.5.1	A Rac szerepe a természetes immunitás szabályozásában.....	31
3.4.3	A Rho család szabályozó fehérjéi	33
3.4.3.1	A guanin-nukleotid kicserélő faktorok (RhoGEF-ek)	33
3.4.3.2	A guanin-nukleotid disszociáció inhibitorok (RhoGDI-k)	34

3.4.3.3	A GTPáz aktiváló fehérjék (Rac/RhoGAP-ok).....	34
3.4.4	A Rac/RhoGAP-ok szerepe a fagocita funkciók regulációjában	36
3.4.4.1	Az Abr/Bcr szerepe fagocitákban	37
3.4.4.2	A p190RhoGAP	38
3.4.4.3	Az ARHGAP15	38
3.4.4.4	A p50RhoGAP	39
3.4.4.5	ARHGAP25	40
4	Célkitűzések.....	42
5	Módszerek.....	43
5.1	Microarray adatbázisok vizsgálata.....	43
5.2	Sejtek, sejtvonalak	44
5.3	Plazmidok, fehérjék	45
5.4	ARHGAP25-specifikus ellenanyag előállítása, tisztítása	46
5.5	Western blot	47
5.6	A GTPáz aktivitás mérése sejtmentes rendszerben	48
5.7	A membránfodrozódás vizsgálata	49
5.8	A szuperoxid termelés mérése	49
5.9	Filamentáris aktin jelölése PLB-985 sejtekben.....	50
5.10	Élesztő fagocitózisának vizsgálata áramlási citométerrel	51
5.11	Fagocitózis vizsgálat konfokális mikroszkóppal	51
5.12	Statisztikai analízis.....	52
6	Eredmények.....	53
6.1	A Rac/RhoGAP-ok, ezen belül az ARHGAP25 mRNS szöveti expressziós mintázatának vizsgálata	53
6.2	Az ARHGAP25 fehérje kimutatása fehérvérsejtekben.....	53
6.3	Az ARHGAP25 a Rac kis G fehérjét szabályozza	56

6.4	Az ARHGAP25 fagocitózisra gyakorolt hatásának vizsgálata.....	62
6.4.1	Az ARHGAP25 gátolja a fagocitózist COSphoxFcγR sejtekben.....	62
6.4.2	Fagocitózis során az ARHGAP25 kihelyeződik a fagoszóma membránhoz.	64
6.4.3	Az ARHGAP25 csendesítése PLB-985 sejtekben	65
6.4.4	A fagocitózis mérése áramlási citometriával	67
6.4.5	Az ARHGAP25 csendesítés fokozza a PLB-985 sejtek és a primer humán makrofágok fagocitózist.....	69
6.5	Az ARHGAP25 az aktin-átrendeződés lehetséges szabályozója.....	72
6.6	Szuperoxid termelés mérése ARHGAP25-csendesített PLB-985 sejteken ...	73
7	Megbeszélés	75
8	Következtetések.....	81
9	Összefoglalás.....	82
10	Summary	83
11	Irodalomjegyzék.....	84
12	Saját publikációk jegyzéke	107
13	Köszönetnyilvánítás	109

2 Rövidítések jegyzéke

Abr	active BCR-related
Ack	aktivált Cdc42-asszociált kináz
ARF6	ADP-riboszilációs faktor 6
Arp2/3	actin related protein 2/ actin related protein 3
Bcr	breakpoint cluster region
BORG	Binder of Rho GTPases
CIP-4	cdc42-interacting protein 4
COP	coat protein
CR	komplement receptor
CV	klatrin-burkos vezikula
DAG kináz	Diacilglicerín kináz
DH	Dbl homológ domén
Dia1, Dia2	diaphanous homolog 1
DOCK2	Dedicator of cytokinesis 2
EE	korai endoszóma
EGF	epidermális növekedési faktor
Erk	extracelluláris szignál által regulált kináz
FcR	Fc receptor
fMLP	N-formil-metionin-leucin-fenilalanin
GAP	GTPáz aktiváló protein
GBD	GTP-kötő domén
G-CSF	granulocita kolónia-stimuláló faktor
GEF	guanin-nukleotid kicserélő faktor
GPCR	G fehérje kapcsolt receptor
GPI	glikozil-foszfatidil-inozitol
Grb2	növekedési faktor-receptorhoz kötött protein 2
GRLF1	glukokortikoid receptor DNS-kötő faktor 1
GST	glutation-S-transzferáz
Hck	Hemopoetikus-sejt kináz
ICAM1	intracelluláris adhéziós molekula-1

IFN γ	interferon gamma
IgG	immunglobulin G
IL	interleukin
IRAK4	interleukin-1 receptor-asszociált kináz 4
ITAM	immunoreceptor tirozin alapú aktivációs motívum
ITIM	immunoreceptor tirozin alapú inhibítoros motívum
JNK	c-Jun N-terminális kináz
kDa	kilodalton
LAD	Leukocita adhézións defektus
LDL	low-density lipoprotein
LE	késői endoszóma
LFA1	limfocita funkció-asszociált antigén 1
LIM	Lin11, Isl-1 és Mec-3 proteinekre jellemző domén
LIMK	LIM domén kináz
Lyn	Yamaguchi szarkóma-vírus kináz
Lyso	lizoszóma
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MBS	miozin-kötő alegység
mDia1	mouse diaphanous homolog 1
MEK	mitogén-aktivált protein kináz/ERK kináz
MEKK	MEK kináz
MLCK	miozin könnyű lánc kináz
MLC-P	miozin könnyű lánc foszfatáz
MLK2	mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz 10
MLK3	mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz 11
MRCK	myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase
MSE55	55 kDa csontvelői stroma/endotélsejt protein
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene
NEMO	NF-kappa-B essential modulator
NF κ B	nuclear factor kappa b
PAK1	p21-aktivált kináz 1
PAMP	patogén-asszociált molekuláris mintázat

PBMC	perifériás vér mononukleáris sejtek
PDGF	vérlemezke eredetű növekedési faktor
PH	pleckstrin homológ domén
PI3-K	foszfatidil-inozitol-3 kináz
PI-4-P5K	foszfatidil-inozitol-4-foszfát 5-kináz
PIP3	foszfatidilinozitol (3,4,5)-triszfoszfát
PKN	interferon-indukált, dupla szálú RNS-aktiválta protein kináz
PLC β 2	foszfolipáz C β 2
PLD	foszfolipáz D
PM	plazmamembrán
PMN	polimorfonukleáris sejt
POR-1	partner of RAC1
POSH	plenty of SH3 domains
PRK1,2	protein kinase C-related kinase 1,2
PRR	mintázatfelismerő receptor
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RE	reciklizáló endoszóma
RER	durva endoplazmás retikulum
ROCK	Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase
ROK	RhoA-binding kinase
SCR	short consensus repeat
SH2	Src Homology 2
SOS	Son of Sevenless
Src	Madárszarkóma-vírus-kináz
Syk	Lép tirozin-kináz
TAB	TAK1-kötő protein
TAK1	Transforming growth factor- β -activated kinase 1
TCL	teljes sejt lizátum
TGN	transz Golgi hálózat
TLR	Toll-szerű receptor (Toll-like receptor)
TNF α	tumornekrózis faktor alfa
TRAF6	TNF receptor associated factor 6

Ub	ubikvitin
VCAM1	vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1
VLA4	Very Late Antigen-4
WASP	Wiskott–Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP család Verprolin-homológ protein

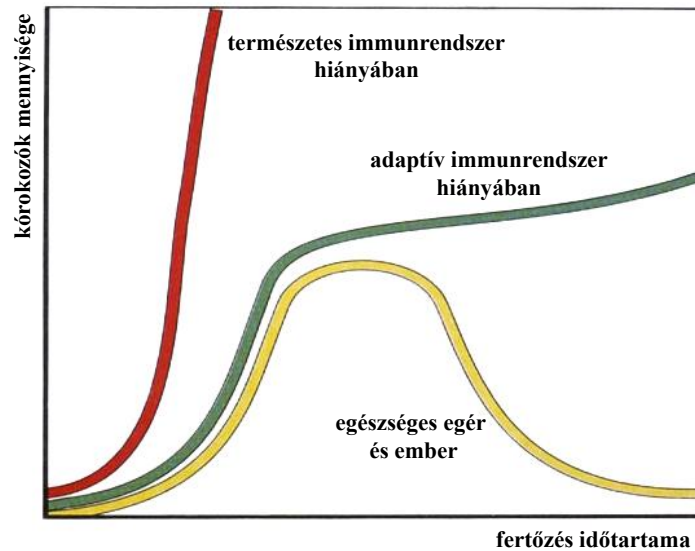
3 Bevezetés

Immunrendszerünk két fő, egymásra épülő egysége a veleszületett, vagy természetes, illetve szerzett, más néven adaptív immunrendszer. E kettő összehangolt működése szükséges az immunhomeosztázis, illetve a genetikai állandóság megőrzéséhez [1]. Egy 1998-ban készült tanulmány $4-6 \times 10^{30}$ -ra becsüli a Földön élő prokarióták számát. Ezen szervezetek adják az élőlényekben található szén és nitrogén tetemes részét [2]. Ha ehhez hozzávesszük a vírusokat, eukarióta egysejtűeket és gombákat, láthatjuk, hogy szervezetünk nap, mint nap igen nagyszámú mikroorganizmussal találkozhat, melyek egy része patogén. A kórokozók bőrön, nyálkahártyán való átjutása után a természetes immunrendszer fog elsőként – a fertőzést követően 0-4 órán belül – aktiválódni és ideális esetben rövid időn belül eliminálja a fertőző ágenszt. Ha a folyamat sikertelen, a fertőzés helyén gyulladás alakul ki, amely elősegíti további immunsejtek toborzását és aktiválódását. Mintegy 96 órával a fertőzés után aktiválódik az adaptív immunrendszer is, mely biztosítja a fajlagos immunválaszt és a későbbi immunológiai memóriát [3]. Működését tekintve az adaptív immunrendszer a természetes immunitásra épül, aktiválódásában kiemelt szerepük van az antigénprezentáló sejteknek csakúgy, mint a természetes immunrendszer által termelt citokineknek. A természetes immunitás kiemelt jelentőségét jól demonstrálja az 1. ábra, amely a kórokozók mennyiségi változását mutatja a gyulladással járó fertőzés időtartama során. Egészséges emberben, illetve egérben a kórokozók szaporodása egy idő után megáll, majd számuk csökkenni kezd, végül a megfelelően működő immunrendszer eliminálja a patogént. Adaptív immunrendszer hiányában a folyamat első fele megtartott, a kórokozók eltávolítása azonban sikertelen, számuk – csakúgy, mint a fertőzés időtartama – fokozatosan növekszik. Természetes immunrendszer hiányában drasztikus változások figyelhetők meg: a kórokozók száma a fertőzést követően rövid időn belül nagymértékben emelkedik, eliminációjuk sikertelen (1. ábra) [3].

A természetes immunitás sejtes elemei irányított mozgással találhatnak rá a patogénekre, majd specifikus receptoraikkal megkötve bekebelezik, végül enzimeik, illetve reaktív oxigén származékok segítségével elpusztítják a kórokozókat. Mindezen folyamatok nélkülözhetetlen szabályozó elemei a monomer GTPázok, más néven kis G-

fehérjék, melyek molekuláris kapcsolóként vesznek részt az immunválasz jelátviteli útvonalainak térbeni és időbeni finomhangolásában.

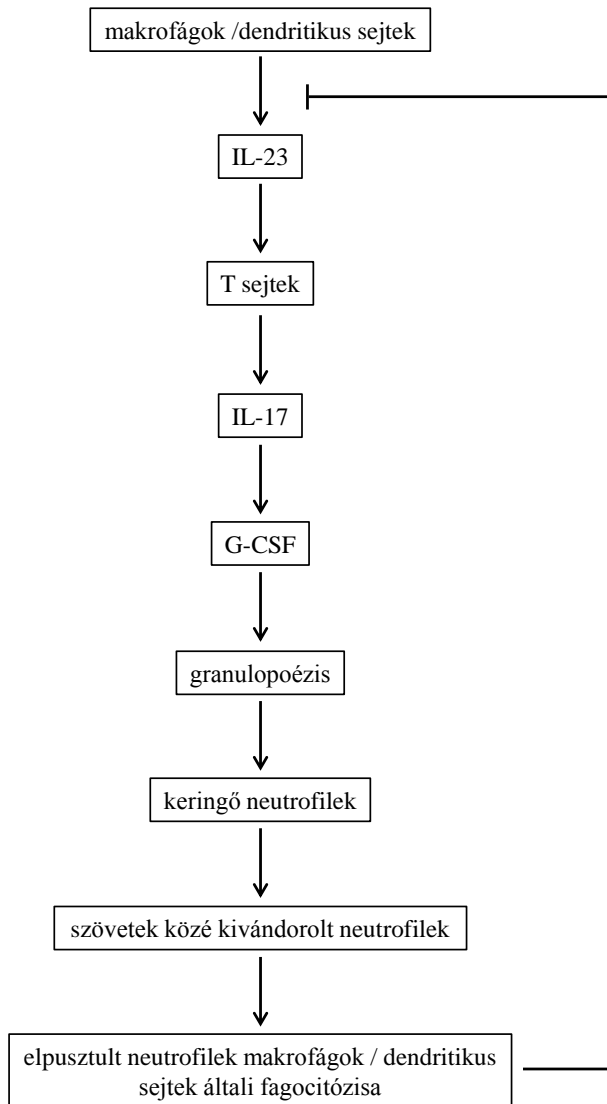
A következő fejezetekben a veleszületett immunrendszer fagocita sejtjeit, a neutrofil granulocitákat, illetve ezen sejtek működését, a patogének eltávolításának mechanizmusait, valamint a kis G-fehérjéknek e folyamatokban betöltött szerepét fogom tárgyalni.



1. ábra: A fertőzés időbeli lefolyása egészséges és immundeficiens egerekben és emberekben. A sárga görbe mutatja a kórokozók mennyiségi változását funkcionálisan ép immunrendszer esetén. Zöld görbe: a kórokozók számbeli növekedése ép természetes immunitás mellett, adaptív immunrendszer hiányában. Piros görbe: a funkcionálisan ép adaptív immunrendszer nem képes eliminálni a kórokozókat a természetes immunrendszer hiányában ([3] alapján, a szerző által módosítva).

3.1 A természetes immunrendszer fagocita sejtjei – a neutrofil granulociták

A természetes immunitás – csakúgy, mint az adaptív immunrendszer – celluláris és humorális komponensekből áll. Celluláris komponensei a makrofágok, dendritikus sejtek, granulociták (neutrofil, eozinofil, bazofil), hízósejtek valamint az NK sejtek. A neutrofil granulocitákat és a makrofágokat Metschnikoff írta le először, 1891-ben megjelent közleményében [4]. Ezen sejteket elsődleges funkciójuk alapján hivatásos fagocitáknak is nevezik [1]. Vizsgálataink főként a neutrofil granulocitákra épültek, így a továbbiakban ezeket a sejteket fogom részletesebben jellemezni.



2. ábra: A neutrofilek proliferációjában, differenciációjában szerepet játszó fontosabb citokinek. A részleteket lásd a szövegben. ([8] alapján, a szerző által módosítva).

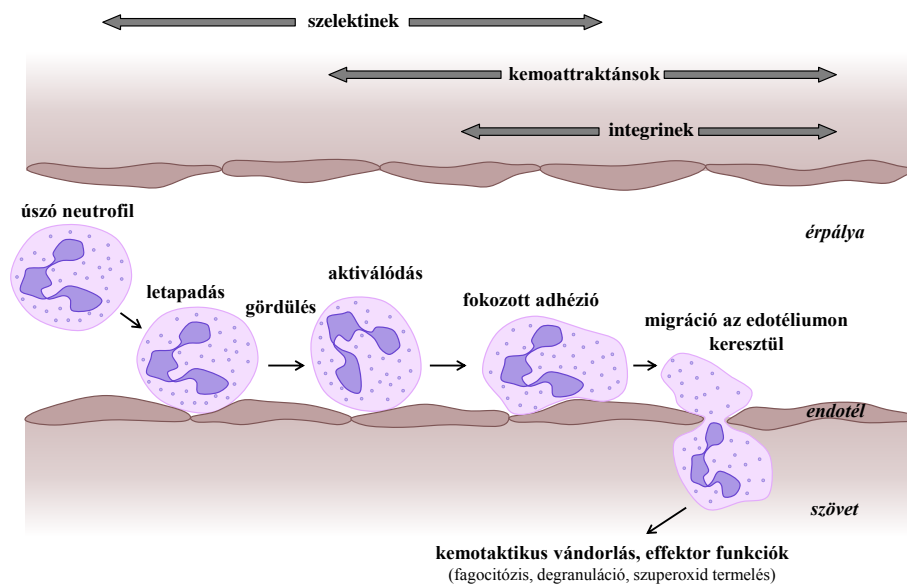
neutrofilek számának másik fontos szabályozója a szöveti környezetben elpusztult (és makrofágok által fagocitált) neutrofilek aránya [5]. Az apoptotikus neutrofileket bekebelező makrofágok kevesebb IL-23-at termelnek. A csökkent IL-23 hatására T-sejtekben ugyancsak csökken az IL-17 expresszió. Ezen citokin hiányában kevesebb G-CSF termelődik mely neutropéniát eredményez (2. ábra) [8].

A szervezetben megjelenő patogének, bakteriális endotoxinok, gyulladási citokinek (IL-1 β , TNF α , IFN γ), illetve más egyéb faktorok (pl. trombin) hatására az érfal endotél sejtek aktiválódnak, amely folyamat lehetővé teszi a neutrofilek fertőzés

A neutrofil granulociták nevüket a citoplazmájukban található nagyszámú granulumról, illetve szabálytalan alakú, több lebenyből álló sejtmagjukról kapták. Normál körülmények között, felnőtt emberben naponta $1-2 \times 10^{11}$ db neutrofil keletkezik a csontvelői őssejtekből [5]. Általánosan elfogadott nézet, hogy a perifériára kerülő neutrofilek igen rövid ideig élnek (néhány óra – 1-2 nap). Ezzel szemben Pillay és munkatársai 2010-ben megjelent közleményükben a neutrofilek élettartamát átlagosan 5,4 napra teszik [6]. A neutrofil előalakok proliferációjában, differenciációjában fontos szerepet játszik a G-CSF, szerepe azonban nem kizárólagos: G-CSF hiányos egerekben – noha a faktor hiánya krónikus neutropéniát okoz – mintegy 25%-ban megmarad a granulocitopoézis és keletkeznek érett neutrofilek [7]. A G-CSF mellett a

helyére való toborzását [9]. A neutrofilek endotélhez való kapcsolódásának (letapadás) első komponensei a szelektinek (E-, P-, és L-szelektinek) (3. ábra).

Mindhárom típusú szelektin kis affinitással kötődik szializált, illetve fukozilált oligoszacharidokhoz [10]. E reverzibilis, leukocita - endotél kapcsolat révén gördülnek tovább a neutrofilek az endotél mentén. A gördülés során a gyulladási endotél területén felszabaduló, a neutrofilek környezetébe jutó kemokinek hatására a neutrofilek aktiválódnak és integrineken keresztül kitapadnak az érfalra (fokozott adhézió). Ezt követően a neutrofil átkúszik az érfalon, mely történhet paracellulárisan, vagy transzcellulárisan (3. ábra). A transzcelluláris migráció során létrejön egy úgynevezett vezikulo-vakuoláris organelum, melyen mintegy alagúton keresztül képes átjutni a neutrofil [11]. A szövetek közé kilépő neutrofil mozgását a szöveti környezetbe kerülő (illetve lokálisan termelődő) kemotaktikus hatású anyagok (például fMLP, C3a, C5a, IL-8) irányítják (3. ábra). Ezen ligandokat hét transzmembrán szakaszt tartalmazó (úgynevezett 7TM) receptorok ismerik fel, a kiváltott jelátvitel jelen dolgozatban fontosnak íélt lépéseit a 3.4.2.5.1 fejezetben és a 14. ábrán mutatom be.

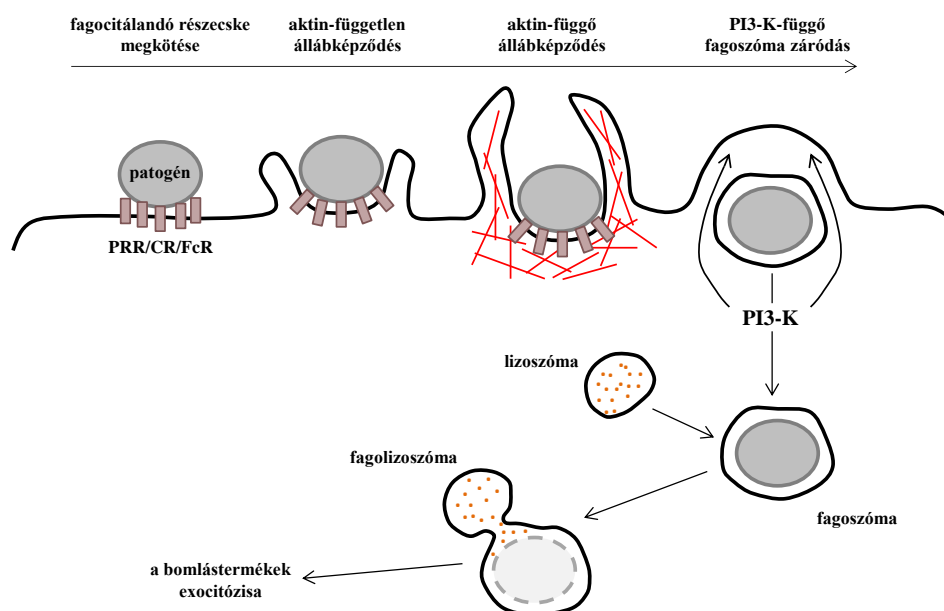


3. ábra: A neutrofil granulociták érpályából való kilépésének folyamata ([11] alapján).

3.2 A kórokozók elpusztításának főbb mechanizmusai

3.2.1 A fagocitózis

A fagocitózis vázlatos folyamatát a 4. ábra szemlélteti. Első lépésként a bekebelezésre kerülő részecske kötődik a neutrofilek felszínén található fagocitotikus receptorokhoz. A patogénekre jellemző sejtfelszíni molekuláris mintázatot (**P**athogen **A**ssociated **M**olecular **P**attern – PAMP) a mintázatfelismerő receptorok (**P**attern **R**ecognition **R**eceptor - PRR) ismerik fel. Az opsonizált (komplement komponensekkel, illetve ellenanyaggal fedett) részecskéket a komplement receptorok (CR) és az Fc-receptorok (FcR) kötik meg. A részecske kötődésének hatására aktin független állábképződés indul, melynek eredményeként kialakul a fagocitotikus serleg. A további jelátviteli lépések az aktin-citoszkeleton gyors átrendeződéséhez, ezáltal aktin-függő álláb-kitüremkedéshez vezetnek. Ezt követően záródik a formálódó fagoszóma, amely folyamat a PI3-kináz működéséhez (PI3-K) köthető. A lefűződő fagoszóma összeolvad a lizoszómával, létrehozva így a fagolizozómát (4. ábra).



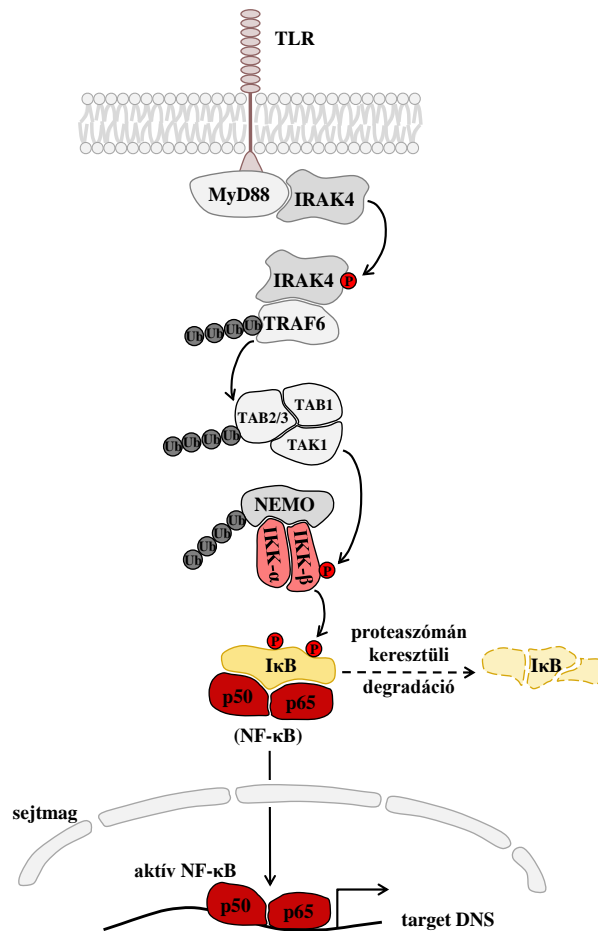
4. ábra: A fagocitózis főbb lépései. A fagocita mintázatfelismerő (PRR), komplement (CR), illetve Fc receptoraival (FcR) megkötí a patogént, majd aktin-független, illetve ezt követő aktin-függő állábképződéssel bekebelezi azt. A fagoszóma záródik, melyhez a PI3-K működése szükséges. A fagoszóma összeolvad a lizoszómával, a kialakult fagolizozómában a bekebelezett részecske lebomlik, végül a bomlástermékek exocitózissal kiürülnek a sejtől ([1, 12] alapján).

A lizoszómában (illetve a neutrofil granulomokban) található lebontó enzimek és antimikrobiális anyagok végül lebontják a patogént (4. ábra) [1, 12]. A következő fejezetben a fagocitózisban érintett receptorokat és főbb jelátviteli útvonalakat mutatom be.

3.2.1.1 A mintázatfelismerő receptorok szerepe a fagocitózisban

A természetes immunrendszer sejtjei nem képesek olyan specifikus antigénfelismerésre, mint az adaptív immunrendszer. Ennek ellenére különbséget tudnak tenni a saját és nem saját struktúrák között, melyben meghatározó szerepet töltenek be a mintázatfelismerő receptorok (PRR). Ezen receptorok nem egy konkrét struktúrát ismernek fel, hanem meghatározott molekuláris mintázatokat (PAMP), melyek hasonlóak a különböző patogénekben. Alapja a mikrobák sejtmembránjának a gerincesekétől eltérő cukor-, lipid- és szíalsav tartalma. A PRR-ek elhelyezkedésük szerint lehetnek szolubilisek, plazmamembránhoz kötöttek, citoplazmatikusak, illetve lehetnek vezikulumok membránjában lévő receptorok. Ebben a fejezetben csak a plazmamembránban található PRR-ek bemutatására szorítkozom, mivel a patogének bekebelezésének folyamatában a többi PRR típus lényegesen kisebb jelentőséggel bír. Fontos azonban megemlíteni, hogy a szolubilis PRR-ek ugyan nem vesznek részt közvetlenül a patogének felvételében, de mint opsoninek, nagyban elősegítik a fagocitózist. Ilyen opsonin hatású szolubilis PRR-ek például a C-típusú lektinek családjába tartozó pentraxinok (C-reaktív protein, szérum amiloid P), vagy egyéb C-típusú lektinek (kollektinek, fikolinok), melyek mikrobiális poliszacharidokat képesek megkötni [13]. A plazmamembránban található PRR-ek legismertebb képviselői a Toll-like receptorok (TLR). Leucinban gazdag extracelluláris részükkel számos bakteriális terméket, lipopoliszacharidokat, bakteriális lipoproteineket, lipoteicholsavat, nem metilált CpG-DNS-t, élesztő sejtalkomponenseket képesek felismerni [14]. Ligandot kötve a receptor homodimerizálódik. Ez alól kivételt képez a TLR2, mely a TLR1-gyel, vagy a TLR6-tal képez heterodimert. Jelenleg a Toll-like receptoroknak emberben 10 típusát különböztetik meg [14]. Ligandumaikat tekintve jellemzően a TLR1 és a TLR6 diacil- és triacil-lipopeptideket, a TLR2 főleg Gram-pozitív-, míg a TLR4 főként Gram-negatív baktériumok sejtfalát ismeri fel, a TLR5 ligandja pedig a flagellin.

A TLR3 a virális kettős szálú RNS-t, a TLR7 és TLR8 az egyszálú RNS-t, a TLR9 a metilálatlan CpG-DNS-t képes megkötni, azonban ez utóbbi négy receptor nem a plazmamembránban, hanem a fagoszóma, illetve fagolizoszóma membránjában található. A TLR szignalizációra az 5. ábra szolgál egy jellegzetes példával. A ligandkötés jellemzően NF- κ B útvonalat aktivál, amely citokinek, kemokinek, illetve antivirális fehérjék képződését indukálja [1].



5. ábra: A Toll-like receptorokból induló jelátvitel főbb lépései. Rövidítések: MyD88, Myeloid differentiation primary response gene (88); IRAK4, interleukin-1 receptor-associated kinase 4; TRAF6, TNF receptor associated factor 6; TAK1, Transforming growth factor- β -activated kinase 1; TAB, TAK1-binding protein; NEMO, NF-kappa-B essential modulator; P, foszforiláció; Ub, ubikvitin [15, 16].

A bakteriális- és gomba-eredetű sejtalkomponensek hatására például IL-2, TNF α és IL-8 citokinek képződnek [17]. A TLR-ek tehát közvetlenül nem indítanak el fagocitózist, de a sejtaktivációban, a fagoszómaérésben és az antigén-specifikus immunválasz beindításában fontos szereppel bírnak [1].

A mintázatfelismerő receptorok másik nagy csoportját a scavenger receptorok alkotják. Lehetnek trimer szerkezetűek, illetve egy, vagy két transzmembrán szakaszt hordozó molekulák. Ligandumaik anionos peptidek és módosult lipidek. Emellett egyes típusaik képesek megkötni a bakteriális lipopoliszacharidokat, virális dsRNS-t, illetve az oxidált „low-density” lipoproteineket (LDL) [1]. A scavenger receptorok így a patogének eliminálása mellett fontos szerepet töltenek be az apoptotikus sejtek/testek eltávolításában is.

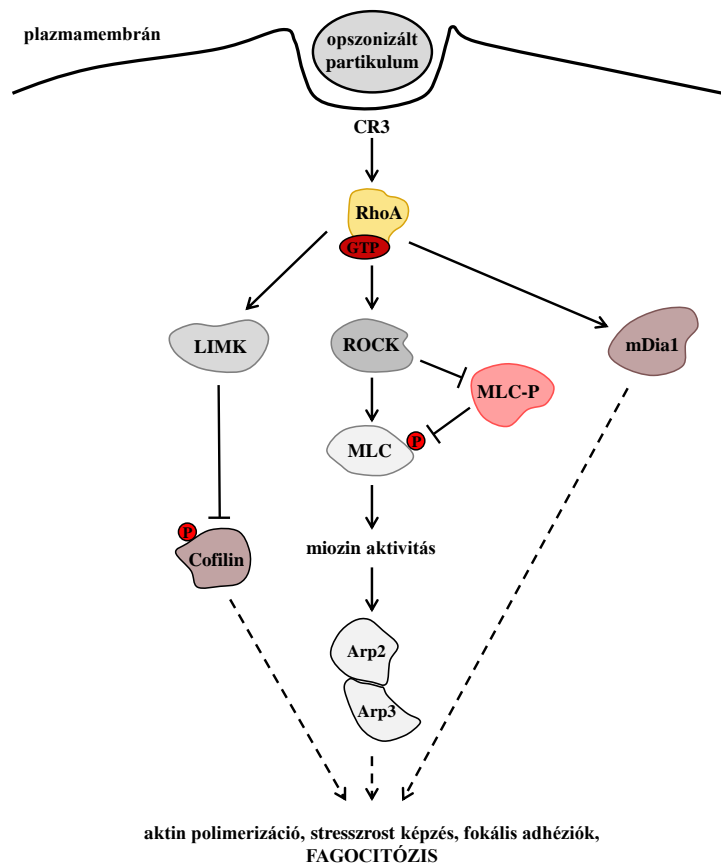
A membránkötött C-típusú lektinreceptorok a scavenger receptorokhoz hasonlóan szintén közvetlenül vesznek részt a fagocitózisban. Közös jellemzőjük, hogy szénhidrátfelismerő doméneket tartalmaznak. Ide sorolható például a makrofágok mannózkötő receptora, amely hatékonyan vesz részt mannóztartalmú molekulák endocitózisában [1]. Ugyancsak ide sorolható – bár nem klasszikus C-típusú lektinreceptor – egy nemrég felfedezett PRR, a Dectin-1, amely gomba-eredetű β -glukánt ismer fel. A gombasejtek által keresztükötött Dectin-1 citokintermelődést (pl. TNF α) indukál, ezáltal a sejtaktivációban játszik fontos szerepet [1, 18].

3.2.1.2 A komplement receptoron keresztüli fagocitózis

A komplementrendszer aktiválódása során számos olyan hasítási termék keletkezik, melyek a patogéneket opsonizálva elősegítik azok bekebelezését. Ezen hasítási termékeket a CR1-4 komplement receptorok ismerik fel. A CR1 harminc, a CR2 tizenöt SCR (short consensus repeat) doménből áll. A CR3 (más néven integrin α M β 2, vagy CD11b+CD18, vagy MAC-1) és a CR4 (integrin α X β 2, vagy CD11c+CD18) heterodimer molekulák [1, 19]. A neutrofileken ezek közül a CR1, CR3 és CR4 receptorokat találjuk, részben a plazmamembránban, részben a szekretoros vezikulákban (3.2.2. fejezet), a CR2 B-sejtek, illetve aktivált T-limfociták felszínén fejeződik ki. A CR1 legfontosabb ligandja a C3b, de köti a C4b-, iC3b- és a C1q-molekulákat is. Ezen receptornak a fagocitózisban betöltött szerepén túl kiemelt szerepe van az immunkomplexek eliminációjában is. Az integrinek családjába tartozó CR3 egyrészt a C3b-, iC3b-, C3d-fragmentekkel jelölt partikulumok fagocitózisát indukálja, másrészt a neutrofilek adhézióját biztosítja az ICAM-1 molekulán keresztül (3.1.

fejezet). A CR4 receptor szerkezetében és funkciójában nagyon hasonlít a CR3 molekulához [1, 20].

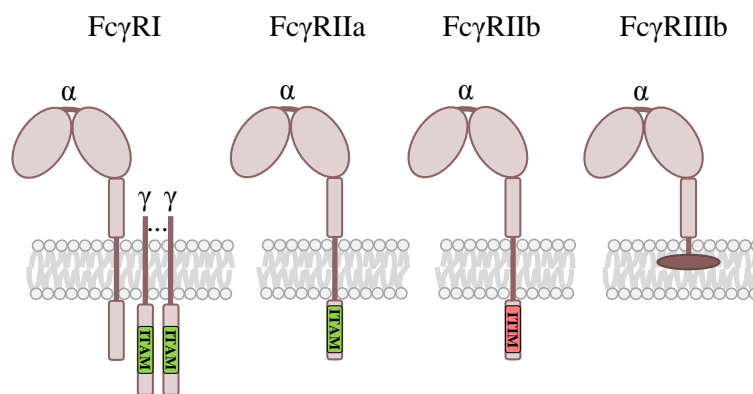
A komplement-mediált fagocitózis főbb jelátviteli lépéseit a 6. ábra szemlélteti. A folyamatban központi szerepet játszik a RhoA kis G-fehérje, mely GTP-t kötve aktiválja a ROCK (**R**ho-associated, **c**oiled-coil containing protein **k**inase) kinázt. Az aktiválódott ROCK gátolja a miozin könnyű lánc foszfatázt (MLC-P), amely így nem tudja defoszforilálni a miozin könnyű láncot (MLC). A foszforilált állapotban lévő MLC végeredményben kontrakcióhoz vezet. A ROCK ezzel párhuzamosan foszforilálja a LIM kinázt (LIMK), amely foszforilálja, és ezáltal gátolja a cofilin molekulát. Az említett folyamatok aktin-átrendeződéshez, stresszrostok és fokális adhéziók kialakulásához, illetve végeredményben az opsonizált partikulum bekebelezéséhez vezetnek. Egyes munkacsoportok az mDia1 (**m**ouse **d**iaphanous homolog **1**), illetve az Arp2/3 (**A**ctin-related **p**rotein, lásd később) szerepét is leírták a folyamatban (6. ábra) [21, 22].



6. ábra: A komplement receptoron keresztüli fagocitózis vázlatos jelátviteli útvonalai. ([21, 22] alapján).

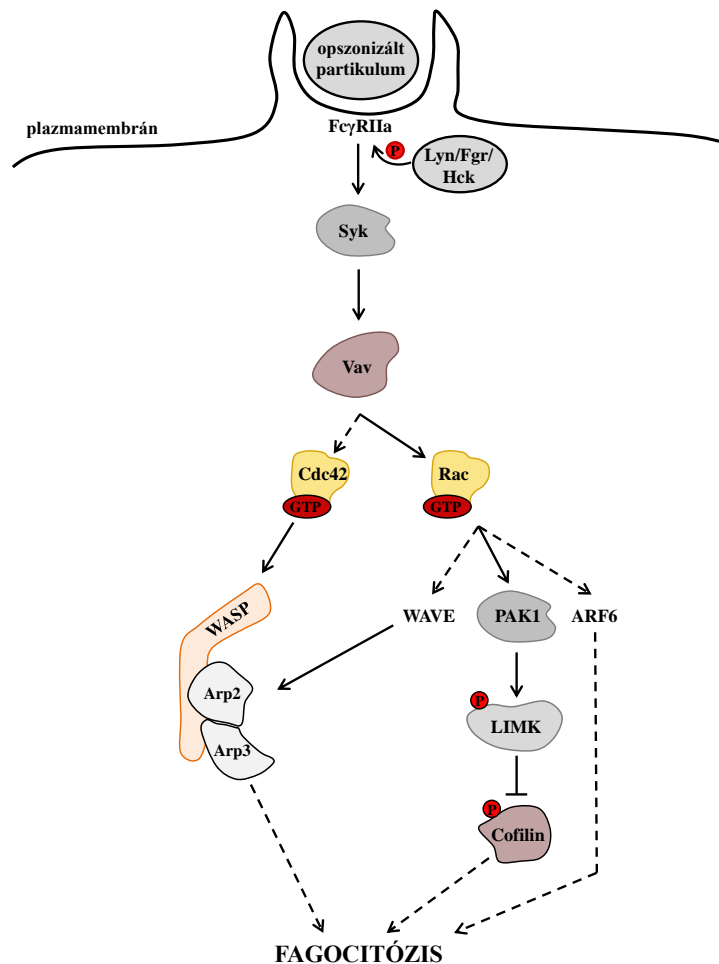
3.2.1.3 Az Fc receptoron keresztüli fagocitózis

A komplement fragmensek mellett az opsoninek másik fő csoportját az ellenanyagok képezik. Specifikus receptoraik az immunglobulin-szupercsaládba tartozó, az ellenanyagok konstans (Fc) részét felismerő Fc-receptorok. Az Fc-receptorok az immunglobulinoknak megfelelő izotípusmegoszlást mutatnak, jelen fejezetben azonban csak az IgG-t felismerő Fc γ -receptorokat (Fc γ R) fogom tárgyalni. Az Fc γ R-oknak is több típusát szokás megkülönböztetni, közülük neutrofileken az Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb valamint az Fc γ RIIIb fejeződik ki. Az Fc γ RI nagy affinitású receptor, egy α -láncból és a hozzá kapcsolódó γ -lánc-dimerből áll. A γ -láncok hordozzák a jelátvitel szempontjából fontos ITAM (immunoreceptor tirozin alapú aktivációs motívum) motívumokat (7. ábra). Az Fc γ RIIa nem tartalmaz γ -láncot, az ITAM motívumot az α -lánc citoplazmatikus doménje hordozza. A szerkezeti felépítésben hasonló Fc γ RIIb receptor szintén nem tartalmaz γ -láncot, ugyanakkor α -láncának intracelluláris doménjében gátló ITIM (immunoreceptor tirozin alapú inhibitoros motívum) szekvencia található (7. ábra). Az Fc γ RIIIb kis affinitású receptor, nem tartalmaz ITAM vagy ITIM szekvenciákat, az extracelluláris rész egy glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) horgonnyal rögzül a plazmamembránban (7. ábra) [23, 24]. Az Fc γ RI és Fc γ RIIa receptorok elindítják, az Fc γ RIIb pedig gátolja a fagocitózist. Az Fc γ RIIIb megnövekedett citoszolikus Ca²⁺ koncentrációt (Ca²⁺ jelet) és aktin polimerizációt indukál, a fagocitózisban betöltött szerepe azonban még nem ismert [12].



7. ábra: A neutrofileken található Fc γ receptorok vázlatos szerkezete. ITAM: immunoreceptor tirozin alapú aktivációs motívum; ITIM: immunoreceptor tirozin alapú inhibitoros motívum ([1] alapján).

A neutrofilek Fc γ R-mediált fagocitózisában elsősorban az Fc γ RIIa játszik kiemelt szerepet. A folyamat jelátviteli lépéseit a 8. ábra szemlélteti. Kezdeti lépéseként az antigén - ellenanyag komplex keresztüköti az Fc receptorokat, ezáltal lehetővé válik az ITAM motívumok Src-típusú tirozin-kinázok (Src, Hck, Lyn) általi foszforilációja. A foszforilálódott ITAM-hoz két SH2 doménjén keresztül a Syk tirozin-kináz kapcsolódik, mely ezt követően foszforilálja és ezáltal aktiválja a Vav1 guanin-nukleotid kicserélő faktort (GEF), mely a Rac kis G-fehérjét aktív, GTP-kötött állapotba juttatja (lásd 3.4.3.1 fejezet) [23-25]. Jelenleg úgy tudjuk, hogy a Vav csak a Rac-ot aktiválja, és csak az FcR-mediált jelátvitelben vesz részt, a komplement-mediált fagocitózis útvonalában nem. Ugyanakkor leírták, hogy a Rac mellett a Cdc42 kis G-fehérje is részt vesz a további folyamatok szabályozásában [24, 26].



8. ábra: Az Fc γ RIIa receptorból induló, fagocitózis főbb jelátviteli lépései. (<http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04666.html> alapján).

GTP-kötésüket követően a Rac és a Cdc42 aktiválják a WASP (**W**iskott–**A**ldrich **S**ndrome **P**rotein) fehérjét, amely kapcsolódik a már felépült aktinszál végén található Arp2/3-hoz, elindítva ezzel egy elágazódó aktinszál növekedését, mely az eredeti szálhoz képest 70 fokos szöget zár be [27-29]. A Rac ezen kívül aktiválja az WAVE (WASP family Verprolin-homologous protein) és ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) fehérjéket, melyek szintén részt vesznek az aktin-átrendezés szabályozásában. A Rac másik fontos effektor fehérjéje a PAK1 (p21-activated kinase 1), mely a LIM kinázon és a cofilin-en keresztül fejt ki hatását az aktin-felépülés során. Emellett a PAK1 foszforilálja és ezáltal aktiválja a miozin könnyűlánc kinázt (MLCK). Az MLCK a miozin könnyű láncot foszforilálja, így lehetővé téve a miozin – aktin kapcsolódást (8. ábra) [30, 31]. A kialakuló fagoszóma fölött végül záródik a sejtmembrán amely PI3-kináz-függő folyamat [12]. Különbség a komplement-mediált fagocitózishoz képest, hogy a CR-on keresztüli fagocitózis során a partikulum mintegy „besüllyed” a neutrofil membránjába (6. ábra), addig az Fc receptoron keresztüli fagocitózis során állászerű kitüremkedések veszik körül a bekebelezendő részecskét (8. ábra). Jelenleg úgy tudjuk, hogy míg a Cdc42-nek az álláb-képződésben van kiemelt szerepe, addig a Rac a bekebelezendő partikulum körbezárásának folyamatait irányítja [30]. Fontos megjegyezni, hogy a fagocitózis jelátviteli útvonalai az itt bemutatottnál lényegesen összetettebbek, itt csupán az értekezés szempontjából lényeges útvonalak, illetve jelátviteli komponensek kerültek bemutatásra.

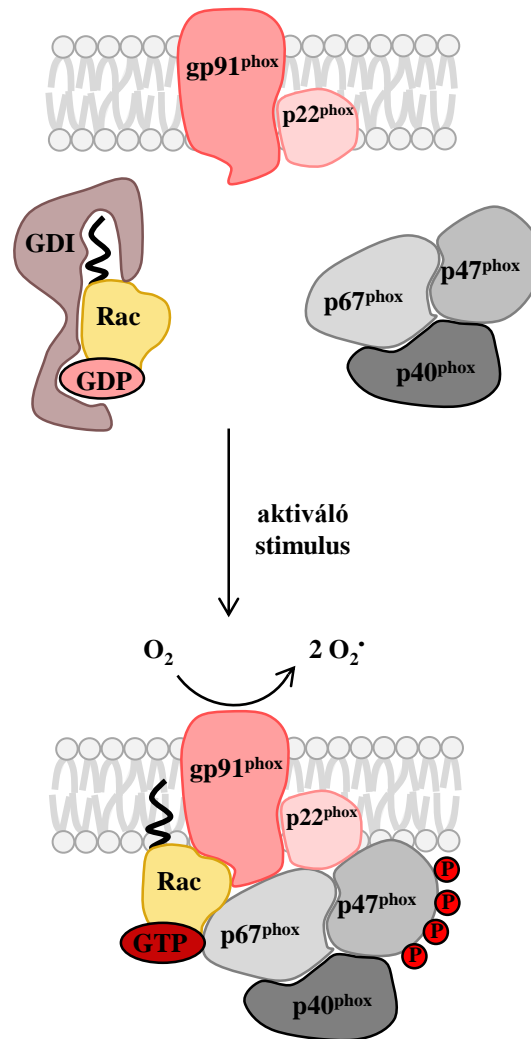
3.2.2 Degranuláció

A bekebelezett és fagoszómába került, vagy az extracelluláris térben lévő kórokozók elpusztításának két fontos mechanizmusa a degranuláció és a szuperoxid termelés. A degranuláció során a neutrofilek granulumai a sejtmembránnal, vagy a fagoszóma membránjával fuzionálva tartalmukat az extracelluláris térbe, vagy a fagoszóma mátrixába ürítik. Felszabadulásuk Ca^{2+} -függő folyamat. A neutrofilek granulumait tartalmuk szerint négy csoportba oszthatjuk: primer, vagy azurofil granulumok, szekunder, vagy specifikus granulumok, terciér, vagy zselatináz granulumok, és szekretoros vezikulák [1]. Elsőként a szekretoros vezikulák ürülnek,

majd a terciér granulumok. Ezeket követi a szekunder, majd végül a primer granulumok tartalmának kiürítése [31]. A granulumok baktericid és proteolitikus anyagokat tartalmaznak (pl. defenzinek, katepszin-G, laktoferrin, lizozim, alkalikus foszfatáz), de ezek mellett nagy mennyiségben raktározódnak bennük a sejtekre jellemző receptorok, membránfehérjék is (pl. CR3, flavocitokróm b₅₅₈) [1].

3.2.3 Szuperoxid termelés

A neutrofilek szuperoxid termeléséért a fagocita NADPH-oxidáz (Phox) enzimrendszer felelős. Komponensei a plazmamembránban, illetve a szekretoros vezikulák membránjában található glikoprotein 91phox (gp91^{phox}) és a p22^{phox} (a phox a fagocita oxidázra utal) heterodimer – melyet szoktak még flavocitokróm b₅₅₈-nak is nevezni –, valamint a citoszolban található p40^{phox}, p47^{phox} és a p67^{phox}. A neutrofil aktiválódását követően a p47^{phox} foszforilálódik, ezáltal lehetővé válik a p47^{phox}, p67^{phox} és p40^{phox} membránhoz történő transzlokációja (9. ábra) [32, 33]. Az oxidáz működéséhez ezen kívül szükséges még a Rac kis G-fehérjének a komplexbe kötődése is (lásd 3.4.2.5.1. fejezet). Az összeépült oxidáz végül képes lesz elektronokat transzportálni a NADPH-ról a molekuláris oxigénre, szuperoxid anionná redukálva azt (9. ábra). A keletkezett szuperoxid anionokat a nitrogén-monoxid (NO) peroxinitritté (N₂O₂), a szuperoxid-dizmutáz hidrogén-peroxiddá (H₂O₂) alakítja. Az elsődleges granulumokban található mieloperoxidáz enzim a hidrogén-peroxidot tovább alakítja hipoklórossavvá, mely a későbbiekben klóraminokká és hidroxilgyökökké alakul. Az így létrejött reaktív oxigéngyökök (ROS) jelentős károsító hatással bírnak a baktériumokkal szemben [34-36].



9. ábra: A fagocita NADPH oxidáz összeszerelődése ([37] alapján).

3.3 A neutrofilek működésének zavarai

Az antibakteriális védelemben a neutrofilek vándorlása, fagocitózisa, degranulációja és szuperoxid termelése egyaránt fontos. Bármelyik hiánya súlyos, visszatérő, krónikussá váló fertőzések kialakulásához vezet. A leukocita adhéziós defektus (LAD) esetében a neutrofilek érből való kilépése és a fertőzés helyére történő vándorlása károsodik. A betegség I-es típusában a $\beta 2$ integrinek hiánya figyelhető meg. Ennek következtében a neutrofil ugyan tovább tud gördülni az endotél mentén, de képtelen a fokozott adhézióra és az érből való kilépésre. A LAD II-es típusában a fukozilált szelektin-ligandok kifejeződésének teljes hiánya figyelhető meg [38], III. típusának hátterében egy, az integrin-aktiváció szabályozásában érintett gén defektusa

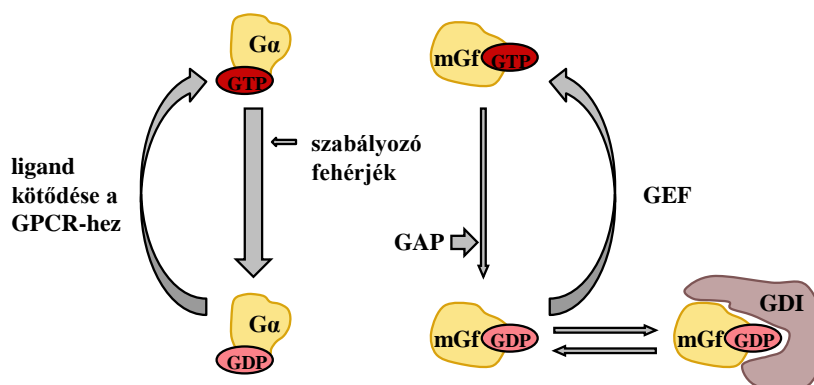
áll [39]. A TLR jelátvitelben érintett IRAK-4 (5. ábra) hiánya súlyos, visszatérő *Streptococcus pneumoniae* és *Staphylococcus aureus* fertőzésekkel jár [40]. A Chediak-Higashi szindróma kialakulása a granulomok intracelluláris transzportjának zavarára, illetve a fagoszóma-lizoszóma összeolvadás elégtelenségére vezethető vissza, mely a visszatérő bakteriális fertőzések mellett megnövekedett vérzési idővel, illetve perifériás neuropátiával jár [41]. Egy másik kórképet, a specifikus granulom deficienciát a kemotaxis, a receptor kihelyeződés és a baktériumölés elégtelensége jellemzi. Kialakulása a szekunder és terciér granulomokban tárolt enzimek hiányára vezethető vissza [42]. A fagocita oxidáz szerepének fontosságát hangsúlyozza komponenseinek veleszületett genetikai rendellenessége, a krónikus granulomatózis betegsége, mely súlyos, visszatérő, krónikussá váló bakteriális és gombás fertőzésekkel jár [43].

3.4 A guanin-nukleotid kötő fehérjék jellemzése

A guanin-nukleotid kötő fehérjék két nagy csoportját a heterotrimer G-fehérjék, valamint a monomer, más néven kis G-fehérjék alkotják. A heterotrimer G-fehérjék három különböző alegységből állnak (α , β és γ), melyek közül az α alegység felelős a GTP/GDP kötésért [44]. A humán genom a 17 α alegység mellett 5 β és 14 γ alegységet tartalmaz [44]. A heterotrimer G-fehérjék a plazmamembrán közelében, G-fehérje kapcsolt receptorokhoz (GPCR) asszociáltan találhatók. A receptor ligandkötésének következtében a G-fehérje α -alegységéhez kötődő GDP GTP-re cserélődik. Az így aktiválódott G-fehérjéről ledisszociál az α -alegység, és ő maga, valamint a $\beta\gamma$ komplex is további jelátviteli útvonalak szabályozásában vesznek részt [44]. Az α -alegység a GTP-t elhidrolizálva újra inaktív állapotba kerül, és a három alegység összekapcsolódásával ismét létrejön a kezdeti heterotrimer komplex [45].

A monomer, más néven kis G-fehérjék egyetlen, 20-25 kDa tömegű polipeptid láncból állnak. A heterotrimer G-fehérjéktől eltérő szerkezetük és poszttranszlációs módosításaik (C-terminálisan farnezil-, geranil-geranil csoportok, N-terminálisan mirisztoilálódás) változatos sejten belüli lokalizációt (plazmamembrán, endoplazmás retikulum, Golgi-hálózat, szekretoros vezikula, endocitotikus vezikula, magmembrán, citoplazma, citoskeleton), ezáltal számos sejtfunkció szabályozását teszik lehetővé [46-52]. Aktivációjukat a heterotrimer G-fehérjékkel ellentétben nem közvetlenül a receptor

ligand-kötése, hanem speciális aktiváló fehérjék, a guanin-nukleotid kicserélő faktorok (GEF-ek) végzik, melyek elősegítik a GDP disszociálódását, ezáltal a GTP megkötését (mivel a GTP/GDP arány a citoplazmában az előbbi javára van eltolódva). A kis G-fehérjék endogén GTP hidrolízisének sebessége mintegy 2-3 nagyságrenddel elmarad a heterotrimer G-fehérjék α alegységének hidrolízis-sebessége mögött [53]. Ezt a lassú GTP bontást egy másik szabályozó fehérje csoport, a GTPáz aktiváló fehérjék (GAP-ok) képesek igen jelentősen fokozni, inaktíválva ezáltal a kis G-fehérjéket. A GEF-ekkel ellentétes hatásúak a guanin-nukleotid disszociáció inhibitorok (GDI-k). Gátolják a kis G-fehérjék nukleotid hidrolízisét és a GDP disszociációját, ezáltal inaktív állapotban tartják a kis G-fehérjéket [44]. A heterotrimer és monomer G-fehérjék működését és szabályozását a 10. ábra foglalja össze.

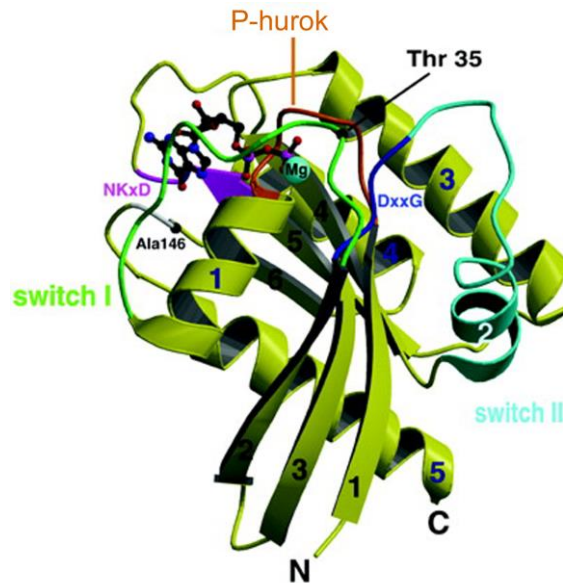


10. ábra: A G-fehérjék GTPáz ciklusa. A heterotrimer G-fehérjék α alegységének (G α) GTPáz aktivitása 2-3 nagyságrenddel nagyobb, mint a monomer G-fehérjéké (mGf), melyet a nyilak eltérő vastagsága szimbolizál. GAP: GTPáz aktiváló protein; GEF: guanin-nukleotid kicserélő faktor; GDI: guanin-nukleotid disszociáció inhibitor [15].

3.4.1 A kis G-fehérjék szerkezete és működése

A kis G-fehérjék egyetlen polipeptid láncának GTP kötésért felelős szakasza a G-doménnek nevezett régió, mely másodlagos szerkezetét tekintve hat β -lemezből és öt α -hélixből áll (11. ábra). A G-doménen belül öt, evolúciósan konzervált motívum található (G1-G5) [54]. A G1 régió – melyet foszfátkötő huroknak, vagy P-huroknak is neveznek – GXXXXGKS/T motívumán keresztül a GTP β és γ pozíciókban lévő foszfátcsoportjaihoz kapcsolódik. A G3 motívumban (DXXGQ/H/T) található aszparaginsav a guanin-nukleotid bázisával, a G5 motívumban (S/CAK/L/T) található alanin pedig a guanin oxigén atomjával létesít hidrogénkötést. A G4 motívum szintén a

guanin-nukleotid bázisával alakít ki kapcsolatot. Így végeredményben sztérikus okokból nem lehetséges az adenin-nukleotidok bekötődése, így válik a kötőseb guanin-nukleotid specifikussá. (11. ábra) [55, 56]. A G2 és G3 motívumokat switch I és switch II régióknak is nevezik, melyeknek kiemelt jelentőségük van a GTP-, illetve GDP-kötött állapot közötti konformációváltozás kialakításában (11. ábra).



11. ábra: A kis G-fehérjék szerkezete ([56], a szerző által módosítva).

Ezen régiók szerkezetét legelőször a Ras fehérjében tárták fel, ahol a switch I a 32. és 38., a switch II az 59. és 67. aminosavak közötti szakaszt jelöli [57]. GTP-kötött formában a γ pozíciójú foszfátcsoport oxigénatomjai hidrogénhidat képeznek a switch I és switch II régiókban található aminosavak -NH- csoportjaival. A switch I régió egyik kiemelt jelentőségű aminosava a G3 motívumban (DXXGQ/H/T) található treonin (a Ras esetében ez a 35. pozícióban található), a másik a switch II régióban található glicin (a Ras esetében a 60. helyen található), amely oldalláncával a nukleotidot stabilizáló Mg^{2+} -ion megkötésében is szerepet játszik (11. ábra).

A GTP terminális foszfátcsoportjának hidrolízise rugószerű mechanizmusra emlékeztető konformációváltozást idéz elő: a korábban „zárt” állapotban lévő switch I. és II. régiók relaxálnak. A „zárt” állapot teszi lehetővé, hogy a GTP-t kötött kis G-

fehérjék más effektor fehérjékhez kapcsolódnak, míg a GTP-hidrolízis utáni „nyitott”, inaktív konformáció ezt gátolja.

A kis G-fehérjék szerkezetének tárgyalása során említést kell tennünk poszttranszlációs módosításairól is, melynek során a fehérjének főként C-terminális része apoláros oldalláncokkal bővül. A különböző kis G-fehérje családokra más-más poszttranszlációs módosítás jellemző. A Ras család esetében farnezilálás és palmitoilálás történik, melyet a farnezil transzferáz enzim végez. A Rho családra a geranil-geraniláció jellemző, melyért a geranil-geranil transzferáz I enzim felelős. A Rab család esetében ugyanezen módosítást a geranil-geranil transzferáz II végzi. Az Arf családra az N-terminálisan történő mirisztoilálás jellemző. Ezen módosítások meghatározzák a kis G-fehérjék lokalizációját, alapvető fontosságúak membránhoz történő kötődésükben, szabályozó fehérjékkel való együttműködésükben, ezáltal biológiai funkcióikban. [58, 59].

3.4.2 A kis G-fehérjék családjai

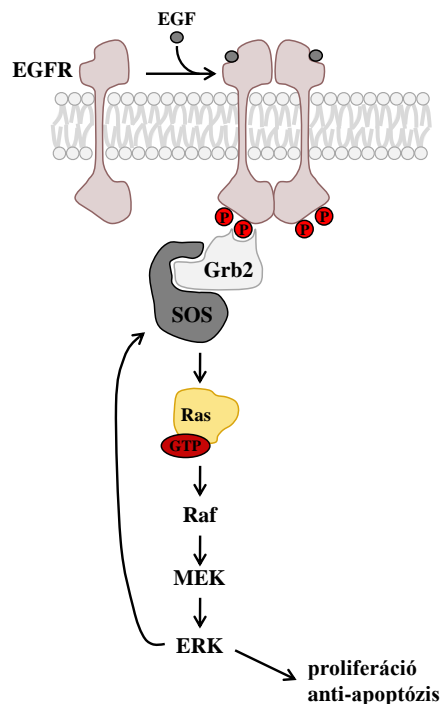
A legkorábban megismert Ras kis G-fehérjéről elnevezett szupercsalád több mint száz tagot számlál, melyeket szerkezetük, sejten belüli lokalizációjuk és az általuk szabályozott funkciók szerint öt családba sorolhatunk: a Ras, Rho (szokás még Rac/Rho családnak is nevezni), Rab, Arf és Ran alcsaládokba [60]. Emellett vannak újabban megismert kis G-fehérjék, melyek a fent nevezett kritériumok alapján nem sorolhatók be az említett csoportokba, így ezek külön családokat képeznek, mint például Rap, Rheb, Rad, Miro [61].

3.4.2.1 A Ras család

Az első két humán Ras gént a Harvey szarkóma vírus (H-Ras) és a Kirsten szarkóma vírus (K-Ras) onkogénjeinek celluláris homológjaiként Edward M. Scolnick és munkatársai azonosították 1982-ben [62]. Az említett két vírust az 1960-70-es években Jennifer Harvey és Werner Kirsten fedezték fel patkányban [63, 64], innen ered a Ras – **Rat** sarcoma virus elnevezés. A harmadik Ras gént neuroblasztóma sejtekből

azonosították [65]. Mára a Ras család további tagokkal bővült, mint például az M-Ras, R-Ras, Ral-A, Ral-B, vagy a Rap gének [66].

A Ras fehérjék a génexpresszió, sejtproliferáció és differenciáció szabályozói, de szerepet játszanak a humán onkogenezisben, valamint apoptózist gátló jelpályákban is. Aktiválódásukban számos növekedési faktor, hormon, illetve citokin érintett. Talán a legközismertebb – és a legkorábban feltárt – jelátviteli útvonal a Ras-MAP-kináz kaszkád (12. ábra). Ennek során a szignalizáció kezdeti lépéseként növekedési faktorok (EGF, PDGF) aktiválják a tirozin-kináz aktivitású receptorokat. A ligandkötés hatására a receptor dimerizálódik és auto-, illetve keresztfoszforilálódik. A foszforilált tirozin oldalláncok lehetővé teszik adaptor fehérjék kötődését, esetünkben például a Grb2-ét. A receptorhoz kapcsolódó Grb2 toborozza a RasGEF SOS-t, amely elősegíti a Ras-hoz kötött GDP disszociációját, lehetővé téve ezáltal a Ras GTP kötését és aktiválódását [67]. Az aktív, GTP-t kötött Ras a Raf szerin/treonin-kinázhoz kötődik, majd a Raf egy foszforilációs kaszkádot indít el (MAP-kináz kaszkád), melynek végeredményeként az aktivált ERK a sejtmagba jut, ahol foszforilálja az Ets családba tartozó transzkripciós faktorokat, melyek aktiválják a megfelelő promotereket, megváltoztatva ezzel egyes gének átírását (12. ábra) [60, 68].

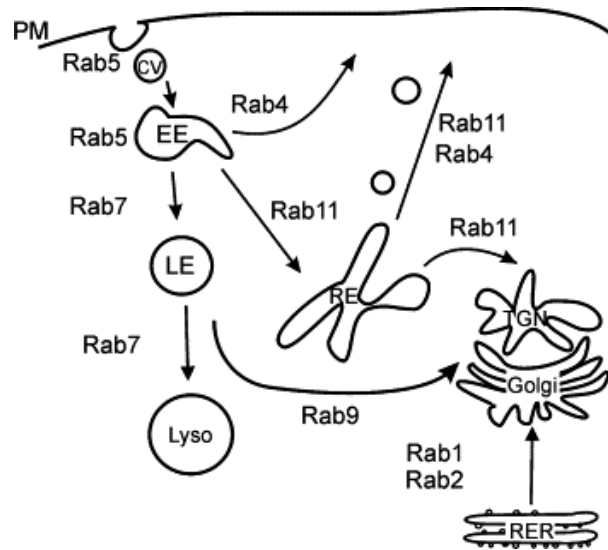


12. ábra: A Ras - MAP-kináz útvonal. A részleteket lásd a szövegben[69].

Ugyanakkor az EGF receptor jelátvitelében ismertté vált egy visszacsatolási hurok is, melynek során az aktivált ERK foszforilálja a SOS-t, amely így leválik a Grb2-ről, megállítva ezzel a szignalizációt (12. ábra) [69]. A fentiek mellett a Ras-nak számos más effektor partnere is ismert. Egyik ilyen a PI3-kináz, mely az Akt-on keresztül fejti ki sejt-túlélést elősegítő hatását [70], de ugyancsak a Ras targetje a PLC ϵ [71], a RASSF1A [72, 73] és a Tiam1, mely utóbbi kapcsolatot képez a Ras és Rho család kis G-fehérjéi között [44, 74]. A Ras család néhány tagjáról bebizonyították, hogy habár szerkezetükben nagyon hasonlóak az onkogén Ras-hoz, mégis inkább tumorszupresszor hatásúak (ilyen például a D-Ras, Rerg, Noey2) [60, 75].

3.4.2.2 A Rab család

A Ras szupercsalád legnépesebb alcsofájja a Rab (Ras-like proteins in brain) család, melybe több mint 60 ismert fehérje sorolható [76]. Szerepüket a sejten belüli vezikulamozgások: endo-, exo-, illetve transzcitózis, az endoplazmás retikulum és a Golgi közötti transzportfolyamatok szabályozásában írták le [77-79]. A Rab fehérjék jól meghatározott intracelluláris kompartmentekhez képesek lokalizálódni, ahol nagyméretű molekulakomplexek részeként látják el szabályozó funkciójukat. Lokalizációjukban elengedhetetlen szerepe van a geranil-geranil transzferáz II által végzett prenilációjuknak. A család egyes tagjai „kompartment-specifikusak”, például a Rab1 és a Rab2 az endoplazmás retikulum és a Golgi membránján helyezkednek el, és a fehérjeszintézis és –szekréció folyamatát szabályozzák (13. ábra). A Rab4 a korai endoszóma, illetve a reciklizáló endoszóma és a plazmamembrán közötti transzportot szabályozza, a Rab5 pedig a plazmamembránban és a korai endoszómák membránjában található és főleg a klatrin-mediált endocitózist szabályozza (13. ábra) [80-84].



13. ábra: A különböző Rab kis G-fehérjék sejten belüli lokalizációja. A nyilak a kompartmentek közötti transzportot jelölik. CV: klatrin-burkos vezikula; EE: korai endoszóma; LE: késői endoszóma; Lyso: lizoszóma; RE: reciklizáló endoszóma; PM: plazmamembrán; TGN: transz Golgi hálózat; RER: durva endoplazmás retikulum [84].

3.4.2.3 Az Arf család

A Rab családdhoz hasonlóan az Arf (ADP-ribosylation factor) család tagjai is a vezikuláris transzportfolyamatok szabályozásában érintettek [85]. Jellemzőjük, hogy a GDP-, illetve GTP-kötött állapot közötti konformációváltozás nem csak az switch I és switch II régiót érinti, hanem a fehérje N-terminális részét is, amely így lehetővé teszi, hogy az N-terminálisan található mirisztin csoport membránokhoz tudjon kapcsolódni [86]. Míg a Rab fehérjék a membránforgalom egy-egy specifikus lépését szabályozzák, addig az Arf proteinek szélesebb körű regulációban érintettek. Az Arf1 például a COP (coat protein) fehérje burkú vezikulumok (a Golgi felől az endoplazmás retikulum felé irányuló transzport), illetve egyes klatrin/adaptin burkos vezikulumok (endoszómális útvonal, transz-Golgi-hálózatról lefűződő vezikulumok) kialakulásának folyamatában vesz részt. GTP-kötött formában képes a vezikulumokat borító coatomer fehérjékhez kapcsolódni, majd a GTP hidrolízise biztosítja a komplexből történő kiválását és a vezikulum akceptor membránnal történő fúzióját [60]. Az Arf6 az endocitózis aktin polimerizáción keresztüli szabályozását végzi. A filamentáris aktin átrendeződésének szabályozásával részt vesz az Fc γ R-mediált fagocitózis során kialakuló fagocitotikus serleg kialakításában (8. ábra) [87].

3.4.2.4 A Ran család

A Ran (**R**as-like nuclear protein) a sejtekben legnagyobb mennyiségben előforduló kis G-fehérje és a róla elnevezett család eddig egyetlen ismert tagja [60]. GTP-kötött állapotban a sejtmagban található, melynek oka, hogy szabályozó fehérjéi közül az RCC1 RanGEF (a GTP-kötött állapotot segíti elő) a kromatinhoz kötve, míg a RanGAP (a GTP hidrolízist gyorsítja) a citoplazmában helyezkedik el [44]. A Ran feladata a sejtmag és a citoplazma közötti fehérjetranszport szabályozása [88], ugyanakkor részt vesz a sejtosztódási folyamatok, a mitotikus orsó kialakulásának, valamint az osztódás utáni sejtmaghártya újraképződésének regulációjában is [89, 90]. Egy 2003-ban megjelent közlemény szerint a Ran a DNS replikáció szabályozásában is érintett [91].

3.4.2.5 A Rho család

A Rho (**R**as homologous protein) család legelső tagját, a RhoA-t 1985-ben írták le [92]. Mára a család mintegy 20 taggal bővült, melyeket nyolc alcsaládra osztanak [93]. Legismertebb közülük a RhoA mellett a Rac1 és a Cdc42 (GTPáz aktiváló fehérjéiket épp ezért szokás Rac/RhoGAP-oknak is nevezni – lásd 3.4.3.3. fejezet). Érdekeség, hogy míg az említett tagok ubikviter expressziót mutatnak, addig a Rac2, melyet a Rac1-el együtt, 1989-ben írtak le [94], csak hematopoetikus sejtekben fejeződik ki [95]. A családdal kapcsolatos legelső funkcionális vizsgálatokat olyan fibroblasztokon végezték, melyekbe konstitutívan aktív Rho-t, Rac-ot, vagy Cdc42-t injektáltak. Megfigyelték, hogy míg a konstitutívan aktív Rho stresszrostok megjelenését indukálja, a konstitutívan aktív Rac lamellipodiumok (szokás még membránfodrozódásnak – ruffling-nak is nevezni) képződéséhez vezet, addig a konstitutívan aktív Cdc42 injektálását követően vékony, tűske-szerű filopodiumok jelennek meg a sejtek felszínén. Ugyanezen fenotípusokat elő lehet idézni, ha a sejteket növekedési faktorokkal, például EGF-fel (lamellipodium képződés), lizofoszfátsavval (stresszrost) vagy TNF α -val (filopodium képződés) kezelik [96-100]. A fentiek mellett (és által) a Rho család kis G-fehérjéi számos sejtműködést szabályoznak, úgy, mint a sejt polaritás, mozgás, adhézió, endo- és exocitózis, de érintettek az embrionális fejlődés,

a sebgyógyulás, és számos immunológiai folyamat regulációjában is [44, 101-104]. A három fő családtag Rho, Rac és Cdc42 változatos funkcióját jól szemlélteti egy 2000-ben megjelent összefoglaló közlemény, melyben mintegy 30 fehérjét neveznek meg az említett kis G-fehérjék lehetséges effektor partnereiként (1. táblázat) [105].

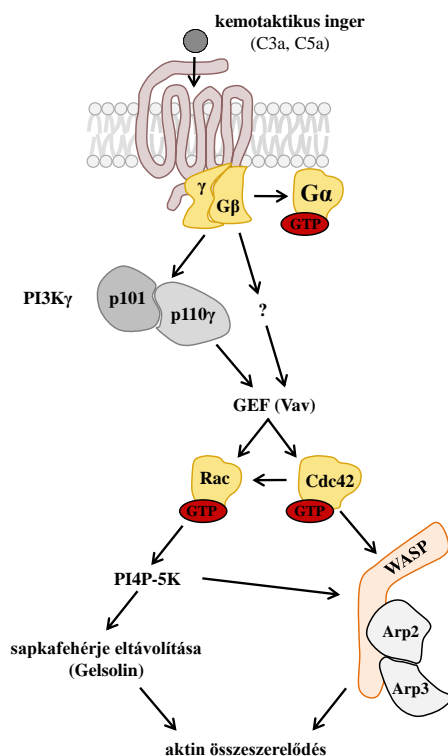
1. táblázat: A Rho, Rac és a Cdc42 lehetséges effektor fehérjei. *: az effektor fehérjék kis G-fehérjék általi aktivációja GTP-függő, de a kapcsolódás a kis G-fehérjével GTP-független. +: funkcionális kapcsolat van a kis G-fehérjével, de direkt interakció nincs. PKN: protein kináz N; PLC: foszfolipáz C; PLD: foszfolipáz D; IP₃: inozitol triszfoszfát. ([105] alapján, a szerző által módosítva).

effektor fehérje	típusa	a szabályozott funkció/jelátviteli út	kis G-fehérje specificitása	hivatkozások
ROK α , ROK β	Ser/Thr kináz	aktin/miozin szab.	Rho	[106-108]
PKN/ PRK1, PRK2	Ser/Thr kináz	ismeretlen	Rho	[109, 110]
citron kináz	Ser/Thr kináz	sejtosztódás	Rho	[111, 112]
p70S6 kináz	Ser/Thr kináz	transzláció szab.	Rac, Cdc42?	[113]
MLK2, 3	Ser/Thr kináz	JNK útvonal	Rac, Cdc42	[114-116]
MEKK1, 4	Ser/Thr kináz	JNK útvonal	Rac, Cdc42	[117]
PAK1, 2, 3	Ser/Thr kináz	JNK útv./aktin átrend.	Rac, Cdc42	[118]
PAK4	Ser/Thr kináz	aktin átrendeződés	Cdc42	[119]
MRCK α , MRCK β	Ser/Thr kináz	aktin átrendeződés	Cdc42	[120]
Ack1, 2	Tyr kináz	ismeretlen	Cdc42	[121, 122]
MBS	foszfatáz alegység	MLC-P inaktiválás	Rho	[107]
PI-4-P5K	lipid kináz	PIP ₂ szint szab./aktin átrendeződés	Rho ⁺ , Rac*	[123-125]
PI3K	lipid kináz	PIP ₃ szint szab.	Rac, Cdc42	[126-128]
DAG kináz	lipid kináz	foszfatidsav szint szab.	Rho ⁺ , Rac	[125, 129]
PLD	lipáz	foszfatidsav szint szab.	Rho, Rac, Cdc42	[130-133]
PLC β 2	lipáz	DAG/IP ₃ szint szab.	Rac, Cdc42	[134]
Rhopilin	állványfehérje	ismeretlen	Rho	[135]
Rhotekin	állványfehérje	ismeretlen	Rho	[136]
Kinectin	állványfehérje	kinezin kötés	Rho	[137]
Dia1, Dia2	állványfehérje	aktin átrendeződés	Rho	[106, 138]
WASP, N-WASP	állványfehérje	aktin átrendeződés	Cdc42	[139-141]
WAVE/Scar	állványfehérje	aktin átrendeződés	Rac ⁺	[139, 142, 143]
POSH	állványfehérje	ismeretlen	Rac	[114]
POR-1	állványfehérje	aktin átrendeződés	Rac	[144]
p140Sra-1	állványfehérje	aktin átrendeződés	Rac	[145]
p67 ^{phox}	állványfehérje	NADPH oxidáz	Rac	[146-148]
MSE55, BORGs	állványfehérje	ismeretlen	Cdc42	[149, 150]
IQGAP1,2	állványfehérje	aktin átrendeződés /sejt-sejt kapcsolatok	Rac, Cdc42	[140, 151-153]
CIP-4	állványfehérje	ismeretlen	Cdc42	[154]

3.4.2.5.1 A Rac szerepe a természetes immunitás szabályozásában

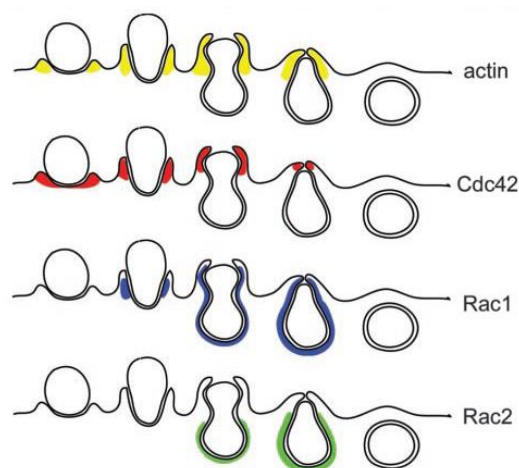
A természetes immunválasz minden főbb lépésében (3.2. fejezet) szükséges a megfelelő térben/időbeni finomszabályozás, melyben más kis G-fehérjék mellett a Rho család tagjai is érintettek (lásd még 1. táblázat). Mivel jelen dolgozat egy, a Rac-ot szabályozó GTPáz aktiváló fehérjéről szól, így ebben a fejezetben csupán a Rac természetes immunitásban betöltött szerepét tekintem át.

Servant és munkatársai egy 2000-ben megjelent közleményben leírták, hogy a kemotaxis során központi jelentősége van a sejtek membránjában kialakult PIP_3 gradiensnek. A PIP_3 felhalmozódik a sejtek kemoattraktáns felé néző úgynevezett vezető végén, [155], így mintegy iránytűként működve határozza meg a mozgás irányát. Keletkezését a $PI3-K\gamma$ katalizálja. Ezek mellett a neutrofilek „iránytűjének” megfelelő működéséhez a Rac1-re is szükség van [155-157]. A mozgás során a sejt vezető vége előre nyúlik, miközben ezzel ellentétes pólusa megrövidül – ez pedig az aktin citoskeleton folyamatos átépülését igénylő folyamat, melynek szabályozása szintén a Rho családhoz köthető [158-160]. A kemotaxis vázlatos szignalizációját a 14. ábra szemlélteti.



14. ábra: A neutrofil kemotaxis vázlatos jelátviteli útvonala ([158] alapján).

A Rac1, Rac2 és a Cdc42 a kemotaxis jelátvitelével mellett érintettek az Fc γ receptor mediált fagocitózis jelátvitelében is (8. ábra) [161-163]. Hoppe és munkatársa kimutatták, hogy a három kis G-fehérje eltérő aktivációs mintázatot mutat a formálódó, majd záródó, végül lefűződő fagoszóma körül. Az aktív (GTP-kötött) Cdc42 a formálódó, a bekebelezendő partikulumot körülölelő állabak csúcsainál figyelhető meg, a lefűződő fagoszóma körül nincs jelen. Aktív Rac1-et a formálódó, majd záródó fagoszóma körül találtak, míg a GTP-kötött Rac2-t a kialakuló fagoszóma sejtmembrántól disztálisan elhelyezkedő részén figyelték meg. A filamentáris aktin a Cdc42-vel mutat hasonló elhelyezkedést. A záródás után lefűződött fagoszóma körül nem tudtak aktív Cdc42-t, vagy Rac-ot kimutatni (15. ábra) [164]. A pontos jelátviteli útvonalak, illetve a fagoszóma körül a Cdc42, Rac1 és Rac2 aktiválódásához, inaktiválódásához vezető folyamatok még csak kevésbé ismertek. Annyi azonban ismert, hogy az Fc γ receptorok ellenanyaggal opsonizált partikulumok általi keresztükötése Src és Syk tirozin-kinázok aktiválódásához vezet [165]. Ezt követően a Syk foszforilálja a PI3-K-t, amely PIP₃ felhalmozódását eredményezi a fagocitózis során érintett sejtmembránszakaszon [166, 167], másrészt a Syk a Vav kicserélő faktort is foszforilálja, amely így aktiválja a Rac-ot [26]. A GTP-t kötött Cdc42 és Rac ezután további effektor fehérjéket aktivál. A Cdc42 például a kemotaxisnál már említett WASP-pal működik együtt [168], a Rac pedig többek között a PAK1-et aktiválja, amely szintén a formálódó fagoszóma körül található és a makropinocitózis regulátora (lásd még a 8. ábrát) [169, 170].



15. ábra: Az aktin (sárga), valamint az aktív (GTP-kötött) Cdc42 (piros), Rac1 (kék) és Rac2 (zöld) elhelyezkedése a formálódó fagoszóma körül [164].

A Rac az eddig leírtak mellett szerves részét képezi a fagocita oxidáz enzimkomplexnek (3.2.3. fejezet), melyben a p67^{phox} alegységgel kapcsolódik. Sejtmentes kísérleti rendszerekben mind a Rac1, mind a Rac2 képes szabályozni a fagocita oxidázt [146, 171]. Ugyanakkor sok kutató feltételezi, hogy humán neutrofilekben a Rac2 a domináns fagocita oxidáz-szabályozó, mivel ezen sejtekben a teljes Rac-készletnek több, mint 96%-át a Rac2 teszi ki [172]. Mai ismereteink szerint a Rac a switch I régióján keresztül kapcsolódik a p67^{phox}-hoz, melyet több munkacsoport kísérlete is alátámaszt: a switch I régió belüli pontmutációk csökkentették a Rac oxidázra gyakorolt hatását [173, 174]. Azt is sikerült feltárni, hogy a Rac a p67^{phox} úgynevezett tetratricopeptide repeat (TPR, lásd még [175]) motívumához kapcsolódik [176, 177]. A Rac a p67^{phox} mellett feltehetően kapcsolódik a flavocitokróm b₅₅₈-hoz is [172, 178]. A kapcsolatban valószínűleg a Rac 120-137. aminosavakig terjedő helikális, úgynevezett inzert régiója érintet, mely csak a Rho családban előforduló szakasz, és jellemzően fehérje-fehérje interakciókban vesz részt [147].

3.4.3 A Rho család szabályozó fehérjéi

3.4.3.1 A guanin-nukleotid kicserélő faktorok (RhoGEF-ek)

Ahogy a 3.4. fejezetben bemutattam, a kis G-fehérjék a GTP lassú hidrolízisét követően inaktív, GDP-kötött állapotba kerülnek, melyből a guanin-nukleotid kicserélő faktorok (guanine-nucleotide exchange factor, GEF) hatására mozdulnak ki [179]. A GEF-ek kis G-fehérje család-specifikusak. Jelen dolgozatban csak a RhoGEF-eket mutatom be.

A RhoGEF-eknek több családját különböztetik meg. Legnépesebb közülük a DH-PH (**D**bl homológ – **P**leckstrin homológ) doménpárost tartalmazó kicserélő faktoroké. A család névadóját, a Dbl-t egy diffúz B-sejtes limfómában azonosították, innen ered az elnevezés. Működésük alapja (ahogy a többi kis G-fehérjét szabályozó GEF esetében is), hogy képesek a kis G-fehérjék switch régióihoz és a P-hurokhoz kötődni, konformáció-változást előidézve ezáltal a nukleotid-kötő zsebben [180-184]. A GEF kötődését követően a GDP terminális foszfát csoportja kerül ki elsőként a kötőzsebből, majd ezt követi a guanin-nukleotid bázisa. A GTP bekötődése ezt

követően fordított lépésben történik: elsőként a guanin-nukleotid bázis foglalja el helyét a kötőzsebben, majd ezt követi a foszfát csoportok bekötődése és stabilizálódása [185]. A GEF-ek nem befolyásolják a kis G-fehérjék GDP/GTP iránti affinitását, az aktiválódás (GTP-kötés) annak köszönhető, hogy a citoplazmában mintegy tízszer több GTP található, mint GDP [185].

3.4.3.2 A guanin-nukleotid disszociáció inhibitorok (RhoGDI-k)

A RhoGDI-k szerkezetét tekintve két fontos domén emelendő ki: a C-terminális domén, amely a geranyl-geranyl oldalláncot kötő zsebet tartalmazza és segítségével képes a RhoGDI „kihúzni” a membránból a kis G-fehérjét; másik az N-terminálisan található szabályozó „kar”, amely a GTPáz switch I és switch II régióihoz kötődve gátolja a nukleotid hidrolízist és kicserélődést [47, 186, 187].

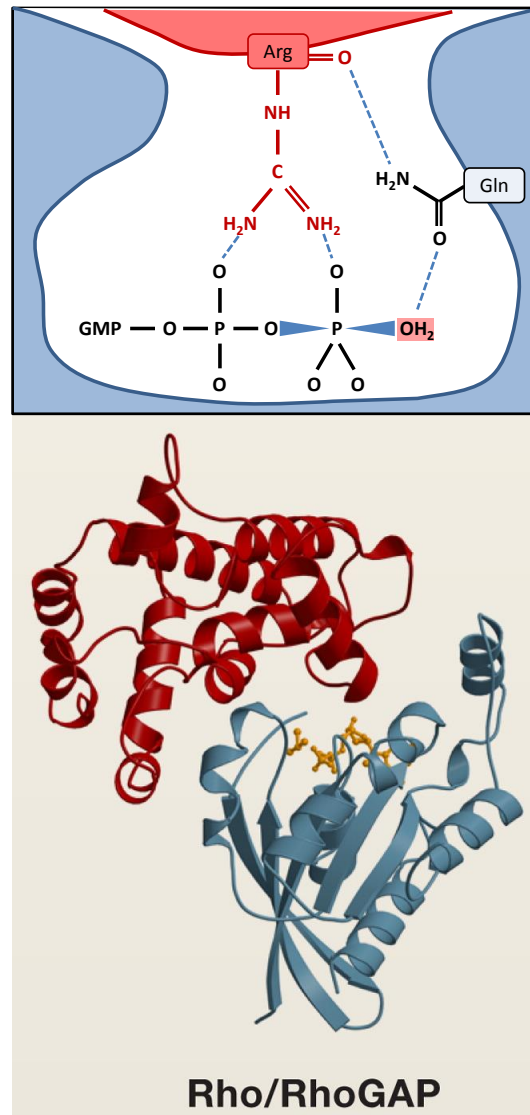
A RhoGDI-knek jelenleg mindössze három képviselőjét ismerjük [188]. Közülük a RhoGDI1 (más néven RhoGDI α) a szervezetben mindenütt kifejeződik, és számos Rho GTPázal működik együtt, beleértve a család fő tagjait, a RhoA-t, Cdc42-t, Rac1-et és Rac2-t is [189, 190]. A RhoGDI2 (más néven RhoGDI β , Ly-GDI, vagy D4-GDI) főként hematopoetikus sejtekben fejeződik ki és kisebb affinitással kötődik a Rho GTPázokhoz, mint a RhoGDI1 [191-193]. A család harmadik tagja, a RhoGDI3 (RhoGDI γ) szűkebb körben expresszálódik, mint a RhoGDI1: kifejeződik például az agyban és a hasnyálmirigyben. A RhoGDI3 a RhoB-vel és a RhoG-vel működik együtt, utóbbit képes a Golgi-hoz irányítani [194-196].

3.4.3.3 A GTPáz aktiváló fehérjék (Rac/RhoGAP-ok)

A humán genomban mintegy 150 olyan gént találunk, amelyek lehetséges GTPáz aktiváló fehérjéket kódolnak. Közülük körülbelül 70 olyan gént ismerünk, melyek a Rho családot képesek szabályozni, azaz RhoGAP-okként működhetnek (a valódi GTPáz aktiváló hatásuk sok esetben még nem bizonyított) [44, 197, 198]. Összevetve a RhoGAP-ok számát a Rho család kis G-fehérjével láthatjuk, hogy körülbelül háromszor több RhoGAP van, mint a családba tartozó kis G-fehérje [199].

Ez számos, a mai napig aktuális kérdést vet fel, mint például hogy mennyire átfedő/specifikus a RhoGAP-ok funkciója, azaz képesek-e egymást helyettesíteni egy-egy jelátviteli útvonalban. A kérdés jelenleg is megválaszolásra vár. A RhoGAP-ok változatos doménszerkezete, eddig feltárt működésük, jelátviteli útvonalakban elfoglalt helyük azt valószínűsíti (és ezen dolgozatban bemutatott eredmények is erre utalnak), hogy szabályozó feladataikat specifikus molekuláris környezetben – jól meghatározott molekulakomplexek részeként – végzik. Az azonban bizonyos, hogy mindegyik RhoGAP rendelkezik egy körülbelül 200 aminosav hosszúságú katalitikus (úgynevezett RhoGAP) doménnel, amely GTPáz aktiváló hatásukért felelős [200]. Ez az α -hélixekből felépülő domén tartalmaz egy evolúciósan konzervált arginint, melynek fontosságát jól mutatja, hogy mutációja akár négy nagyságrenddel is csökkentheti az adott fehérje GTPáz aktiváló hatását [201]. A GAP domén képes interakcióba lépni a kis G-fehérje switch I és switch II régióival, valamint a P-hurokkal is. A GTP hidrolízis folyamatának átmeneti fázisában a GAP molekula mintegy 20° -kal elfordul a kis G-fehérjéhez képest, ezáltal a két fehérje közelebb kerül egymáshoz. Ez az elfordulás teszi lehetővé, hogy a GAP domén konzervált argininje (működéséből adódóan szokás arginin-ujjnak is nevezni) kellően közel kerüljön a guanin-nukleotid γ -foszfátjához és azt stabilizálja. Ezen kívül az elfordulás azt is biztosítja, hogy az arginin kapcsolatba kerüljön a kis G-fehérje szintén evolúciósan konzervált egyik glutaminjával (amely például a Rho esetén a 63. pozícióban található), amely csak így képes hidrogén-hidat képezni a hidrolízisben részt vevő vízmolekulával. Így tehát a kis G-fehérje és a GAP közösen alakítják ki a katalitikus helyet (16. ábra) [201-203].

A GAP-ok szerepét és jelentőségét jól demonstrálja, hogy a sejtben lévő Rho kis G-fehérjék mintegy 95%-a inaktív (GDP-kötött) állapotban van, és ez az arány a sejtet ért generalizált stimulus hatására sem csökken 90% alá [202].

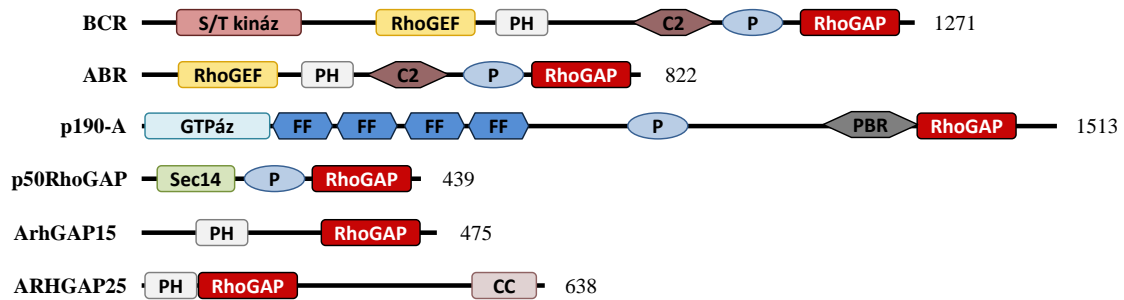


16. ábra: A Rho/RhoGAP kapcsolat sematikus ábrája. A felső panel a GTP hidrolízis átmeneti állapotát mutatja be, kiemelve a folyamatban kritikus szerepet betöltő arginint és glutamint. Az alsó panel a tényleges kristályszerkezeti modellt mutatja be. Piros szín jelöli a RhoGAP-ot, kék a Rho-t, sárga a guanin-nukleotidot [185].

3.4.4 A Rac/RhoGAP-ok szerepe a fagocita funkciók regulációjában

A következő fejezetben néhány olyan Rac/RhoGAP-ot mutatok be, melyekről igazolták, hogy részt vesznek a természetes immunválasz szabályozásában. Geiszt és munkatársai három GAP-ot azonosítottak humán neutrofilekben: a Bcr-t, a p190RhoGAP-ot (más néven p190-A, ARHGAP35, vagy GRLF1) és a p50RhoGAP-ot (Cdc42GAP, vagy ARHGAP1) [204]. Később más munkacsoportok a Bcr mellett, a

vele 68%-os aminosav-azonosságot mutató Abr szerepét is leírták fagocitákban [205-207]. Rajtuk kívül ezidáig még két GAP merült föl mint a fagocita funkciók szabályozója: a Costa és munkatársai által leírt ArhGAP15 [208, 209], valamint a jelen dolgozat témáját képező ARHGAP25. A fejezetben ismertetésre kerülő GAP-ok sematikus doménszerkezetét a 17. ábra mutatja.



17. ábra: A fejezetben bemutatott Rac/RhoGAP-ok sematikus doménszerkezete. Rövidítések: PH, pleckstrin homológ domén; CC, coiled coil; C2, kalcium-függő lipid kötő domén; P, prolin-gazdag domén; S/T kináz, szerin/treonin kináz domén; Sec14, Sec14-szerű domén; FF, két konzervált fenilalanint tartalmazó domén; PBR, polibázikus régió; ([199] alapján).

3.4.4.1 Az Abr/Bcr szerepe fagocitákban

A *bcr* (breakpoint of cluster region) gént krónikus mieloid leukémia kapcsán azonosították: egy transzlokációt követően (Philadelphia kromoszóma) a 22-es kromoszómán kódolt *bcr* a 9-es kromoszómán kódolt *abl* tirozin-kináz génnel egy kiméra-proteint hoz létre [210, 211]. Mind a Bcr-ről, mind az Abr-ről (active Bcr related) kimutatták, hogy *in vitro* körülmények között képes a Rac, a Rho és a Cdc42 GTPáz aktivitását fokozni [59, 212, 213], ugyanakkor sejtes kísérleti rendszerekben túlexpresszáva csak a Rac-ot képesek szabályozni [206]. Kettős génhíányos (*abr* × *bcr*) egerekben megnyúlt, megváltozott morfológiájú makrofágokat találtak, valamint ezen sejtek fokozott migrációját és fokozott fagocitáló képességét figyelték meg [206]. *E. coli* lipopoliszacharidra az *abr* illetve *bcr* génhíányos egerek fokozottan reagáltak, mely jelentős testtömeg-vesztéssel járt. A kettős knock-out egerek nem is nyerték vissza normális tömegüket, két nappal a kezelés után elpusztultak [207]. A kettős génhíányos egerek fagocita sejtjeit vizsgálva fokozott szuperoxid termelést, valamint neutrofilek esetében a primer granulomok fokozott szekrécióját írták le [205, 207].

3.4.4.2 A p190RhoGAP

Az elnevezés valójában két külön gén által kódolt, 50%-os homológiát mutató fehérjét, a p190A-t és B-t takarja [214]. Jelen dolgozatban csak a p190A bemutatására szorítkozom. A p190A egy ubikviter fehérje, szerkezetére N-terminálisan egy még ismeretlen funkciójú GTP-kötő domén (**GTP-binding domain – GBD**), egy középső, difenilalanin motívumokat (FF motívum) és SH3 domént kötő szakaszokat tartalmazó régió, valamint C-terminálisan egy polibázikus régió és egy GAP domén jellemző (17. ábra) [214, 215]. A p190 a Rac-kal és a Rho-val egyaránt képes együttműködni [214, 216]. Megfigyelték azonban, hogy a fehérje membrán-fosfolipidekhez történő kötődése illetve foszforilációja befolyásolja a p190 kis G-fehérje specificitását [217, 218]. Több munkacsoport is leírta, hogy fibroblasztokban részt vesz az integrin-jelátvitelben, melynek során Src-típusú kinázok tirozinon foszforilálják [219-222], valamint szerepet játszik az axon-növekedésben [223, 224]. Heyworth és munkatársai azt tapasztalták, hogy *in vitro* körülmények között képes szabályozni a fagocita NADPH oxidázt [225]. Más munkacsoportok megfigyelték, hogy stimulált humán neutrofilekben a p190 a citoszolból a plazmamembránhoz transzlokálódik, valamint hogy részt vesz a RhoA β 2-integrin jelátviteli útvonalon keresztüli szabályozásában [226, 227]. Érdekes megfigyelés, hogy humán neutrofilekkel, illetve *in vitro* körülményekkel szemben a p190 génhiányos csontvelővel transzplantált egerek neutrofiljei nem mutattak szignifikáns eltérést a kontroll egerek sejtjeihez képest (a p190A hiánya embrionális letalitáshoz vezet, ezért volt szükség a csontvelő transzplantációra). Továbbá nem volt megfigyelhető eltérés a kiváltott reumatoid arthritisz lefolyásában sem [228]. A p190-nek humán és egér neutrofilekben fellelt eltérő szerepét tekintve felmerül, hogy szabályozó szerepe esetleg sejt-, vagy fajspecifikus (ez a kérdés pedig a többi neutrofilekben kifejeződő GAP esetében is felvetődhet).

3.4.4.3 Az ARHGAP15

Az ARHGAP15-öt Seoh és munkatársai írták le 2003-ban megjelent közleményükben [229]. A fehérjén belül N-terminálisan található egy PH domén és C-terminálisan egy GAP domén (17. ábra), amely specifikus a Rac1-re [229].

Filogenetikailag és szerkezetét tekintve rokonságot mutat az ARHGAP9-cel és az ARHGAP12-vel: jellemzőjük, hogy szekvenciájukban a GAP doménon kívül található egy közös motívum, mely szintén részt vesz a Rac1-el történő interakcióban [229, 230]. Később Costa és munkatársai találtak egy, a kemotaxis jelátvitelében érintett és PI3-K γ által szabályozott RacGAP-ot, amelyet ARHGAP15-ként azonosítottak [208]. Ugyanezen munkacsoport ArhGAP15 génhányos egereket vizsgálva azt tapasztalta, hogy a knock-out egerek neutrofiljei fokozott migrációs készséget, fokozott szuperoxid termelést, fokozott fagocitózist és növekedett baktériumölési képességet mutattak. Ezzel összhangban a génhányos egerek ellenállóbbak voltak a polimikrobiális abdominális szepszissel szemben, a kontroll egerekhez képest [209].

3.4.4.4 A p50RhoGAP

A p50RhoGAP (ARHGAP1, Cdc42GAP) 439 aminosav hosszúságú ubikviter fehérje, amely egy N-terminális Sec14 doménből, egy közbülső prolin-gazdag régióból, valamint egy C-terminálisan elhelyezkedő GAP doménből áll (17. ábra). Az izolált GAP domén *in vitro* körülmények között képes a Rac, a Rho és a Cdc42 GTP-hidrolízisét egyaránt fokozni [231, 232]. Laborunk korábbi munkatársának, Patryk Moskwa-nak sikerült feltárni a p50 intramolekuláris szabályozó mechanizmusát. Ennek alapján az N-terminális Sec14 domén ráhajlik a GAP doménre, gátolva ezáltal a GAP-aktivitást. Ezt a zárt konformációt a Rac geranilgeranil oldallánca képes kinyitni, megszüntetve így az autoinhibíciót [50]. P50RhoGAP génhányos egereket vizsgálva jelentős fenotípusbeli változást figyeltek meg: a knock-out egerek nagyfokú perinatális letalitást mutattak, a megszületett egerek testmérete, szerveinek mérete lényegesen kisebb volt, mint a vad típusú egereké. Úgy találták, hogy a p50 hatását ezen esetekben elsősorban a Cdc42-n keresztül fejtette ki. A fentiek mellett megfigyeltek vérképzési rendellenességeket is, melynek hátterében a knock-out egerekben tapasztalt, megnövekedett JNK (c-Jun N-terminális kináz) aktivitásból eredő fokozott apoptózis állt [233, 234]. A génhányos egerek neutrofiljeit vizsgálva fokozott migrációs készséget tapasztaltak, azonban a sejtek nem voltak képesek irányított (gradiens irányába történő) mozgásra [235]. Laborunk másik munkatársa, Sirokmány Gábor megfigyelései szerint a p50 az endoszómális membránokon komplexet képez a Rab11

kis G-fehérjével, ezáltal kapcsolatot teremthet a Rab- és RhoGTPázok között. A Rab11-re nem fejt ki GTPáz aktiváló hatást, ugyanakkor a kapcsolat során elengedhetetlen a Sec14 domén megléte [236].

3.4.4.5 ARHGAP25

Katoh és munkatársa egy *in silico* munka keretében az ARHGAP géncsalád egy új tagjaként azonosította az ARHGAP25-öt. A gén a 2. (humán) kromoszóma p13-as pozíciójában található és egy 638 aminosav hosszúságú fehérjét kódol. A 151-340 aminosavak közötti szakaszát lehetséges Rac/RhoGAP doménként azonosították [237]. A mintegy 30 tagot számláló géncsalád másik két tagja, az ARHGAP22 és ARHGAP24 nagyfokú homológiát mutatnak az ARHGAP25-tel. Az ARHGAP24 – mely FilGAP néven is fellelhető az irodalomban – a Cdc42-t és Rac-ot képes szabályozni és a fibroblasztok citoskeletális változásait (sejtmegnyúlás és összehúzódás) regulálja [238]. Az ARHGAP25 a GAP doménon kívül tartalmaz még N-terminálisan egy PH domént, valamint C-terminálisan egy szuperhelikális, úgynevezett coiled coil szakaszt [237]. A fehérje doménszerkezetét a 15. ábra mutatja.

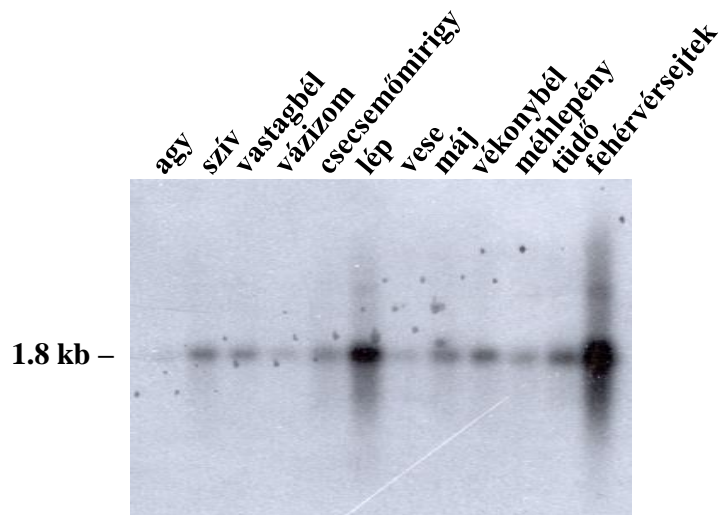
Munkánk kezdetén intézetünk munkatársa, Dr. Geiszt Miklós hívta fel figyelmünket arra, hogy az Expressed Sequence Tag (EST) adatbázis szerint az ARHGAP25 kiemelkedő expressziót mutat a nyirokszövetekben és a vérben (18. ábra A). Az EST adatbázis eredményeit Dr. Geiszt Miklós és Dr. Sirokmány Gábor kollégáim az általuk készített Northern blot kísérlettel erősítették meg, melynek során a teljes ARHGAP25 szekvenciát használták próbaként. Ahogy a 18. ábra B része is mutatja, egyetlen, 1,8 kb-nak megfelelő magasságban detektáltak jelet, amely arra utal, hogy az ARHGAP25-nek valószínűleg nincs splice variánsa. A legnagyobb expressziós szint a lépben és a perifériás fehérvérsejtekben volt megfigyelhető, a többi szövetben lényegesen alacsonyabb expressziót találtak (18. ábra B). Ezt követően Sirokmány Gábor kollégám rekombináns úton előállította az ARHGAP25 izolált doménjeit, illetve a PH domén ellen poliklonális ellenanyagot készített. Ekkor kapcsolódtam be a kutatásba: a teljes hosszúságú fehérjét, valamint a coiled coil szakasz elleni poliklonális ellenanyagot közösen készítettük. Az ellenanyag tisztítását, valamint a Célkitűzések

fejezetben megfogalmazott és az Eredmények fejezetben bemutatott további kísérleteket a későbbiekben egyedül, illetve TDK-s hallgatóim segítségével végeztem.

A

adipose tissue	0	0 / 13793		mouth	29	2 / 68513
adrenal gland	0	0 / 33600		muscle	43	5 / 113683
ascites	0	0 / 40132		nerve	0	0 / 16586
bladder	0	0 / 29779		ovary	47	5 / 104967
blood	375	48 / 127672	●	pancreas	4	1 / 217550
bone	0	0 / 71988		parathyroid	0	0 / 20534
bone marrow	0	0 / 48057		pharynx	179	8 / 44634
brain	11	11 / 920560	●	pituitary gland	0	0 / 17233
cervix	0	0 / 47464		placenta	20	6 / 290302
cochlea	0	0 / 16542		prostate	15	3 / 194375
colon	115	23 / 198415	●	salivary gland	0	0 / 20234
connective tissue	13	2 / 146122	●	skin	5	1 / 186189
cranial nerve	0	0 / 18930		small intestine	22	1 / 44205
embryonic tissue	5	1 / 199259	●	spleen	324	17 / 52422
esophagus	0	0 / 19065		stomach	9	1 / 100957
eye	4	1 / 205975	●	testis	8	3 / 347008
heart	0	0 / 88178		thymus	167	13 / 77520
kidney	14	3 / 210747	●	thyroid	0	0 / 54024
larynx	34	1 / 29363	●	tonsil	0	0 / 17066
liver	14	3 / 207815	●	trachea	41	2 / 48483
lung	17	6 / 344147	●	umbilical cord	0	0 / 13435
lymph	90	4 / 44393	●	uterus	12	3 / 235993
lymph node	127	12 / 94405	●	vascular	0	0 / 50350
mammary gland	41	7 / 167345	●	whole body	0	0 / 44949
				whole brain	0	0 / 136243

B



18. ábra: Az ARHGAP25 mRNS szöveti megoszlása az Expressed Sequence Tag (EST) adatbázis (A), valamint munkacsoportunk Northern blot kísérlete alapján (B). EST adatok forrása: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.531807> (2012. 11. 09-ei adatok). A Northern blot kísérletet Dr. Geiszt Miklós és Dr. Sirokmány Gábor kollégáim végezték.

4 Célkitűzések

A Rho családba tartozó kis G-fehérjéket mintegy 70 lehetséges GAP szabályozza. Arról azonban, hogy ezek a GAP-ok milyen kis G-fehérje specificitást, milyen szöveti megoszlást mutatnak, valamint milyen szerepet töltenek be a különféle jelátviteli utakban, jelenleg nagyon keveset tudunk. A GAP-ok szöveti expressziós mintázatának feltárása fontos támpont lehet a későbbi kutatásokban, segítségével célirányosan lehet vizsgálni a szövet-, vagy sejtspecifikus GAP-okat, ahogyan azt jelen munkánk során mi tettük: online adatbázisok, valamint munkatársaim korábbi Northern blot kísérlete arra utalt, hogy az eddig ismeretlen ARHGAP25 elsősorban fehérvérsejtekben van jelen. A génről – munkánkat megelőzően – mindössze egy *in silico* alapú publikáció volt elérhető, azonban teljesen ismeretlen volt, hogy van-e fiziológias funkciója az ARHGAP25-nek fehérvérsejtekben, főként a laborunk által régebb óta vizsgált humán neutrofil granulocitákban.

Munkám során a következő célkitűzéseket tettem:

1. Microarray adatbázisokban vizsgálni az ARHGAP25, illetve más Rac/RhoGAP-ok szöveti expressziós mintázatát.
2. Bakteriális expressziós rendszerben kifejezni a teljes hosszúságú ARHGAP25 fehérjét, valamint különféle fragmenseit.
3. Meghatározni az ARHGAP25 kis G-fehérje specificitását.
4. Megvizsgálni az ARHGAP25 fagocitákban betöltött lehetséges szerepét – esetleges részvételét az aktin citoszkeleton átrendeződés, szuperoxid-termelés, valamint a fagocitózis szabályozásában.
5. Ez utóbbit tekintve céloim volt továbbá egy olyan vizsgálati módszer beállítása, mellyel nagy hatékonysággal, nagy elemszámmal lehet vizsgálni a fagocitózisban bekövetkező változásokat.

5 Módszerek

5.1 Microarray adatbázisok vizsgálata

Az mRNS microarray adatok kiértékelése során a PubMed GEO DataSets adatbázisból (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) elérhető, Affymetrix Human Genome U133A array-el készült kísérleteket használtuk fel. Az elemzett kísérletek a következők voltak: GDS1209 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GDSbrowser?acc=GDS1209>) [239, 240], GSE3982 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE3982>) [241]. A kiértékelésre került kísérleteket és minta-azonosítókat a 2. táblázat tartalmazza. Az expressziós szinteket a GAPDH értékére normalizáltuk. Az expressziós mintázatok ábrázolásánál kéktől pirosig terjedő színskálát alkalmaztunk, ahol a kék szín jelöli az alacsony, piros a magas expressziót. A skála kezdő értéke 0, végpontja 2,2488. Az adatok táblázatos ábrázolását Microsoft® Office Excel® 2007 SP2 szoftverrel végeztük.

2. táblázat: A kiértékelésre került microarray kísérletek és minta-azonosítók.

Kísérlet	GDS1209	GSE3982
minta	GSM52556 (agy)	GSM90843 (neutrofil granulocita 1)
	GSM52557 (kötőszövet)	GSM90844 (neutrofil granulocita 2)
	GSM52569 (vázizom)	GSM90838 (makrofág)
	GSM52570 (lép)	GSM90845 (B-sejt)
	GSM52557 (gyomor)	GSM90851 (NK sejt)
	GSM52568 (tüdő)	
	GSM52558 (vastagbél)	
	GSM52559 (hasnyálmirigy)	
	GSM52560 (prosztata)	
	GSM52561 (bőr)	
	GSM52562 (vékonybél)	
	GSM52563 (mellékvese)	
	GSM52566 (vese)	
GSM52567 (máj)		

5.2 Sejtek, sejtvonalak

A humán polimorfonukleáris sejteket (PMN), valamint a monociták és limfociták kevert populációját (PBMC) egészséges donorokból – a Semmelweis Egyetem etikai engedélyében meghatározott eljárás szerint – nyert perifériás vérből, Ficoll gradiens centrifugálással izoláltuk [36]. A humán mandulából nyert T- és B-sejteket Kremlitzka Marianntól és Balogh Andreától (Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest) kaptuk. A T- és B-sejtek izolálása során a mandulából, melyet a Szt. Imre kórházból kaptak, mechanikai roncsolással sejtszuspenziót készítettek. A mononukleáris sejteket Ficoll gradiens centrifugálással választották el. A T-sejtek a birka vörösvérsejtekkel rozettát képeznek, így ficoll gradiens centrifugálással elválaszthatók a B-sejtektől. A szeparált sejtek tisztaságát áramlási citometriával ellenőrizték, T-sejtek esetén a CD3, B-sejtek esetén a CD19 sejtfelszíni marker jelölésével. Az így nyert sejtpopulációk átlagosan 70-95%-os tisztaságúak voltak.

A PBMC-ből, műanyag felszínre történő kitapasztással nyert monocitákat RPMI-1640 médiumban tenyésztettük, melyet 10% magzati borjúsavóval (FBS), 50 E/ml penicillinnel, és 50 µg/ml streptomycinnel egészítettünk ki. A sejteket 50 ng/ml makrofág kolónia-stimuláló faktorról (M-CSF, Peprotech) hét napig differenciáltattuk makrofág irányba. A differenciáció sikerességét a CD11b illetve CD18 expresszió áramlási citometriás vizsgálatával ellenőriztük. Ehhez fikoeritrinnel jelzett anti-CD11b ellenanyagot (DAKO) és FITC-cel jelzett anti-CD18 ellenanyagot (DAKO) használtunk. A PLB-985 myelomonoblast sejtvonalat RPMI-1640, 10% FBS-t, 50 E/ml penicillint és 50 µg/ml streptomycint tartalmazó médiumban növesztettük. A sejteket hét napig tartó 0,5% dimetilformamid (DMFA) kezeléssel differenciáltattuk neutrofil irányba. A differenciáció sikerességét a CD11b sejtfelszíni marker expressziójának változásával ellenőriztük, melyhez fikoeritrinnel jelzett anti-CD11b ellenanyagot (DAKO) használtunk [242]. A COSphoxFcγR sejteket Dr. Mary Dinauer-től (Indianapolis, IN) kaptuk. Ezek olyan COS7 sejtek, amelyek stabilan kifejezik az FcγRIIa receptort és a fagocita oxidáz komponenseit, így fagocitózisra és szuperoxid termelésre is képesek. A p40^{phox} oxidáz komponens ezekben a sejtekben sárga fluoreszcens proteinnel (YFP) kapcsolt (a mikroszkópos felvételeken zöld színnel látható). A COS7 és COSphoxFcγR sejteket 37°C-os termosztátban, 5% CO₂

koncentráció mellett, GlutaMAX I Dulbecco's modified Eagle's médiumban (DMEM, Invitrogen) növesztettük, melyet 10% (w/v) FBS-sel, 50 E/ml penicillinnel, és 50 µg/ml streptomycinnel egészítettünk ki. A COSphoxFcγR sejtvonal esetében a médiumhoz 0,2 mg/ml hygromycint, 0,8 mg/ml neomycint, és 1 µg/ml puromycint is adtunk [243].

Az ARHGAP25-csendesített PLB-985 sejtek transzfektálása során siSTRIKE U6 hairpin cloning system (Promega) rendszert használtunk. Az ARHGAP25 mRNS-en található célszekvencia a „start” kodontól számítva a 244. nukleotidtól kezdődött. A hatékony shRNS oligót, valamint ennek minimális módosítását tartalmazó kontroll shRNS oligót (3. táblázat) a Sigma-Aldrich cégtől rendeltük. A transzfekciót Amaxa Nucleofector kit-tel és a hozzá tartozó készülékkel (Lonza) végeztük. A kezelést követően a sejteket 96 lyukú sejtenyésző lemezen klónoztuk, majd 10 µg/ml puromicinnel szelektáltuk. A folyamat végeredményeként stabil, ARHGAP25-csendesített PLB-985 klónokat kaptunk. A primer humán makrofágokat ARHGAP25-specifikus, illetve kontroll siRNS-sel transzfektáltuk (3. táblázat). Ebben az esetben az Amaxa Human Macrophage Nucleofector Kit-et használtuk. A COS7 és COSphoxFcγR sejtek tranziens transzfekciójához Fugene HD (Roche Applied Science) reagenst használtunk a gyártó utasításai szerint. Ezen sejtekbe cian fluoreszcens proteinnel (CFP) jelzett vad típusú, illetve mutáns ARHGAP25-öt, valamint CFP-p50RhoGAP-ot kódoló konstruktokat, illetve inzertet nem tartalmazó „üres” CFP vektort juttattunk.

5.3 Plazmidok, fehérjék

A glutation-S-transzferázzal (GST) kapcsolt Rac1-et, RhoA-t és Cdc42-t kódoló plazmidokat Dr. Alan Hall-tól (London, Egyesült Királyság) kaptuk. A GST-vel kapcsolt ARHGAP25-öt, valamint különböző darabjait humán fehérvérsejtekből készített cDNS-ből klónoztuk PCR reakció segítségével. A felsokszorozott DNS darabokat ezután pGEX4T-1 vektorba illesztettük. A transzfekciók során alkalmazott ARHGAP25 konstruktokat pCFP-C1 vektorba illesztettük. A p50RhoGAP esetében pCFP-N1 vektort alkalmaztunk. Az ARHGAP25 katalitikus doménjében található konzervált arginint, amely a GAP-aktivitásért felelős, a Scheffzek és munkatársai által leírtak alapján határoztuk meg [244]. Ezt követően a beazonosított, 192. arginint

helyspecifikus mutagenézissel (QuickChange site-directed mutagenesis kit, Stratagene) alaninra cseréltük, a gyártó utasításai szerint. A konstruktok előállítása során alkalmazott primereket a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: A rekombináns/fluoreszcens fehérjék előállítása során alkalmazott primer párok.

konstruktok	primer párok	
GST-ARHGAP25f.l.	forward 5'-3'	CGGGATCCGTGATGACTGGCGAGCAGATGGCTG
	reverse 5'-3'	CCGCTCGAGCGAGCCTCGGTCTTGGGTCC
GST-PH domén	forward 5'-3'	CGGGATCCCCATGTCCCTCGGTCAGTCGGCC
	reverse 5'-3'	GGAATTCGCCAAACAC TCCACAGGGTGTGC
GST-GAP domén	forward 5'-3'	CGGGATCCGCTGGCACACCCTGTGGAGTG
	reverse 5'-3'	GGAATTCTGACAGGGGTATATCCTTGGAC
GST-PH+GAP domén	forward 5'-3'	CGGGATCCGTGATGACTGGCGAGCAGATGGCTG
	reverse 5'-3'	GGAATTCTGACAGGGGTATATCCTTGGAC
GST-coiled coil domén	forward 5'-3'	CGGGATCCAACCTCTGAAACTGGGCCTGG
	reverse 5'-3'	CCGCTCGAGCCTTAAGCCTCGGTCTTGGGTTC
ARHGAP25R192A	forward 5'-3'	GAAGAGGGCATCTTCGCTCTTCCTGGGCAGGAC
	reverse 5'-3'	GTCTGCCCAGGAAGAGCGAAGATGCCCTCTTC
CFP-ARHGAP25	forward 5'-3'	AACTCGAGACATGTCCCTCGGTTCAGTC
	reverse 5'-3'	TTGGATCCTAAGCCTCGGTCTTGGGTTC
ARHGAP25 shRNS/siRNS	5'-3'	ACCGGGAAGTTTGTCTTTGAAATTCAAGAG ATTTCAAAGACAAACTTCCCTTTTTC
	5'-3'	ACCGGGAAGTTTGTCTTGTAAATTCAAGAG ATTTACAAGACAAACTTCCCTTTTTC
p50RhoGAP-CFP	forward 5'-3'	CCGCTCGAGGCCATGGATCCGCTCTCAGAGCTGCAGG
	reverse 5'-3'	GGAATTCGGAGCCCGCTGGGGTCCGGGCTTG

5.4 ARHGAP25-specifikus ellenanyag előállítása, tisztítása

A poliklonális ARHGAP25-specifikus ellenanyag előállítása során nyulakat immunizáltunk a GST-ARHGAP25 (509-619 as) (megfelel a GST-coiled coil szakasznak) rekombináns fehérjefragmenssel. Az ellenanyag nyúl szérumból történő tisztításához affinitás-tisztított, glutation agaróz gyöngyhöz (Sigma-Aldrich) kapcsolt GST-t és GST-coiled coil fehérjét állítottunk elő (a glutation gyöngy előkészítése: a glutation gyöngyöt 50-szeres térfogatnyi NETN pufferben [0,5% NP-40, 20 mM Tris, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA] szuszpendáljuk, majd 1 percig 2000 rpm-mel centrifugáljuk. Ezt követően egy éjszakán át 4 °C-on forgatjuk 10-gyöngy-térfogatnyi NETN pufferben, majd ismételt centrifugálás után 1 ml NETN pufferben tároljuk). A

GST- és GST-coiled coil gyöngyöket egyszer mostuk 10 ml NETN pufferben, majd kétszer 0,1 M borát pufferben (pH 8,0). Ezután egyszer mostuk 0,1 M-os pH 9,0-s, majd még egyszer 0,2 M-os, pH 9,0-s borát pufferben. A GST- és GST-coiled coil keresztkötését dimetilpimelinidát oldattal végeztük. Ennek során a gyöngyöket 1 órán át 4°C-on inkubáltuk forgó keverőben 40 mM dimetilpimelinidát oldatban (a reagenst 0,2 M pH 9,0-s borát pufferben oldottuk). A gyöngyöket kétszer mostuk 0,1 M borát pufferben (pH 8,0), majd 40 mM etanolamin-ban (0,1 M, pH 8,0 borát pufferben oldva) inkubáltuk 45 percig 4 °C-on, forgó keverőben. Ezt követően a gyöngyöket háromszor mostuk hideg PBS-ben, egyszer 0,2 M glicin-HCl (pH 2,5) oldattal, egyszer mostuk 1 M K₂HPO₄-tal, majd kétszer ismét PBS-sel. A mosási lépések után a GST-gyöngyöket együtt inkubáltuk 8 ml hígított nyúl szérummal (a hígítás során 4 ml szérumhoz 4 ml PBS-t adtunk, amely tartalmazott 0,2% Tween20-at). Az inkubálást forgó keverőben 4 °C-on, egy éjszakán át végeztük. Miután eltávolítottuk a szérumból a GST-t felismerő ellenanyagok jelentős részét, a GST-gyöngyről visszanyert felülúszót tovább forgattuk a GST-coiled coil gyöngyökkel, 2 órán át, 4 °C-on. Ezt követően az ellenanyagokat megkötött GST-coiled coil gyöngyből üvegcsőbe töltve oszlopot készítettünk, amit háromszor mostunk 10-10 ml, 0,2% Tween20-at tartalmazó PBS-sel (csupán a gravitációs erőt kihasználva), majd újabb kétszeri mosás következett PBS-sel. A kötődött ellenanyagokat 0,2 M-os glicin-HCl (pH 2,5) oldattal eluáltuk 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövekbe (10 frakciót szedtünk, frakciónként 750 µl-t), melyekbe előzőleg 250 µl, 1 M-os K₂HPO₄ oldatot tettünk. Ezt követően Bradford módszerével [245] meghatároztuk a frakciók fehérjemennyiségét, majd a legmagasabb fehérjetartalmat mutató frakciókat egybe gyűjtöttük. Az ellenanyagot tartalmazó oldatot egy éjszakán át 4 °C-on dializáltuk 1000 ml PBS/glicerol oldatban (PBS:glicerol arány 1:1).

5.5 Western blot

Mintánként 10⁷ sejtet 100 µl lízis pufferben (30 mM Na-Hepes [N-2-hidroxiethylpiperazin-N-2-etánszulfonsav], 100 mM NaCl, 2% Triton-X-100, 20 mM NaF, 1 mM Na-EGTA, 1 mM Na-EDTA, 100 mM benzamidin, 0,02% diizopropil-

fluorofoszfát (DFP), 1 % aprotinin, 1% proteáz inhibitor koktél (Sigma-Aldrich), 1% foszfatáz inhibitor koktél (Sigma-Aldrich), 1% fenil-metil-szulfonilfluorid (PMSF), pH 7,5) tártunk fel 5 percig jégben inkubálva. A Triton-inszolubilis frakciót centrifugálással eltávolítottuk (14000 rpm, 12 perc, 4 °C), majd a felülúszót 2x-es Laemmli-puffer (126 mM Tris-HCl, 20 % glicerol, 4 % nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 0,02 % brómfenolkék, pH 6,8) hozzáadásával 8 percig 100 °C-on forraltuk. A fehérjék szétválasztását 10%-os SDS-poliakrilamid gélben végeztük. A szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk, majd ezt követően a membránokat 5% zsírszegény tejport és 0,1% Tween 20-at tartalmazó PBS oldattal blokkoltuk 1 órán át. A blokkolt membránokat anti-ARHGAP25 poliklonális ellenanyaggal (1:2000 hígításban), anti-p50RhoGAP poliklonális antitesttel [236] (1:1000 hígításban), anti-GST ellenanyaggal (Invitrogen) (1:1000 hígításban), illetve anti- β -aktin monoklonális ellenanyaggal (Sigma-Aldrich) (1:10000 hígításban) inkubáltuk. Második ellenanyagként számban termeltetett, tormaperoxidázzal konjugált anti-nyúl-, vagy birkában termeltetett, anti-egér IgG-t (GE Healthcare) használtunk, 5000-szeres hígításban. Az első és második ellenanyagokkal történő inkubálások után a membránokat 5-ször mostuk 0.1% Tween 20-al kiegészített PBS-ben. A kötődött ellenanyagokat ECL (enhanced chemiluminescence) szubsztráttal tettük láthatóvá: az enzimreakció során keletkezett kemilumineszcens jelet FUJI Super RX filmekken rögzítettük.

5.6 A GTPáz aktivitás mérése sejtmentes rendszerben

A rekombináns fehérjék GTPáz aktivitását a Self és munkatársai által leírt „nitrocellulose filter-binding assay” módszerrel mértük [53]. A rekombináns Rac1, RhoA illetve Cdc42 radioaktív GTP-vel történő töltése során 1-4 μ g *E. coli*-ból nyert tisztított fehérjét 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten radioaktív [γ -³²P]GTP-vel (több, mint 5000 Ci/mM), alacsony magnézium-koncentrációjú pufferben (16 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM NaCl, 0,1 mM ditiotritol (DTT), 5 mM EDTA és 100 nM [γ -³²P]GTP (5 μ Ci)). Ezt követően 20 mM MgCl₂-t adtunk az oldathoz, hogy a további nukleotid cserét gátoljuk, illetve az oldatot jégen tartottuk, hogy csökkentsük a nukleotid-hidrolízist. A GTPáz reakció során 3 μ l [γ -³²P]GTP-vel töltött kis G fehérjét adtunk 27 μ l 20 °C-os pufferhez (16 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mM DTT, 1 mg/ml

marha szérum albumin (BSA), 1 mM nem jelölt GTP), amely már tartalmazta az ARHGAP25-öt, vagy annak különböző doménjeit. Ezen keverékből 5 µl-nyi mennyiségeket vettünk adott időközönként, amiket 0,45 µm pórusméretű nitrocellulóz membránon átszűrtünk. A membránokat ezután háromszor mostuk 2-2 ml hideg mosó pufferrel (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂; pH 7,7). Vákuumos szárítás után a membránokat szcintillációs küvetákba tettük, majd a radioaktivitást Beckman LS 5000TD folyadék-szcintillációs spektrométerben olvastuk le.

5.7 A membránfodrozódás vizsgálata

A vizsgálathoz mintánként 3×10^5 , 25mm átmérőjű fedőlemezen lévő, CFP-ARHGAP25-tel, CFP-ARHGAP25R192A-val, CFP-p50RhoGAP-pal, illetve inzertet nem tartalmazó CFP vektorral transzfektált COS7 sejtet használtunk. A sejteket 1 óras szérummegvonás után 20 percig 0,1 µg/ml epidermális növekedési faktorról (EGF) stimuláltuk. Ezt követően a sejteket fixáltuk (0,1% marha szérum albumin (BSA), 0,1% Na-azid, 4% paraformaldehid, 0,1% szaponin, PBS-ben oldva), majd a filamentáris aktint Alexa-568-konjugált falloidinnel (1:100 hígításban) jelöltük. A jelölést permeabilizáló pufferben (0,1% BSA, 0,1% Na-azid, 0,1% szaponin, PBS-ben oldva), 20 percig, szobahőmérsékleten végeztük. Az eredmények értékeléséhez Zeiss LSM510 lézer scanning mikroszkópot, 40x/1.3-es nagyítást és immerziós olajat (Plan-Neofluar, Zeiss Vienna, Austria), valamint a Zeiss LSM Image Browser acquisition programot használtunk.

5.8 A szuperoxid termelés mérése

Az ARHGAP25-csendesített, illetve kontroll shRNS-sel kezelt PLB-985 sejtek extracelluláris szuperoxid termelését – a szuperoxid dizmutázzal gátolható – citokróm c redukcióján alapuló módszerrel mértük [36]. A fagoszómális szuperoxid termelés mérése érdekében lucigenint használtunk. Mindkét esetben a PLB-985 sejtek 10^7 /ml koncentrációjú, H-médiával (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,8 mM

CaCl₂, 10 mM HEPES (N-2-hidroxiethylpiperazin-N-2-etánszulfonsav), 5 mM glükóz; pH 7,4) készült szuszpenziójából 180 µl-es aliquotokat mértünk 96 lyukú sejttenyésztő lemezre. A sejtszuszenzióhoz előzetesen 5,1 mg/ml koncentrációban, dimetil-szulfoxidban oldott lucigenint, vagy 0,1 mM citokróm c-t adtunk. A mintákat 5 percig előinkubáltuk 37 °C-on, majd 20 µl stimuláló oldat hozzáadásával indítottuk a szuperoxid termelést. A citokróm c-vel végzett mérések esetében 0,1 µM koncentrációban adott forbol-észter (PMA), a lucigeninnel készült mérésekben pedig opszonizált zymozan volt a stimuláló ágens. Ez utóbbit úgy készítettük, hogy 15 mg zymozan-t (Sigma) szuszpendáltunk 1 ml kevert humán savóban (melyet legalább három különböző, egészséges férfi donortól vett vérből nyertünk, és azonos mennyiségben kevertünk össze), vagy hőinaktivált kevert humán savóban (ugyanúgy készült, mint előbb, de a kevert savót 56 °C-on 50 percig inaktiváltuk) majd 20 percig, 37 °C-on inkubáltunk. A citokróm c-vel mért szuperoxid-termelést iEMS ELISA reader-rel (Labsystems), lucigenint alkalmazva pedig Fluoroskan Ascent FI luminometerrel (Labsystems) 15 percig követtük.

5.9 Filamentáris aktin jelölése PLB-985 sejtekben

Mintánként egymillió ARHGAP25-csendesített, illetve kontroll shRNS-sel kezelt PLB-985 sejtet használtunk, melyeket egyszeri, FACS pufferben (PBS, 1% BSA, 1g/l Na-azid) történő mosás (1500 rpm, 5 perc centrifugálás) után 500 µl fixáló pufferrel (4 % friss paraformaldehid, 0,1 % szaponin FACS pufferben oldva) 10 percig fixáltunk. Ezt követően kétszer mostuk a mintákat FACS pufferrel, majd az üledéket 20 percig szobahőmérsékleten jelöltük 100 µl FACS pufferben, amely tartalmazott 0,1 % szaponint és 1 µg/ml Alexa488-falloidin-t. Kétszeri mosás után a jelölt sejteket 1 ml FACS pufferben vettük fel, majd az eredményt Cell Lab Quanta SC áramlási citométerrel értékeltük.

5.10 Élesztő fagocitózisának vizsgálata áramlási citométerrel

Egy gramm *Saccharomyces cerevisiae* élesztőt 300 ml desztillált vízben 30 percig 100 °C-on forraltunk, majd 4500 rpm-mel 10 percig centrifugálva mostunk 50 ml PBS-ben. A mosási lépéseket négyszer ismételtük, majd Tripán kék (Sigma) festéssel ellenőriztük, hogy az élesztősejt szuszpenzió valóban nem tartalmaz élő sejteket. A kísérletek során 5×10^6 élesztősejtet 2 μM Cell Tracker Green (Molecular Probes-Invitrogen) intracelluláris, szupravitalis festékkel 20 percig 37°C-on jelöltünk. Kétszeri, PBS-sel történő mosás után az élesztőket 1 órán keresztül 1 ml kevert humán savóval, illetve hőinaktivált (56°C, 50 perc) kevert humán savóval opszonizáltuk 37°C-on. Ezt követően 5×10^6 élesztősejtet adtunk 5×10^5 differenciáltatott PLB-985 sejthez, vagy ugyanennyi primer humán makrofághoz, majd a sejtsuszpenziókat 37 °C-on 10 percig inkubáltuk. A százalékos fagocitózist Cell Lab Quanta SC áramlási citométerrel értékeltük (lásd még 6.4.4. fejezet). A nem internalizált élesztők fluoreszcenciájának kioltására (quenching) PBS-ben oldott 0,2 % (w/v) Tripán kék festéket (pH 5,5) használtunk.

5.11 Fagocitózis vizsgálat konfokális mikroszkóppal

A kísérletek során CFP-ARHGAP25-tel, CFP-ARHGAP25R192A-val, CFP-p50RhoGAP-pal, illetve inzerter nem tartalmazó CFP vektorral transzfektált COSphoxFc γ R sejteket használtunk. Az 5.10. fejezetben leírt módon előkészített, ez esetben azonban 2 μM Cell Tracker Red-del (Molecular Probes-Invitrogen) jelölt, opszonizált élesztőket 3×10^5 db, 25mm átmérőjű fedőlemezen lévő, transzfektált COSphoxFc γ R sejtekhez adtuk, és 37 °C-on, 5% CO₂ koncentráció mellett 1 órán át inkubáltuk. A PBS-ben történő mosást követően a mintákat 500 μl fixáló pufferben fixáltuk. A kiértékeléshez Zeiss LSM510 lézer scanning mikroszkópot, 40x/1.3-es nagyítást és immerziós olajat (Plan-Neofluar, Zeiss, Austria), valamint a Zeiss LSM Image Browser acquisition programot használtunk. A statisztikai analízis során két értéket vettünk alapul, a fagocitózis százalékot, mely megadja, hogy száz darab megszámlált, transzfektálódott sejtből hány sejt fagocitált kettő, vagy több élesztőt;

valamint a fagocitózis indexet, ami a számolt sejtek által összesen fagocitált élesztők számát mutatja meg.

5.12 Statisztikai analízis

A western blot kísérleteket legalább háromszor elvégeztük. A mikroszkópos vizsgálatok során minden független kísérletben fedőlemezenként 100-100 db transzfektált sejtet számoltunk meg. Az adatok statisztikai elemzéséhez egymintás t-próbát, egyszempontos, illetve kétszempontos ismételt varianciaanalízist (ANOVA) végeztük. A post-hoc összehasonlításhoz a Tukey honest significant difference (Tukey HSD) tesztet használtuk. A szignifikancia határát minden esetben a $p < 0,05$ értéknél húztuk meg. A statisztikai analíziseket a STATISTICA 7.0 programmal végeztük (Statsoft, Tulsa, Egyesült Államok).

6 Eredmények

6.1 A Rac/RhoGAP-ok, ezen belül az ARHGAP25 mRNS szöveti expressziós mintázatának vizsgálata

Ahogy a bevezető 3.4.4.5. fejezetében említettem, az ARHGAP25 a Northern blot kísérlet során a lépben és a perifériás fehérvérsejtekben mutatott kiemelkedő expressziót. Részben ezen információból kiindulva, részben, mert irodalmi adatok hiányában aktuálisnak és fontosnak tartottuk, megvizsgáltuk az általunk sikeresen azonosított Rac/RhoGAP-ok szöveti expressziós mintázatát. Jelen dolgozatban az internetes adatbázisokban elérhető mRNS mikroarray adatok kiértékelésével készített táblázatot mutatom be (4. táblázat). A táblázat első oszlopában az általunk azonosított Rac/RhoGAP-ok, mellettük színkóddal jelölve a feltüntetett szövetekben mért expressziójuk látható. Az expressziós értékeket a GAPDH-ra normalizáltuk. Piros szín jelzi a magas, kék szín az alacsony expressziós értékeket. A táblázatban piros nyíl jelzi az ARHGAP25-öt, melynek expressziója a fehérvérsejtekben lényegesen magasabb, mint a többi vizsgált szövetben, amely egybevág a 3.4.4.5. fejezetben leírt eredményekkel (18. ábra). Ehhez képest – ellentétben a Northern blot eredménnyel – a lépben viszonylag alacsony, 0,09-es relatív expressziós értéket kaptunk. Ugyanekkora mRNS mennyiséget tapasztaltunk a vastag- és vékonybélben, valamint a gyomorban. Fontos azonban megjegyezni, hogy ezen expressziós értékek még mindig lényegesen magasabbak a többi szövetben kapott értékekhez képest (4. táblázat).

6.2 Az ARHGAP25 fehérje kimutatása fehérvérsejtekben

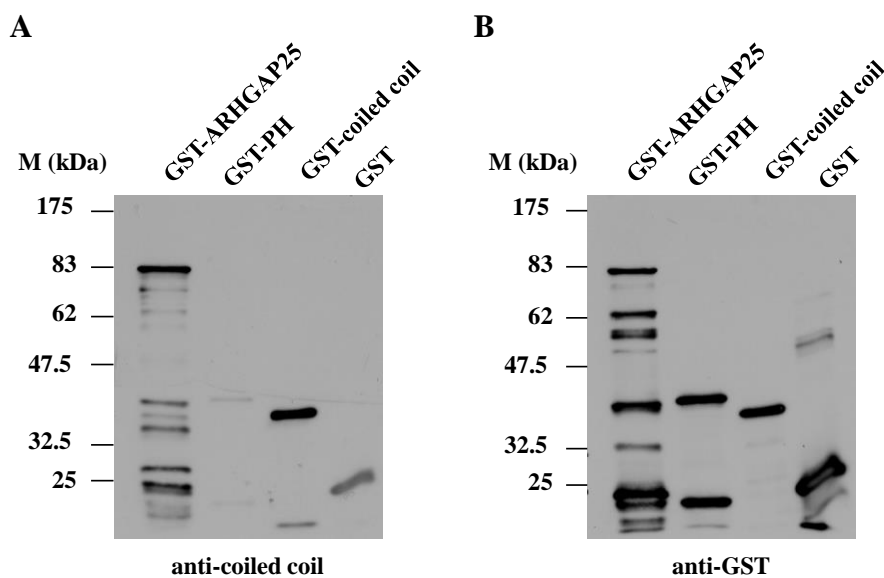
Munkánk kezdetén még nem volt kereskedelmi forgalomban kapható ARHGAP25-specifikus ellenanyag, ezért mi magunk állítottunk elő poliklonális antitestet immunizált nyulak szérumból. A szérumot glutation-S-transzferáz (GST) fehérje és GST-coiled coil protein segítségével tisztítottuk. A tisztítás hatékonyságát, és az ellenanyag specificitását western blottal ellenőriztük (19. ábra).

4. táblázat: A humán Rac/RhoGAP mRNS-ek szöveti expressziós mintázata mikroarray adatbázisok alapján. A piros szín jelzi a magas expressziós értékeket, a kék szín az alacsony expressziót. A táblázatban a GAPDH-ra normalizált értékeket tüntettük fel. Piros nyíl jelöli az ARHGAP25-öt.

	agy	kötőszövet	vázizom	lép	gyomor	tüdő	vastagbél	hasnyálmirigy	prosztata	bőr	vékonybél	mellékvese	vese	máj	neutrofil 1	neutrofil 2	makrofág	B-sejt	NK sejt
ABR	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04	0.02
ARAP1	0.02	0.06	0.01	0.09	0.05	0.11	0.03	0.08	0.05	0.04	0.05	0.07	0.04	0.05	0.23	0.19	0.13	0.16	0.28
ARAP2	0.02	0.02	0.00	0.00	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01	0.06	0.02	0.00	0.01	0.00	0.06	0.07	0.06	0.47	0.78
ARAP3	0.01	0.05	0.01	0.02	0.06	0.13	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.38	0.18	0.04	0.03	0.07
ARHGAP1	0.00	0.01	0.00	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.14	0.06	0.01	0.20	0.11
ARHGAP4	0.00	0.02	0.00	0.03	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	0.04	0.05
ARHGAP5	0.02	0.03	0.00	0.01	0.05	0.03	0.02	0.05	0.02	0.04	0.04	0.02	0.05	0.00	0.01	0.01	0.02	0.18	0.08
ARHGAP6	0.00	0.05	0.01	0.01	0.02	0.10	0.01	0.00	0.06	0.02	0.03	0.01	0.05	0.00	0.01	0.00	0.02	0.07	0.01
ARHGAP8	0.00	0.01	0.00	0.02	0.04	0.03	0.01	0.07	0.04	0.01	0.03	0.01	0.06	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.04
ARHGAP9	0.09	0.37	0.01	0.15	0.08	0.22	0.04	0.08	0.06	0.10	0.07	0.11	0.14	0.06	0.04	0.02	0.06	0.06	0.56
ARHGAP10	0.01	0.03	0.01	0.00	0.03	0.03	0.01	0.01	0.04	0.03	0.02	0.01	0.01	0.03	0.00	0.00	0.05	0.02	1.58
ARHGAP11A	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.03
ARHGAP12	0.01	0.06	0.00	0.00	0.03	0.01	0.01	0.05	0.02	0.04	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.28	0.16
ARHGAP17	0.03	0.15	0.01	0.14	0.09	0.16	0.06	0.07	0.05	0.07	0.07	0.15	0.08	0.05	0.03	0.04	0.13	1.10	0.22
ARHGAP24	0.00	0.02	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01	0.05	0.02	0.01	0.02	0.01	0.07	0.02	0.03	0.02	0.01	0.19	0.03
→ ARHGAP25	0.01	0.04	0.00	0.03	0.08	0.05	0.03	0.01	0.02	0.03	0.03	0.01	0.02	0.03	1.14	0.56	0.12	0.91	1.40
ARHGAP28	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01
ARHGAP29	0.02	0.20	0.01	0.02	0.11	0.17	0.02	0.09	0.03	0.10	0.04	0.02	0.18	0.02	0.01	0.00	0.00	0.02	0.05
ARHGAP32	0.03	0.01	0.00	0.00	0.04	0.02	0.03	0.07	0.03	0.04	0.05	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.01	0.01	0.02
ARHGAP44	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04	0.06	0.01	0.06	0.04	0.02	0.05	0.02	0.03	0.05	0.02	0.01	0.01	0.05	0.12
BCR	0.03	0.09	0.01	0.04	0.28	0.12	0.05	0.28	0.15	0.15	0.26	0.10	0.22	0.03	0.22	0.11	0.05	0.55	0.61
BNIP2	0.00	0.07	0.00	0.00	0.03	0.01	0.01	0.03	0.01	0.06	0.02	0.01	0.02	0.00	0.29	0.25	0.16	0.52	0.38
CHN1	0.51	0.09	0.00	0.00	0.02	0.05	0.01	0.04	0.01	0.03	0.02	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01
CHN2	0.05	0.02	0.00	0.01	0.03	0.02	0.13	0.13	0.03	0.01	0.07	0.02	0.03	0.04	0.02	0.01	0.04	0.03	0.20
DKFZP434A1010	0.05	0.00	0.00	0.01	0.03	0.02	0.01	0.08	0.02	0.01	0.03	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03
DLC1	0.06	0.23	0.01	0.02	0.11	0.33	0.05	0.03	0.04	0.11	0.08	0.12	0.09	0.09	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01
FAM13B	0.04	0.07	0.00	0.01	0.09	0.05	0.02	0.08	0.00	0.04	0.03	0.06	0.05	0.01	0.21	0.12	0.20	0.92	0.52
GRAF	0.02	0.34	0.00	0.45	0.01	0.12	0.03	0.02	0.01	0.08	0.06	0.06	0.06	0.02	1.96	0.93	0.36	0.00	0.96
GRLF1	0.01	0.02	0.01	0.00	0.02	0.02	0.01	0.04	0.03	0.01	0.02	0.01	0.02	0.04	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
HMHA1	0.00	0.05	0.00	0.28	0.05	0.14	0.04	0.03	0.03	0.03	0.07	0.02	0.01	0.03	1.48	0.67	0.04	2.25	1.03
INPP5B	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
GMIP	0.00	0.01	0.00	0.08	0.04	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	0.37	0.33	0.06	0.15	0.22
ARHGAP22	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00
MYO9A	0.02	0.07	0.01	0.01	0.12	0.06	0.02	0.06	0.08	0.06	0.06	0.03	0.13	0.03	0.02	0.02	0.03	0.09	0.08
MYO9B	0.01	0.02	0.01	0.01	0.03	0.02	0.02	0.05	0.04	0.01	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02
OCRL	0.02	0.03	0.01	0.01	0.03	0.03	0.02	0.04	0.04	0.02	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.01
OPHN1	0.07	0.32	0.17	0.06	0.45	0.10	0.12	0.53	0.17	0.23	0.29	0.11	0.12	0.12	0.94	0.48	0.10	2.02	1.58
PIK3R1	0.06	0.10	0.02	0.04	0.11	0.15	0.05	0.10	0.06	0.12	0.11	0.05	0.07	0.12	0.07	0.03	0.05	0.18	0.25
PIK3R2	0.01	0.02	0.01	0.01	0.05	0.02	0.02	0.12	0.05	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.04	0.04	0.00	0.02	0.04
RACGAP1	0.01	0.03	0.00	0.00	0.03	0.03	0.01	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.00	0.07	0.14	0.10
RALBP1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
SH3BP	0.02	0.09	0.01	0.02	0.14	0.07	0.03	0.32	0.10	0.10	0.07	0.05	0.15	0.08	0.00	0.00	0.00	0.06	0.04
SRGAP2	0.02	0.02	0.00	0.00	0.04	0.02	0.01	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.05	0.02
SRGAP3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.03
STARD8	0.01	0.04	0.01	0.03	0.04	0.08	0.01	0.06	0.02	0.02	0.04	0.02	0.06	0.07	0.03	0.02	0.04	0.07	0.06

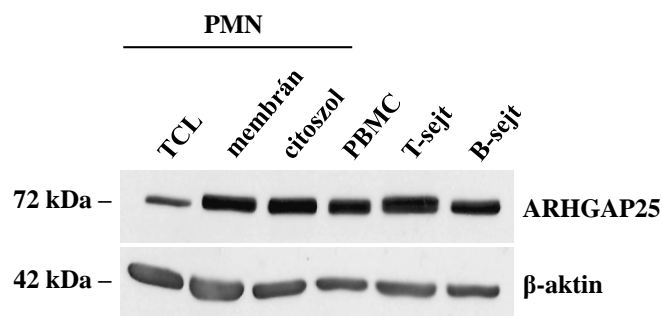
Az ellenőrzés során rekombináns teljes hosszúságú ARHGAP25-öt, annak PH, illetve coiled coil doménjét, valamint GST fehérjét futtattunk SDS-poliakrilamid gélen, majd a blottolás utáni nitrocellulóz membránt előhívtuk a tisztított (anti-coiled coil) ellenanyaggal (19. ábra A) és kontrollként anti-GST ellenanyaggal is (19. ábra B).

Az anti-GST ellenanyag mindegyik fehérje-konstruktot felismerte a várt magasságban (19. ábra B). Ehhez képest a tisztított anti-coiled coil ellenanyag elsősorban a teljes hosszúságú fehérjét (GST-ARHGAP25), és az immunizálásra használt GST-coiled coil szakaszt ismerte fel. A másik két protein (GST-PH és GST fehérje) esetében csupán gyenge jelölődést tapasztaltunk, amely betudható a tisztítás utáni szérumban maradt csekély mennyiségű anti-GST ellenanyagnak (19. ábra A). A kapott jelek fölötti molekulásúly-tartományban nem tapasztaltunk ellenanyag kötődést, amely esetleg aspecifikus fehérje-ellenanyag kapcsolódásra utalna. Az alacsonyabb molekulásúly tartományban tapasztalt jelölődés legvalószínűbb oka az ARHGAP25 nagyfokú bomlékonysága, mely a legtöbb GAP-ra általánosságban jellemző. Az anti-coiled coil ellenanyag specificitását alátámasztják továbbá az ARHGAP25 géncsendesítéses kísérleteink is, melyeket a későbbiekben ismertetek.



19. ábra: A poliklonális, ARHGAP25 ellen készített anti-coiled coil ellenanyag specificitásának ellenőrzése. Az anti-coiled coil ellenanyag elsősorban a teljes hosszúságú GST-ARHGAP25-öt, és annak coiled coil szakaszát ismeri fel (A). Az anti-GST kontroll ellenanyag minden, a membránon lévő GST-fúziós fehérjét felismer (B). GST: glutation-S-transzferáz; PH: pleckstrin homológ domén; M: molekulásúly marker (kDa).

A tisztított ellenanyagot felhasználva megvizsgáltuk az ARHGAP25 jelenlétét a főbb fehérvérsejt típusokban. Ahogy a 20. ábra is mutatja, a fehérje jól detektálható humán polimorfonukleáris sejtek (PMN) teljes sejt lizátumában (TCL), a monocitákat és limfocitákat egyaránt magába foglaló mononukleáris sejtpopulációban (PBMC) csakúgy, mint a humán mandulából származó T- és B-sejtekben. Az ARHGAP25-öt egyaránt kimutattuk a polimorfonukleáris sejtek membrán- és citoszol frakcióiban (20. ábra). A későbbiekben az ARHGAP25 szerepét humán neutrofil sejtekben/sejtvonalakban, illetve makrofágokban vizsgáltuk.



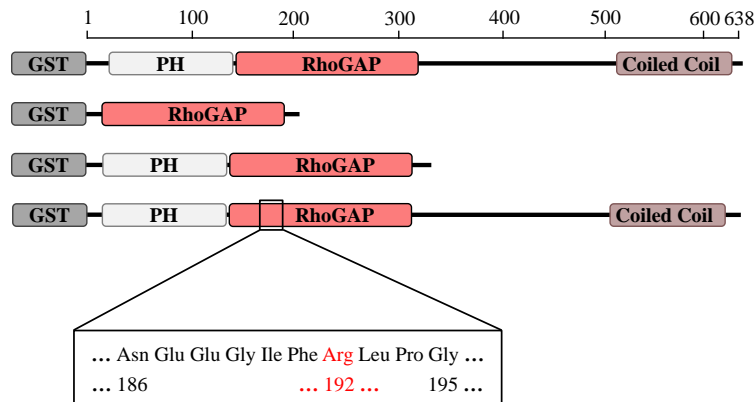
20. ábra: Az ARHGAP25 kifejeződik a főbb fehérvérsejt típusokban. PMN: polimorfonukleáris sejt (neutrofil granulocita); TCL: teljes sejt lizátum; PBMC: perifériás vér mononukleáris sejtjei (monocita, T-sejt, B-sejt együtt).

6.3 Az ARHGAP25 a Rac kis G fehérjét szabályozza

A funkcionális tesztek előtt célul tűztük ki annak meghatározását, hogy az ARHGAP25 melyik kis G fehérjét képes szabályozni. Ehhez rekombináns formában előállítottuk az ARHGAP25 teljes hosszúságú változatát, valamint a fehérje különböző doménjeit, fragmenseit (21. ábra). Az elkészített fehérjék GAP aktivitását első lépésben sejtmentes kísérletben vizsgáltuk.

Ahogy azt a bevezetőben is említettem, a Rho család kis G fehérjeit szabályozó GAP-okra – így az ARHGAP25-re is – jellemző egy a GAP doménben található, nagyon konzervált arginin, ami a GAP-aktivitásért felelős [201]. Annak igazolására, hogy az ARHGAP25 valóban GAP-ként viselkedik az általunk használt kísérleti rendszerekben, és a tapasztalt változások mögött tényleges GAP-aktivitása áll,

elkészítettük a fehérje funkcióvesztéses mutáns változatát. Ennek során a 192. aminosavként azonosított konzervált arginint alaninra cseréltük (21. ábra).



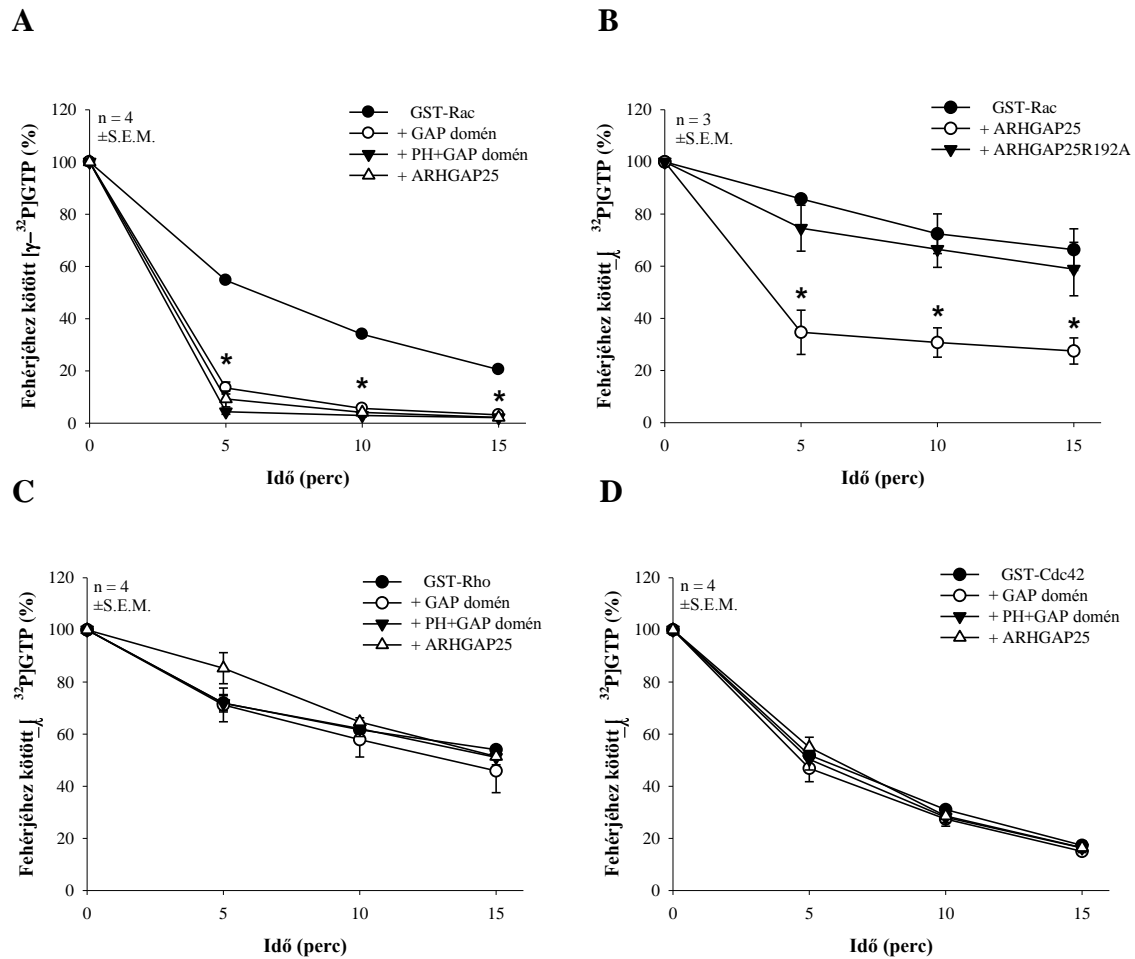
21. ábra: A klasszikus GAP assay során használt rekombináns ARHGAP25 fragmensek és a GAP aktivitásért felelős 192. arginin pozíciója az ARHGAP25 fehérjében. PH, pleckstrin homológ domén; RhoGAP, GTPáz aktiváló domén; CC, coiled coil. Az utolsó konstruktban pirossal emeltem ki a konzervált arginint.

A klasszikus GAP-aktivitás mérés során azt tapasztaltuk, hogy mind a teljes hosszúságú ARHGAP25, mind annak izolált GAP doménje, valamint a PH és GAP doméneket együttesen tartalmazó szakasza szignifikánsan fokozta a Rac endogén GTP hidrolízisét (22. ábra A).

Abban az esetben, ha az alkalmazott ARHGAP25 fragmenseket a Rho, vagy Cdc42 kis G-fehérjékhez adtuk, a hatás elmaradt, vagyis az ARHGAP25 ezeket nem volt képes szabályozni (22. ábra C, D). A mutáns ARHGAP25R192A esetében a GTPáz aktiváló hatás elmaradt (22. ábra B). A konstrukt tehát alkalmazható a további kísérletekben, mint funkcióvesztett kontroll.

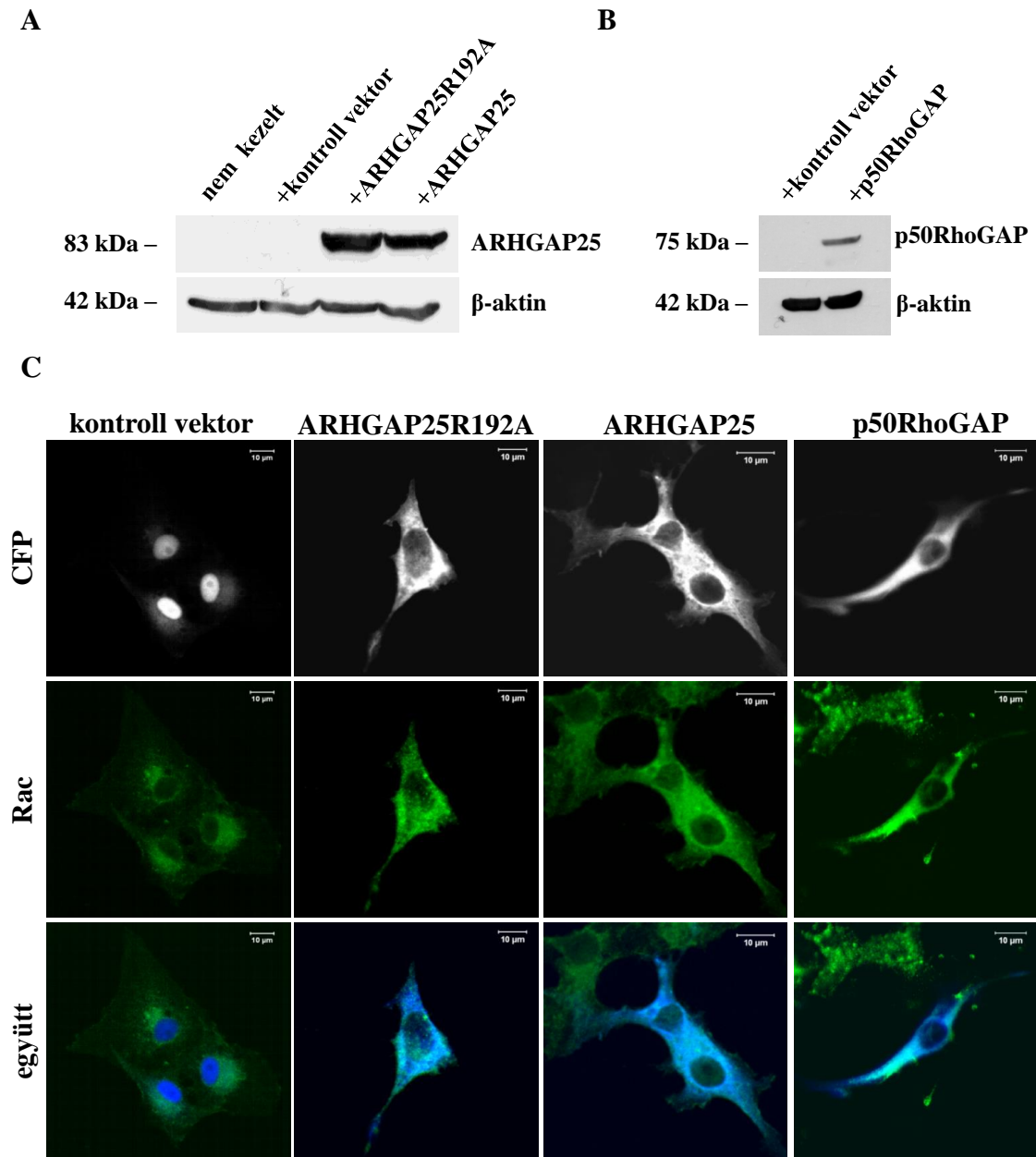
Az *in vitro* kísérletek során tapasztaltakat sejtes modellrendszerek alkalmazásával is megerősítettük. Ehhez COS7 sejteket transzfektáltunk cian fluoreszcens proteint (CFP) kódoló, inzertet nem tartalmazó vektorral, CFP-vel jelzett teljes hosszúságú ARHGAP25-tel, a funkcióvesztett mutáns CFP-ARHGAP25R192A-val, valamint p50RhoGAP-CFP-vel. A p50RhoGAP-ról munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy ugyancsak képes a Rac kis G fehérjét szabályozni *in vitro* [50]. A transzfecció sikerességét western blottal, valamint konfokális mikroszkóppal ellenőriztük (23. ábra A, B, C). A COS7 sejtek nem expresszálnak sem endogén ARHGAP25-öt (23. ábra A), sem p50RhoGAP-ot (23. ábra B). A túlexpresszált

fehérjék a sejtekben diffúz, citoplazmatikus elhelyezkedést mutattak, ezzel szemben a kontrollként alkalmazott cián fluoreszcens protein főként a sejtmagban volt megfigyelhető (23. ábra C).



22. ábra Az ARHGAP25 GTPáz specificitásának *in vitro* vizsgálata. A rekombináns, teljes hosszúságú ARHGAP25, valamint különböző fragmenseinek hatása a radioaktív GTP-vel töltött Rac (**A**), Rho (**C**) és Cdc42 (**D**) GTP hidrolízisére. **B** panel: a funkcióvesztéses mutáns ARHGAP25R192A elveszíti GTPáz aktiváló hatását. Négy (**A**, **C**, **D**), illetve három (**B**) független kísérlet átlagát és hibáját ábrázoltuk. *: $p < 0,05$ a kontrollhoz (GST-Rac, Rho, Cdc42) képest; kétszemponos ANOVA, Tukey HSD teszt.

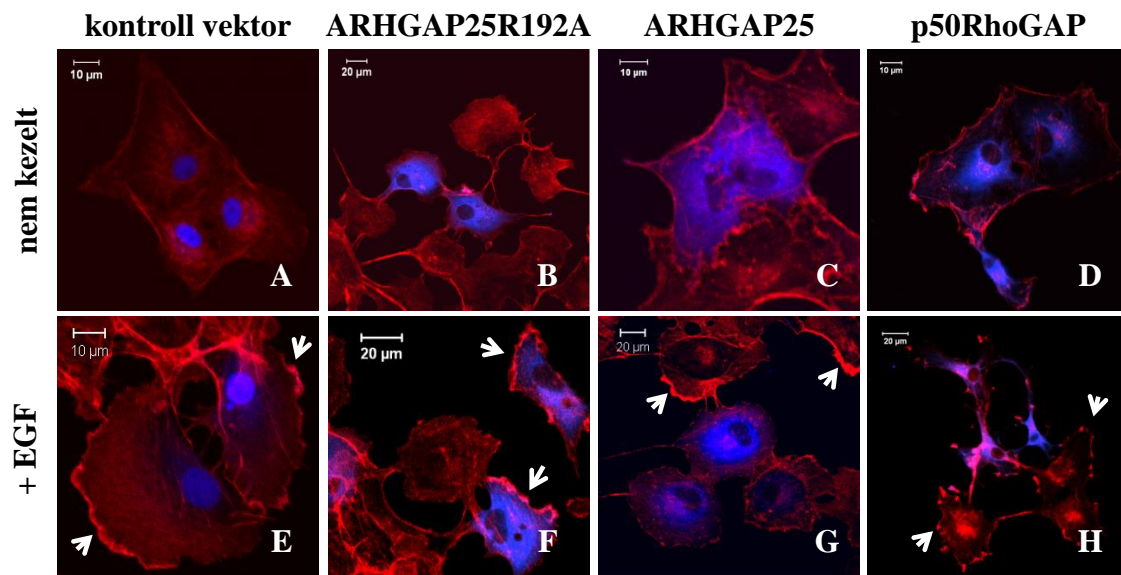
Mind az ARHGAP25, mind annak mutáns változata, csakúgy, mint a p50 részleges kolokalizációt mutatott a monoklonális ellenanyaggal jelölt, endogén Rac-kal, amely valószínűsíti (noha nem bizonyítja) ezen GAP-ok és a Rac együttműködését (23. ábra C).



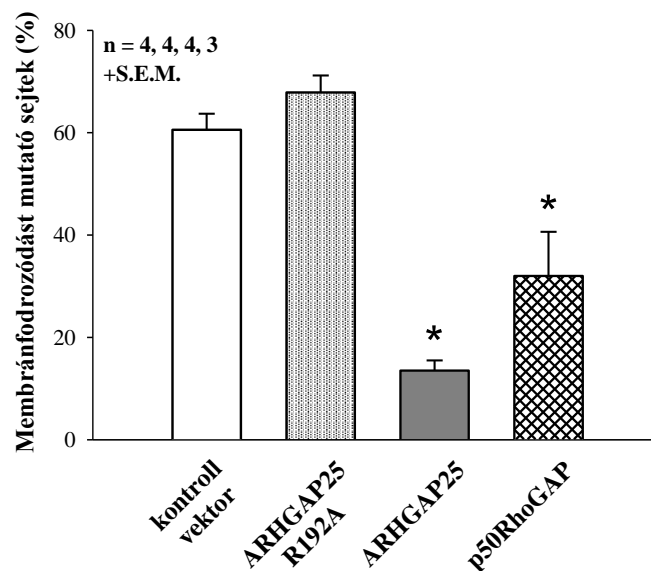
23. ábra Túlexpresszált ARHGAP25 és p50RhoGAP kimutatása COS7 sejtekben. A CFP-ARHGAP25-tel, CFP-ARHGAP25R192A-val, CFP-p50RhoGAP-pal, illetve inzertet nem tartalmazó CFP vektorral transzfektált COS7 sejtekből teljes sejt lizátumot készítettünk, amelyben western blottal mutattuk ki a transzfektált fehérjéket (**A**, **B**). Az előhívás során anti-coiled coil ellenanyagot (**A**), valamint anti-p50 poliklonális ellenanyagot (**B**) használtunk, töltéskontrollként β -aktint jelöltünk. A transzfektált COS7 sejtekben az ARHGAP25, ARHGAP25R192A, valamint a p50RhoGAP az endogén Rac-hoz hasonló, diffúz, citoplazmatikus elhelyezkedést mutatott (**C**). fehér/kék: CFP-konstrukttal transzfektált sejt; zöld: monoklonális ellenanyaggal jelölt endogén Rac.

A továbbiakban a transzfektált COS7 sejteket 20 percig epidermális növekedési faktorról (EGF) stimuláltuk és az endogén Rac helyett a filamentáris aktint jelöltük (24. ábra). EGF stimulus hatására a sejteken membránfodrozódás (úgynevezett ruffling), illetve lamellipódium-képződés figyelhető meg. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a folyamat jelátvitelében kulcsszerepet játszik a Rac (3.4.2.5. fejezet) [98, 246]. A 24. ábrán nyilak jelölik a membránfodrozódást. A fenotípus jól megfigyelhető a kontroll CFP vektorral, valamint a funkcióvesztett CFP-ARHGAP25R192A-val transzfektált (kék színű) sejtek esetében (24. ábra E, F). Az ARHGAP25-tel és p50-nel transzfektált mintákban elsősorban a nem transzfektálódott sejtek mutattak fodrozódást (24. ábra G, H). Az EGF-fel nem kezelt mintákban a fenotípus nem volt jellemző (24. ábra A-D). Ezen megfigyelések alapján az ARHGAP25 és a p50 egyaránt képes inaktiválni a Rac-ot, gátolva ezáltal a membránfodrozódást. Az ARHGAP25 GAP doménjében lévő konzervált arginin alaninra cserélése kivédte az ARHGAP25 hatását, bizonyítva ezzel, hogy a fehérje ténylegesen GTPáz aktiválóként működik (24. ábra F).

Az eredmények számszerűsítése során négy független mikroszkópos kísérletben meghatároztuk a membránfodrozódást mutató sejtek százalékos arányát, amely kifejezi, hogy kísérletenként száz darab megszámlolt, transzfektálódott sejtől hány sejt mutat membránfodrozódást. A kapott eredményeket a 24. ábrán látható oszlopdiagramon ábrázoltuk. A grafikonról leolvasható, hogy az ARHGAP25 túlexpressziója mintegy negyedére csökkentette a sejtekben megfigyelhető membránfodrozódás gyakoriságát a kontroll vektorhoz képest. A p50RhoGAP-pal három független kísérletet végeztünk, melynek során a p50 noha kisebb mértékben, de ugyancsak szignifikánsan gátolta a membránfodrozódás kialakulását. A mutáns ARHGAP25 nem okozott csökkenést a membránfodrozódásban, azaz sem *in vitro*, sem élő sejtekben nem képes a Rac GTP hidrolízisét fokozni.



I



24. ábra: A Rac-hoz köthető membránfodrozódás vizsgálata transzfektált COS7 sejtekben. Húsz perces EGF stimulust követően a membránfodrozódás megfigyelhető volt a kontroll CFP vektorral (E), valamint a funkcióvesztéses mutáns CFP-ARHGAP25R192A-val transzfektált sejtekben (F). A CFP-ARHGAP25 (G), illetve a CFP-p50RhoGAP (H) túlexpressziója gátolta a fenotípust. A nem stimulált sejtekben membránfodrozódás nem volt megfigyelhető (A-D). Kék: transzfektált sejt; piros: filamentáris aktin; nyilak: membránfodrozódás. I: A mikroszkópos kísérletek statisztikai értékelése. A grafikonon a négy (kontroll CFP vektor, CFP-ARHGAP25R192A, CFP-ARHGAP25) illetve három (CFP-p50RhoGAP) független kísérlet átlagát és hibáját (S.E.M.) ábrázoltuk. *: $p < 0,05$ a kontrollhoz képest, egyszempontos ANOVA, Tukey HSD teszt.

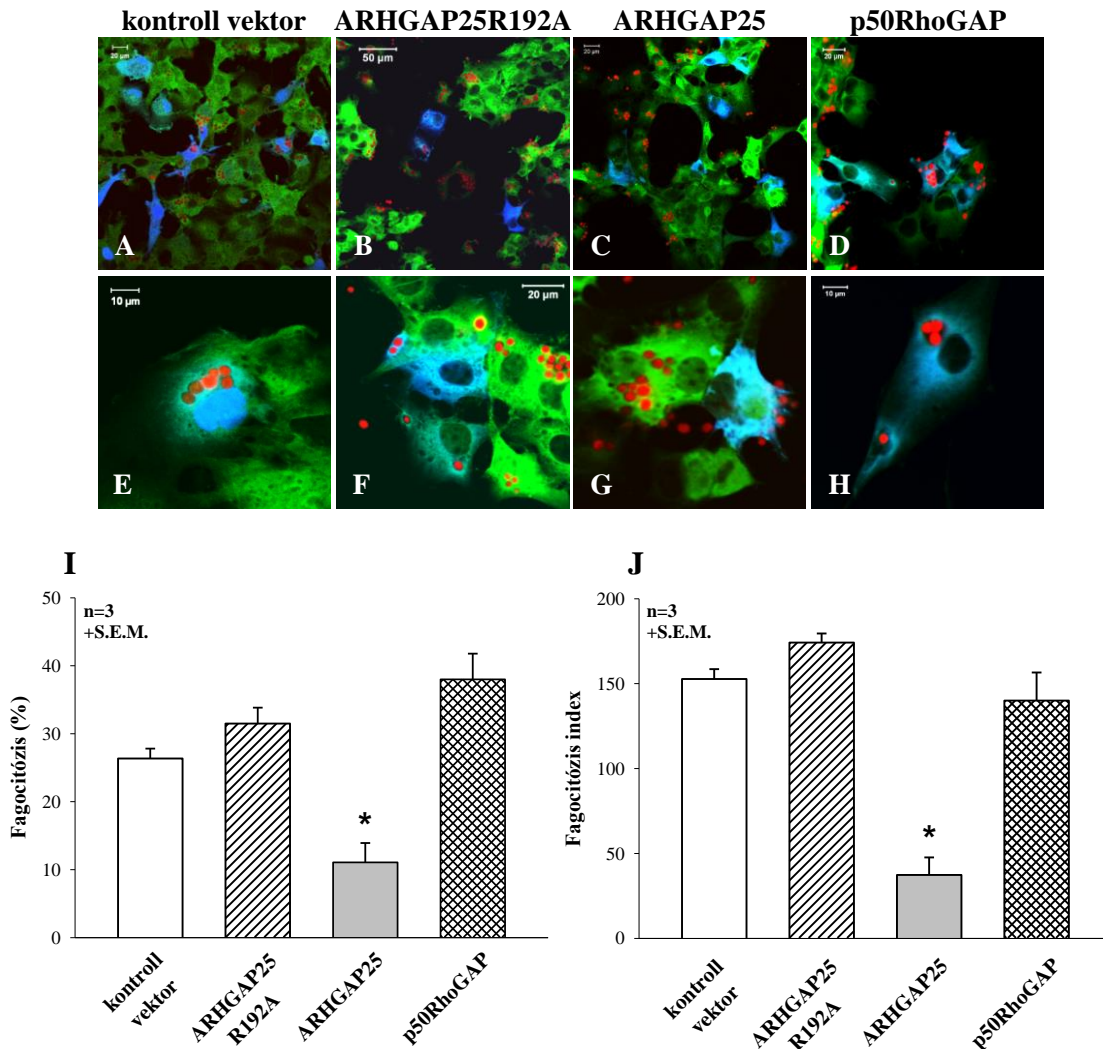
6.4 Az ARHGAP25 fagocitózisra gyakorolt hatásának vizsgálata

6.4.1 Az ARHGAP25 gátolja a fagocitózist COSphoxFcγR sejtekben

Elsőként a fentiekhez hasonló módon a túlexpresszált ARHGAP25 fagocitózisra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Ehhez olyan COSphoxFcγR sejt vonalat használtunk, melyet Dr. Mary Dinauer és munkatársai előzetesen stabilan transzfektáltak a fagocita oxidáz enzimszisztéma komponenseivel, illetve – a jelen kísérleti felállás szempontjából lényegesebb – FcγRIIa receptorral [243, 247].

Kísérleteink során kevert humán szérummal opsonizált, Cell Tracker Red fluoreszcens festékkel jelölt élesztőket adtunk a transzfektált sejtekhez, majd egy órással együtt inkubálást követően mikroszkóppal értékeltük az eredményeket. A 25. ábrán kék színnel láthatók a GAP-okkal transziensen transzfektált sejtek, piros színnel az élesztők. A zöld szín a minden sejtben stabilan expresszálandó p40^{phox} oxidáz komponenssel jelöli. A képeken jól látható, hogy a túlexpresszált CFP-ARHGAP25 gátolta a sejtek élesztő felvételét (25. ábra C, G). A funkcióvesztett mutáns CFP-ARHGAP25R192A kifejeződése nem befolyásolta a sejtek fagocitáló képességét (25. ábra B, F). Az inzerált nem tartalmazó (kontroll) vektorral transzfektált sejtek élesztő-felvételük nem károsodott (25. ábra A, E). Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, mennyire tekinthető specifikus szabályozó hatásnak az, amit az ARHGAP25 esetében láttunk, készítettünk olyan mintákat is, melyekben p50RhoGAP-pal transzfektáltuk a sejteket. Ezekben a mintákban az élesztők felvétele normálisan lezajlott, a p50-nek nem volt fagocitózist gátló hatása (25. ábra D, H), tehát az ARHGAP25 negatív szabályozó szerepe specifikus a folyamat során. A mikroszkópos képek kiértékelésekor megszámoztuk, hogy 100 db transzfektálódott sejtben hány db fagocitált kettő, vagy annál több élesztőt (fagocitózis % – 25. ábra I), illetve, hogy a 100 db transzfektálódott sejt összesen hány élesztőt fagocitált (fagocitózis index – 25. ábra J). Az eredmények statisztikailag is alátámasztották a konfokális mikroszkóppal tett megfigyeléseinket, miszerint az ARHGAP25 gátolta a COSPhoxFcγR sejtek élesztő-felvételét: a fagocitózis mintegy harmadára csökkent a kontrollhoz képest (25. ábra I, J). A mutáns ARHGAP25R192A nem volt képes gátolni a fagocitózist, amely arra utal, hogy az ARHGAP25 GTPáz aktiváló fehérjeként vesz részt a folyamat szabályozásában. A p50RhoGAP – amely

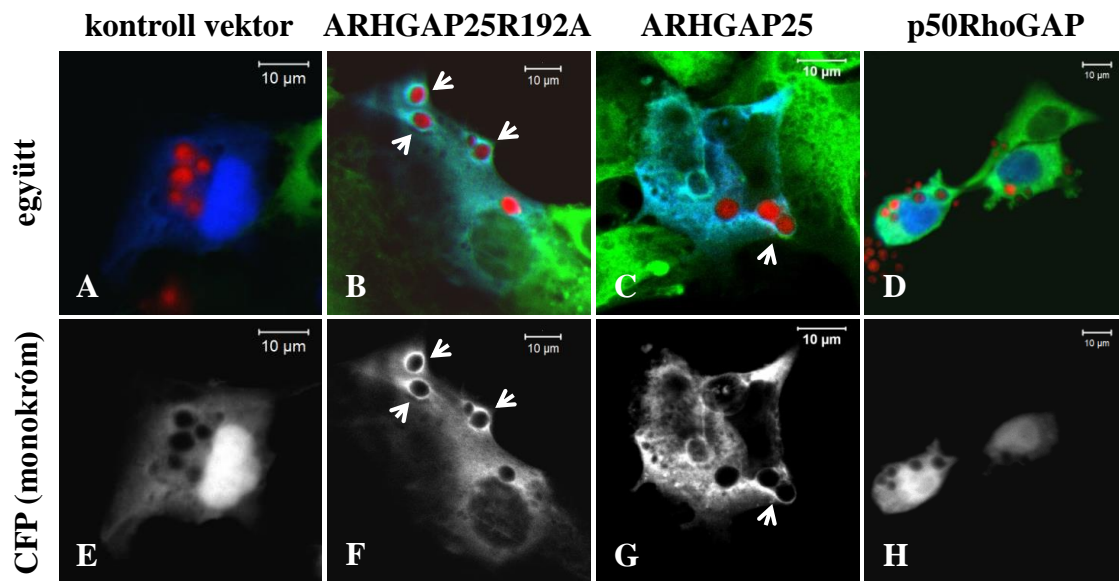
szintén képes szabályozni a Rac-ot – a fagocitózisra nincs hatással, ami az ARHGAP25 specifikus szerepét igazolja (25. ábra I, J).



25. ábra Fagocitózis vizsgálata COSphoxFc γ R sejtekben. Az opsonizált, fluoreszcensen jelölt élesztők felvétele a kontroll CFP vektorral (A, E), a funkcióvesztéses mutáns CFP-ARHGAP25R192A-val (B, F), valamint a CFP-p50RhoGAP-pal transzfektált sejtek esetében (D, H) zavartalan volt. A CFP-ARHGAP25 túlexpressziója gátolta az élesztők felvételét (C, G). Zöld: YFP-p40^{phox}; kék: transzfektált sejtek; piros: opsonizált, Cell Tracker Red-del jelölt élesztő. Az A-D sorozat nagyobb látóteret, az E-H sorozat egy-egy különálló sejtet mutat. I, J: A mikroszkópos eredmények statisztikai értékelése. Fagocitózis (%): 100 számolt sejtől hány fagocitált kettő, vagy több élesztőt (I). Fagocitózis index: 100 db sejt összesen hány élesztőt fagocitált (J). A grafikonokon három független kísérlet átlagát és hibáját (S.E.M.) ábrázoltuk. *: $p < 0,05$ a kontrollhoz képest; egyszempontos ANOVA, Tukey HSD teszt.

6.4.2 Fagocitózis során az ARHGAP25 kihelyeződik a fagoszóma membránhoz

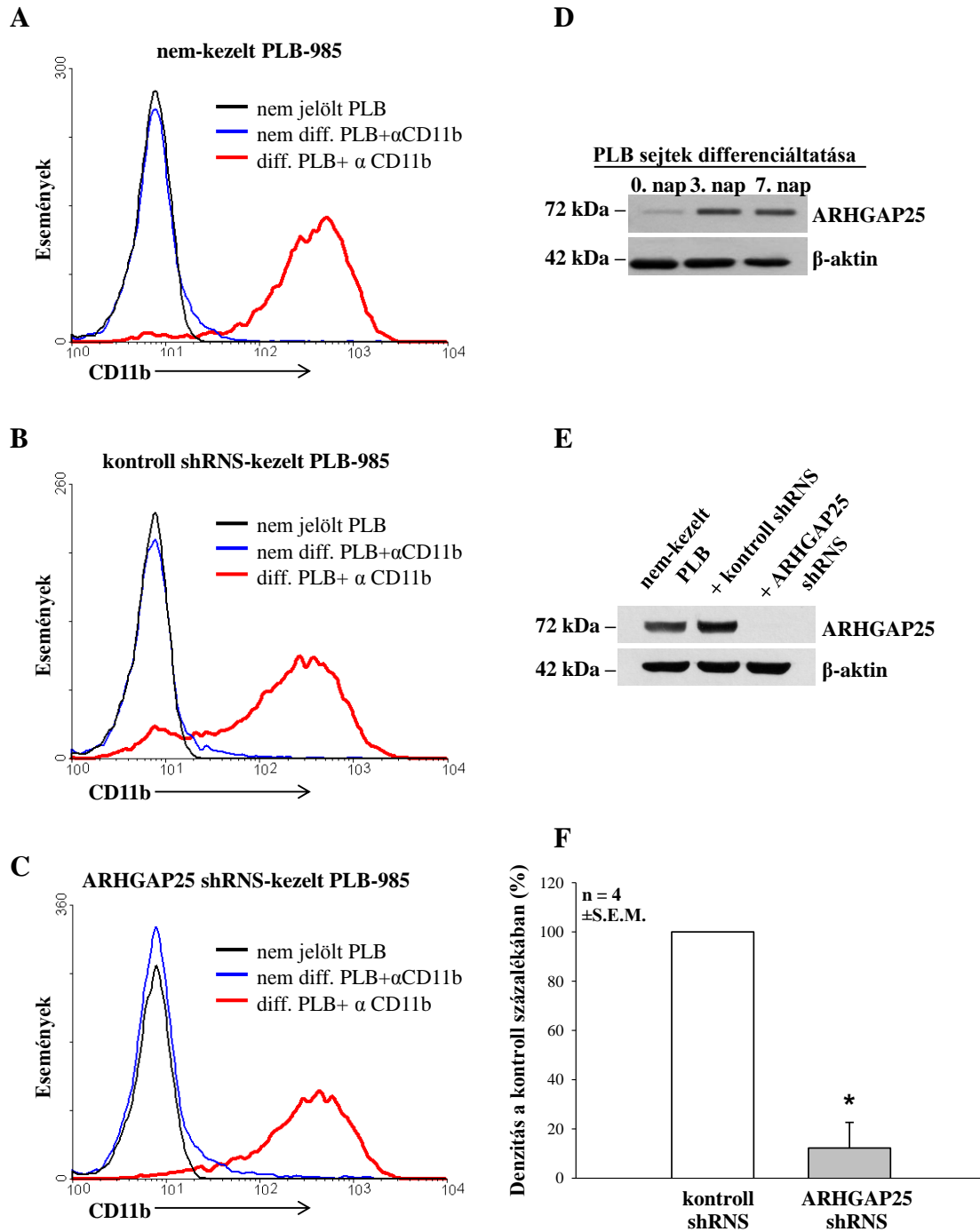
A COSphoxFcγR sejteken végzett fagocitózis tesztek során azt tapasztaltuk, hogy a funkcióvesztett mutáns CFP-ARHGAP25R192A a fagoszóma membránhoz transzlokálódik és ott dúsulást mutat (26. ábra B, F). Ugyanezen megfigyelést tettük a vad típusú fehérje esetében is: noha az ARHGAP25 túlexpressziója gátolja a fagocitózist, az esetek mintegy 10%-ában, amikor mégis történt élesztő felvétel, a vad típusú fehérje is a fagoszóma membrán közelében dúsult (26. ábra C, G). A kontroll CFP vektorral transzfektált sejtekben a lokalizációbeli változás nem volt megfigyelhető (26. ábra A, E). A CFP-p50RhoGAP ugyancsak megtartotta diffúz, citoplazmatikus elhelyezkedését a fagocitózis során, a fagoszóma felé történő kihelyeződése nem volt megfigyelhető (26. ábra D, H).



26. ábra: A COSphoxFcγR sejtek élesztő-fagocitózisa során az ARHGAP25 kihelyeződik a fagoszóma membránhoz. A funkcióvesztett mutáns CFP-ARHGAP25R192A (B, F) és a vad típusú CFP-ARHGAP25 (C, G) dúsulását figyeltük meg a fagoszóma membrán körül, opsonizált, fluoreszcens élesztő felvételét követően. A kontroll CFP vektorral (A, E), illetve a CFP-p50RhoGAP-pal (D, H) transzfektált COSphoxFcγR sejtek esetében a lokalizációbeli változás nem volt megfigyelhető. Zöld: YFP-p40^{phox}, kék/fehér: transzfektált sejtek; piros: opsonizált, Cell tracker Red-del jelölt élesztő. E-H: A transzfektált sejtek monokromatikus képe.

6.4.3 Az ARHGAP25 csendesítése PLB-985 sejtekben

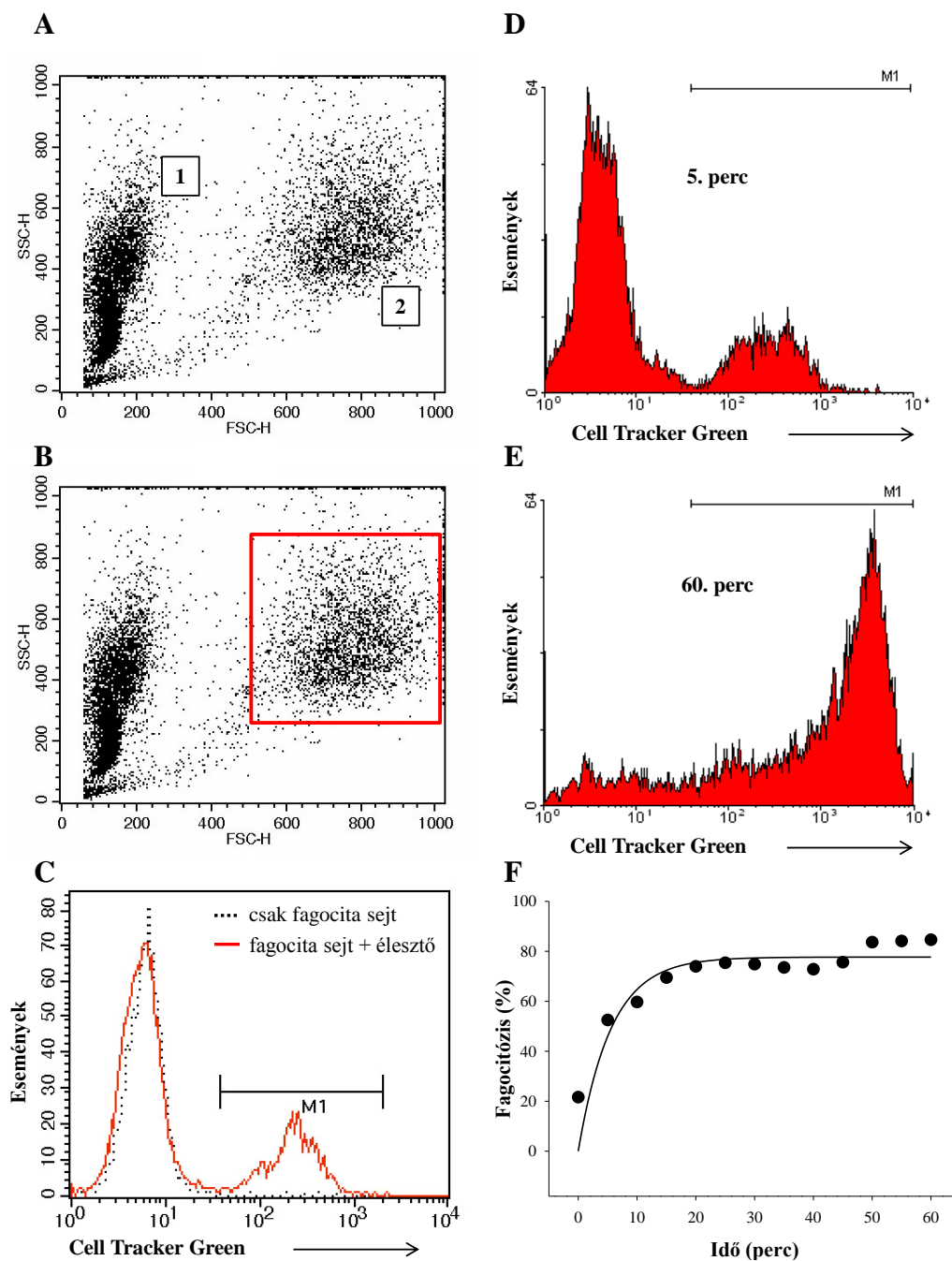
A további kísérletek során olyan PLB-985 sejtklónokat vizsgáltunk, melyekben a Módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően shRNS-sel csendesítettük az ARHGAP25 gént. Kontrollként olyan PLB-985 sejteket alkalmaztunk, melyeket a hatékony shRNS szekvencia minimális módosítását tartalmazó változatával transzfektáltunk. A kísérletekhez a Módszerek fejezetben leírtak szerint differenciált sejteket használtunk. A hét napos differenciáció során az ARHGAP25 fehérje mennyisége fokozódott a nem differenciált sejtekhez (0. nap) képest (27. ábra D). A differenciáció sikerességét áramlási citométerrel (27. ábra A-C), az shRNS csendesítés hatékonyságát western blottal ellenőriztük (27. ábra E). A PLB-985 sejtek neutrofil irányú differenciációjának markere a CD11b sejt felszíni expressziójának növekedése [36], amely a citometriás eredményeken jól látható. A nem differenciált sejtek (27. ábra A-C, kék hisztogram) ugyanolyan jelet adtak, mint az ellenanyaggal nem jelölt sejtek (27. ábra A-C, fekete görbe), esetükben tehát nem volt detektálható mennyiségű CD11b a sejt felszínen. Ehhez képest a differenciáció után az expresszió szignifikánsan nőtt (27. ábra A-C, piros görbe). A grafikonokról az is leolvasható, hogy az shRNS kezelés nem befolyásolta a CD11b expressziót: a differenciálódás és a CD11b expresszió-növekedés mind a kontroll sejtekben (27. ábra B), mind a hatékony shRNS-sel kezelt sejtekben (27. ábra C) létrejött. A géncsökkentés hatékonyságáról western blottal győződünk meg (27. ábra E). A hatékony shRNS kezelés hatására az ARHGAP25 fehérje mennyisége látványosan csökkent a kontroll shRNS-sel kezelt sejtekhez képest. Ugyanakkor a kontroll shRNS kezelés nem okozott változást az ARHGAP25 mennyiségében a nem kezelt sejtekhez képest (27. ábra E). Az eredmények számszerűsítése érdekében elvégeztük négy független western blot kísérlet denzitometriás elemzését. Ezek alapján az shRNS kezelés után az ARHGAP25-nek kevesebb, mint 20%-a maradt a sejtekben a kontroll shRNS-sel kezelt sejtekhez képest (27. ábra F).



27. ábra: A differenciáció és az ARHGAP25 shRNS kezelés hatékonyságának vizsgálata PLB-985 sejteken. A-C: A CD11b differenciációs marker sejt felszíni expressziójának áramlási citometriás vizsgálata nem kezelt (A), kontroll shRNS-sel kezelt (B), illetve hatékony shRNS-sel kezelt PLB-985 sejteken (C). CD11b csak a differenciált sejteken jelenik meg, expresszióját az shRNS kezelés nem befolyásolja. D: A hét napos differenciáció alatt növekszik az ARHGAP25 fehérje mennyisége. E: Az shRNS kezelés hatékonyságának vizsgálata western blottal. A kísérletek során nem kezelt, kontroll shRNS-sel, illetve ARHGAP25-specifikus shRNS-sel kezelt PLB-985 sejtek teljes sejt lizátumában vizsgáltuk az ARHGAP25 mennyiségét. Az előhívást anti-coiled coil ellenanyaggal végeztük. Töltéskontrollként β -aktint használtunk. F: négy független western blot kísérlet denzitometriás elemzése. Az F grafikonon a kísérletek átlagát és hibáját (S.E.M.) ábrázoltuk. *: $p < 0,05$ a kontrollhoz képest; egymintás t-próba.

6.4.4 A fagocitózis mérése áramlási citometriával

A géncsendesített sejtek fagocitózisának mérésére beállítottunk egy áramlási citometrián alapuló módszert, melynek segítségével gyorsan, nagy elemszámmal lehet vizsgálni fluoreszcens részecskék felvételét (lásd még: 5.10. fejezet). A citometriában a méret jellemzésére az előre irányuló fényszórás (FSC), a granuláltság mérésére pedig az oldalirányú fényszórás (SSC) szolgál. Ezen két paramétert vizsgálva jól elkülöníthetők a fagociták és a szabad élesztő részecskék. Az élesztők kisméretűek, az úgynevezett „dot-plot” diagram bal oldalán található (28. ábra A/1). Ezzel szemben a fagocita sejtek nagyobb méretűknél és granuláltságuknál fogva jobbra, fölfelé eltolódó populációt képeznek (28. ábra A/2). Ez utóbbi egy kevert sejthalmaz: tartalmaz élesztőt nem fagocitált sejteket, valamint olyan sejteket is, amelyek egy, vagy több élesztőt bekebeleztek be. Az, hogy ez a populáció FSC-SSC szerint mennyire homogén, illetve mennyire különíthető el a fagocitált és nem fagocitált sejtektől, nagymértékben függ az alkalmazott sejttípustól, sejtvonaltól. Annak érdekében, hogy biztosan meg tudjuk különböztetni az élesztőt tartalmazó és a nem fagocitált sejteket, az élesztőket fluoreszcens festékkel jelöltük. A „dot-plot” diagramon kikapuztuk a fagocita populációt (28. ábra A/2, B), majd a kapuzott sejtekre jellemző fluoreszcenciát hisztogramon ábrázoltuk (28. ábra C). A hisztogram jellegzetes, kétszcúcsú eloszlást mutatott: az alacsony fluoreszcencia-értéket képviselő bal oldali csúcs jelöli a nem fagocitáló sejteket, míg a jobbra tolódott csúcs mutatja azon sejteket, melyek fluoreszcenciája a bekebelezett élesztők miatt megnövekedett. Ezt a hisztogram-területet egy úgynevezett markerrel (M1) megjelölve kiszámolhatjuk a fagocitáló sejtek százalékos arányát (28. ábra C), amelyet aztán oszlopdíagramon ábrázolhatunk (29-30. ábrák). A módszer lehetőséget ad arra is, hogy időben kövessük a fagocitózis folyamatát (28. ábra D-F). Ennek során adott időpontokban mintát veszünk a fagocita sejt – élesztő keverékből és a mintát a bemutatott módon lemérjük. A 28. ábra D részén látható, hogy 5 perc után a sejteknek csak kis része fagocitált (M1 marker), nagyobb részük még az autofluoreszcenciájának megfelelő tartományba esik, azaz fluoreszcens élesztőt nem tartalmaz. Hatvan perc után az arány jelentősen megváltozik, a sejteknek mintegy 60-80%-a fagocitált egy, vagy több élesztőt, minek következtében a hisztogram jobbra tolódott (28. ábra E).



28. ábra: Fagocitózis mérése áramlási citometriával. Az élesztő részecskék (1) és a fagocita sejtek (2) méret és granulátság alapján jól elkülöníthetők (A). Fluoreszcens élesztőt alkalmazva és a fagocita sejteket kikapuzva (B) vizsgálhatjuk a sejtekre jellemző fluoreszcenciát (C). Az M1 marker jelöli a fluoreszcens élesztőt fagocitált sejtekre jellemző hisztogramszakaszt, illetve kiszámolható az M1-gyel jelölt hisztogramrészbe tartozó sejtek százalékos aránya. Az A-C reprezentatív eredmények P388-D1 egér makrofág sejtvonalon készültek. A módszer segítségével kinetikai mérések is végezhetők (D-F). A PLB-985 sejteken végzett kinetikai mérések szerint ezen sejtek fagocitózisa mintegy 20 perc után telítésbe megy. FSC-H: előre irányuló fényszórás – arányos a sejt mérettel; SSC-H: oldalirányú fényszórás – arányos a granuláltsággal. M1: a statisztikai értékelésre kiválasztott hisztogramszakasz kijelölésére szolgáló marker.

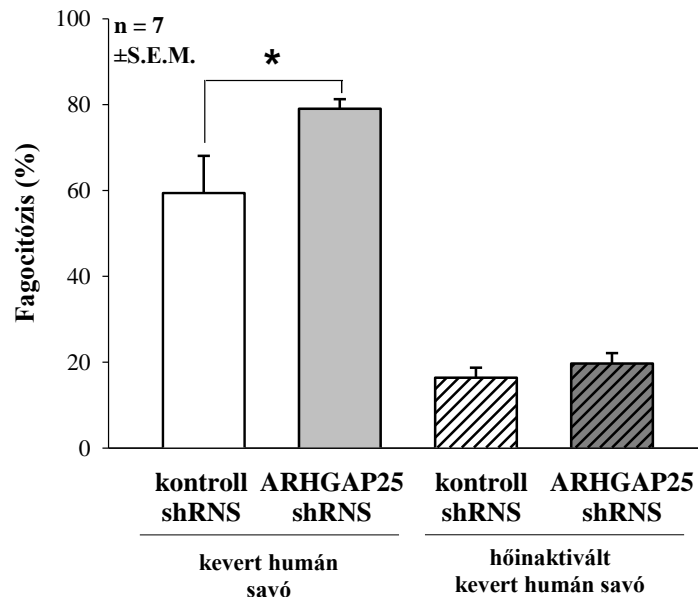
A PLB-985 sejteken végzett fagocitózis kinetikai mérés eredményeit ábrázolva megfigyelhető, hogy a fagocitózis 20 perc után telítésbe megy (28. ábra F). Ebből kiindulva a további fagocitózis kísérletekben 10 percig inkubáltuk együtt az élesztőket a PLB-985 sejtekkel. Ez az időpont a telítési görbe felszálló, lineáris szakaszára esik, így a fagocitózisban bekövetkező változások jobban követhetők, mintha a telítési szakaszban mérnénk. A citometriás fagocitózis mérések során tehát az élesztők bekebelezéséből adódó fluoreszcencia-növekedést detektáljuk.

Abban az esetben, ha a fagocitózis folyamata lassú, találunk olyan sejteket is, amelyek már megkötötték a felszínükön a bekebelezésre váró részecskéket, de azok még nem kerültek be a sejtekbe. Ezek a kötött élesztők ugyanúgy fluoreszcencia-növekedést okoznak, mint a már bekebelezettek, így a fagocitózis mértékét – hibásan – eltolják. Ennek kiküszöbölésére az úgynevezett quench-elést alkalmaztuk, amikor is a lezajlott fagocitózis után a sejt-élesztő keveréket tripán kék oldatban szuszpendáltuk (lásd: Módszerek fejezet). A tripán kék festék kioltja a be nem kebelezett élesztők fluoreszcenciáját, így már csak a ténylegesen felvételre került élesztőket mérjük. A PLB-985 sejtek esetében a 10 perces együtt inkubálás alatt a megkötött élesztők nagy része felvételre került, membránhoz kötve csak elhanyagolhatóan kis százalékukat találtuk (nem ábrázolt adat).

6.4.5 Az ARHGAP25 csendesítés fokozza a PLB-985 sejtek és a primer humán makrofágok fagocitózisát

Az előbb leírt módszer segítségével vizsgáltuk az ARHGAP25-csendesített PLB-985 sejtek élesztő felvételét. Az élesztőket a Módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően kétféle módon opsonizáltuk. Egyik esetben kevert humán savót alkalmaztunk, másik esetben pedig hőinaktivált kevert humán savót. Előbbiben a komplementrendszer elemei képezik az opsoninek jelentős hányadát, utóbbiban épp ezen enzimrendszert inaktíváljuk, melynek eredményeként opsonizáló ágensként főként ellenanyagok maradnak a szérumban. Teljes kevert savóval tehát a mintázatfelismerő-, komplement-, és Fc receptorok együttes szerepét tudjuk vizsgálni, hőinaktivált savót alkalmazva viszont elsődlegesen a mintázatfelismerő-, és Fc receptorokon keresztül zajlik fagocitózis. A kísérletek során ARHGAP25-csendesített,

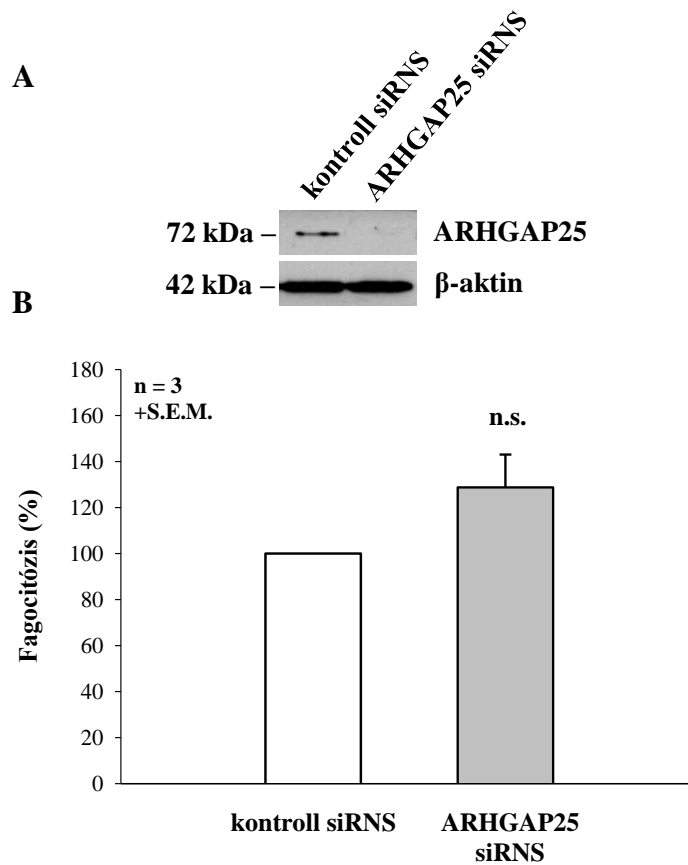
illetve kontroll shRNS-sel kezelt PLB-985 sejtklonokat alkalmaztunk. A 29. ábrán hét független citométeres mérés eredménye látható. A kontroll shRNS-sel kezelt sejteknek mintegy 60%-a fagocitált egy, vagy több, kevert savóval opsonizált élesztőt. Ehhez képest az ARHGAP25 csendesítése szignifikáns – körülbelül 20%-os – növekedést okozott a fagocitózisban. Abban az esetben, ha hőinaktivált kevert humán savóval opsonizáltuk az élesztőket, a fagocitózis hatékonysága nagymértékben csökkent: a kontroll sejteknek mindössze 20%-a fagocitált. Az ARHGAP25 csendesítése ebben az esetben is fokozta a PLB-985 sejtek élesztő felvételét, a különbség azonban nem volt szignifikáns (29. ábra).



29. ábra: Az ARHGAP25 csendesítése fokozza a kevert humán savóval opsonizált élesztők felvételét PLB-985 sejtekben. A PLB-985 sejteket stabilan transzfektáltuk ARHGAP25-specifikus, illetve kontroll shRNS-sel. A Cell Tracker Green-nel jelzett élesztőket kevert humán savóval, vagy hőinaktivált kevert savóval opsonizáltuk. A fagocitózist áramlási citométerrel mértük. Csak abban az esetben tapasztaltunk szignifikáns különbséget a csendesített és kontroll sejtek fagocitózisa között, ha kevert humán szérummal opsonizált élesztőket adtunk a sejtekhez. A hőinaktivált savóval opsonizált élesztők fagocitózisának hatékonysága jelentősen lecsökken, de az ARHGAP25 csendesítés kis mértékben így is fokozta a PLB-985 sejtek élesztő felvételét. A grafikonon hét független kísérlet átlagát és hibáját (S.E.M.) ábrázoltuk. *: $p < 0,05$ a kontrollhoz képest; kétszemponos ANOVA, Tukey HSD teszt.

Az ARHGAP25 fagocitózisban tapasztalt szerepét meg kívántuk erősíteni primer sejteken is. Ehhez perifériás vérből monocitákat izoláltunk, majd a Módszerek

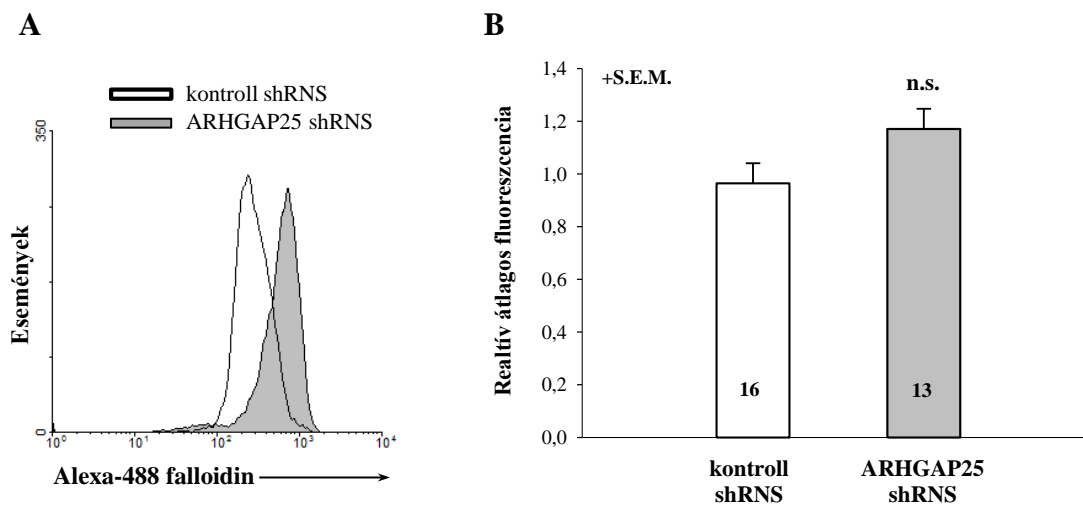
fejezetben leírtaknak megfelelően makrofággá differenciáltattuk őket. A differenciációt követően ARHGAP25-specifikus, illetve kontroll siRNS-sel kezeltük a sejteket. A fagocitózis kísérletet a 5.10. fejezetben leírtak szerint végeztük. A 30. ábrán látható western blot mutatja az siRNS kezelés hatékonyságát: az ARHGAP25 mennyisége jelentős mértékben csökkent a kontroll sejtekhez képest. A 30. ábra oszlopdiagramja szerint az ARHGAP25 csendesítése primer makrofágokban mintegy 30%-kal fokozta a fagocitózist.



30. ábra: ARHGAP25-csengesítése fokozza a primer humán makrofágok élesztő-felvételét. A humán monocitából M-CSF-fel, egy hétig differenciáltatott makrofágokat ARHGAP25-specifikus és kontroll siRNS-sel kezeltük. Az siRNS kezelés hatékonyságát teljes sejt lizátumokból készült western blottal, anti-coiled coil ellenanyaggal ellenőriztük. Töltéskontrollként β -aktint használtunk (A). A Cell Tracker Green-nel jelzett élesztőket kevert humán savóval opsonizáltuk. A fagocitózist áramlási citométerrel értékeltük. A kapott adatokat a kontrollra normalizáltuk. Három független fagocitózis kísérlet átlagát és hibáját (S.E.M.) ábrázoltuk (B). n.s.: nem szignifikáns a kontrollhoz képest; egymintás t-próba.

6.5 Az ARHGAP25 az aktin-átrendeződés lehetséges szabályozója

A fagocitózishoz elengedhetetlen a megfelelő aktin-citoszkeleton átrendeződés, melyben kulcsszerepet játszik a Rac kis G fehérje is [102]. Ennek tükrében megvizsgáltuk, hogy az ARHGAP25-nek van-e valamilyen hatása a sejtek filamentáris aktin (f-aktin) hálózatára. A kísérletek során az ARHGAP25 csendesített, illetve kontroll shRNS-sel kezelt PLB-985 sejtek f-aktin mennyiségét áramlási citométerrel mértük. Amint a 31. ábra A részén látható reprezentatív mérési eredmény mutatja, az ARHGAP25 gén csendesítése fokozott f-aktin mennyiséget eredményezett a PLB-985 sejtekben. A statisztikai elemzés során 16 (kontroll sejtek), illetve 13 (ARHGAP25-csendesített sejtek) független kísérletet kiértékelve növekvő tendenciát tapasztaltunk a filamentáris aktin mennyiségében, noha a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns (31. ábra B).



31. ábra: Az ARHGAP25-specifikus shRNS kezelés fokozta a filamentáris aktin mennyiségét PLB-985 sejtekben. A kísérlet során stabilan transzfektált, nem stimulált PLB-985 sejteket alkalmaztunk, a filamentáris aktint Alexa-488 falloidinnel jelöltük. A méréseket áramlási citométerrel végeztük. **A:** Egyetlen citometriás mérést bemutató, reprezentatív ábra. **B:** Tizenhat (kontroll), illetve tizenhárom (ARHGAP25-csendesített) független kísérlet átlaga és hibája (S.E.M.). n.s.: nem szignifikáns a kontrollhoz képest; egyszempontos ANOVA.

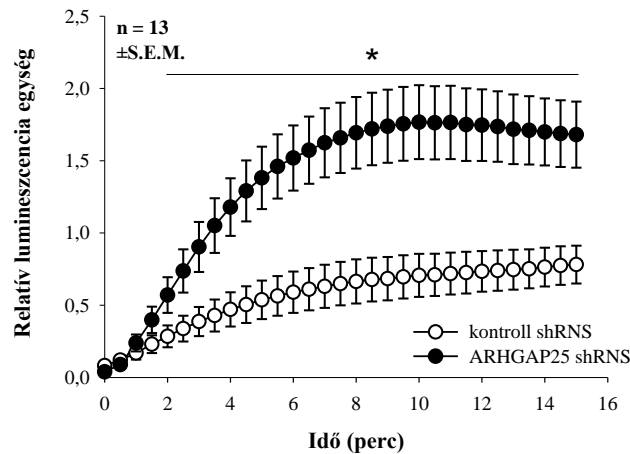
6.6 Szuperoxid termelés mérése ARHGAP25-csendesített PLB-985 sejteken

A szuperoxid termelés vizsgálata során opszonizált zymozant (gombák felszínén található glükán, mely opszonizálás nélkül mintázatfelismerő receptorokhoz [TLR2] képes kötődni), vagy PMA stimulust alkalmaztunk. Abban az esetben, ha teljes kevert savóval opszonizált zymozant adtunk a sejtekhez, az ARHGAP25-csendesített sejtek fokozott szuperoxid termeléssel válaszoltak. Tizenhárom független kísérlet eredménye alapján a szuperoxid termelés sebessége mintegy háromszorosa volt a kontroll sejtekének (32. ábra A). Abban az esetben, ha hőinaktivált savóval opszonizáltuk a zymozant, mielőtt a sejtekhez adtuk, a szuperoxid termelés mértéke elmaradt a kevert savóval opszonizált zymozanhoz képest. A sejtek csak mintegy 5 percnyi latencia után kezdtek el szuperoxidot termelni, és a csendesített és kontroll sejtek között nem volt szignifikáns különbség (32. ábra B).

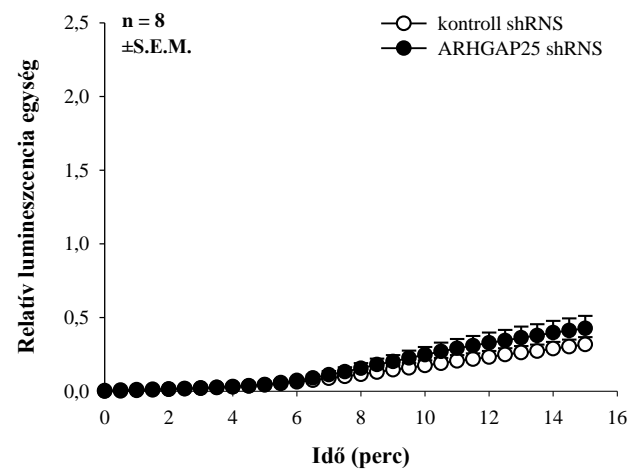
Fontos megjegyeznünk, hogy opszonizált zymozan stimulust alkalmazva a sejteknek először be kell kebeleznünk a zymozan részecskéket, majd ezt követően mérjük az intra- és extracelluláris térben a szuperoxid termelést. Ahogy a 6.4.5. fejezetben leírtam, az opszonizálás módja (normál, vagy hőinaktivált savó) nagymértékben befolyásolja a fagocitózis hatékonyságát (lásd még 29. ábra). Ez alapján feltételezzük, hogy a kevert savóval opszonizált zymozan esetében a csendesített sejteknél kimutatott fokozott fagocitózis lehet a magyarázata a megnövekedett szuperoxid termelésnek.

A PMA a protein kináz C-n keresztül számos sejt választ képes aktiválni, így szuperoxid termelés kiváltására is alkalmas. Kilenc független kísérletet elemezve úgy találtuk, hogy a PMA-val stimulált, ARHGAP25-csendesített PLB-985 sejtek és a kontroll sejtek szuperoxid termelése között nem volt szignifikáns különbség (32. ábra C). Ezen megfigyelés arra utal, hogy az ARHGAP25 valószínűleg nem közvetlenül vesz részt a szuperoxid termelés szabályozásában.

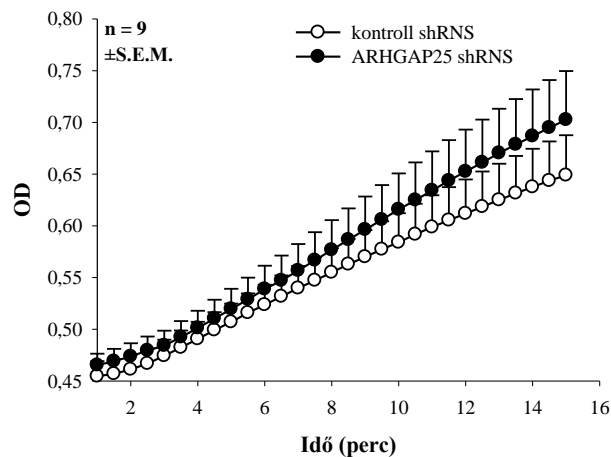
A



B



C



32. ábra: ARHGAP25-csendesített PLB-985 sejtek szuperoxid termelése. **A:** kevert humán szérummal opsonizált zymozannal stimulálva; **B:** hőinaktivált humán szérummal opsonizált zymozannal stimulálva; **C:** PMA-val stimulálva. Az **A** és **B** esetben a fagoszómális szuperoxid termelést lumineszcenciás módszerrel mértük, a **C** esetben pedig az extracelluláris szuperoxid termelést, citokróm c redukcióján alapuló módszerrel vizsgáltuk. ○: kontroll shRNS-sel kezelt sejtek; ●: ARHGAP25-specifikus shRNS-sel kezelt sejtek. A grafikonokon a független kísérletek átlagát és hibáját (S.E.M.) ábrázoltuk. Az **A** ábrán a vízszintes vonal alatti pontok szignifikánsan különböznek a kontrolltól. *: $p < 0,05$ a kontrollhoz képest; kétszemponos ANOVA.

7 Megbeszélés

Ahogy a bevezetőben igyekeztem bemutatni, a neutrofil funkciók szabályozásának elengedhetetlen komponensei a kis G-fehérjék, ezen belül is a Rho családba tartozó monomer GTPázok. Működésüket jellemzi a GDP/GTP cserén alapuló „molekuláris kapcsoló” funkciójuk, a GTP lassú hidrolízise, valamint az őket szabályozó GEF-ek és GAP-ok térben és időben összehangolt működése. E két fehérje kis G-fehérjékre kifejtett együttes hatása határozza meg, hogy az adott szignál-transzdukció lezajlik, vagy jelterminációba fordul. A GEF-ekről viszonylag sok irodalmi adat áll rendelkezésre, azt azonban még ma sem tudjuk pontosan, hogy a közel 70 Rac/RhoGAP milyen szöveti expressziós mintázatot mutat, illetve miként oszlanak meg az egyes jelátviteli útvonalakban. Ph.D.-munkám egyik részében nyilvános internetes adatbázisokat elemezve igyekeztem feltárni a Rac/RhoGAP-ok szöveti megoszlását. Ehhez összeállítottunk egy táblázatot, melyben 75 humán Rac/RhoGAP elnevezéseit gyűjtöttük össze (a GAP-ok nevezéktana rendkívül diverz, ami megnehezíti a publikációkban, vagy adatbázisokban történő azonosításukat). Ezt követően vizsgáltuk a Rac/RhoGAP-ok expressziós mintázatát, melyet terjedelmi okokból (a táblázatok mérete miatt) csak érintőlegesen mutatok be a dolgozatban (4. táblázat).

Ph.D.-munkám másik részében – mely jelen dolgozat fő témáját képezi – egy új, eddig még nem vizsgált, főként fehérvérsejtekben kifejeződő GTPáz aktiváló fehérje, az ARHGAP25 neutrofil funkciókban betöltött szerepét vizsgáltam.

Elsőként klónoztuk meg és fejeztük ki a teljes hosszúságú ARHGAP25 fehérjét, illetve elkészítettük különböző, GST-fúziós fragmentjeit (21. ábra). A rekombináns coiled-coil doménnel nyulakat immunizáltunk és ARHGAP25-specifikus, tisztított ellenanyagot állítottunk elő (19. ábra, 27. ábra E, 30. ábra A). A tisztított ellenanyag segítségével kimutattuk az ARHGAP25-öt a főbb fehérvérsejt típusokban (20. ábra), ezzel az eddig neutrofilekben fehérje szinten azonosított Rac/RhoGAP-ok száma ötről hatra emelkedett [204, 207, 209]. A primer sejtek mellett kimutattuk az ARHGAP25-öt a későbbiekben modellsejtvonalként használt PLB-985-ben (27. ábra D, E), valamint megfigyeltük, hogy a neutrofil irányú differenciáltatás során az ARHGAP25 mennyiségi növekedést mutat a PLB-985 sejtekben (27. ábra D). Másik modellünkben, a COS7 (illetve COSPhoxFcγR) sejtekben a fehérje endogén módon nem volt jelen (23. ábra A).

A rekombináns fehérje-fragmenseket használva *in vitro* körülmények között megvizsgáltuk az ARHGA25 Rho GTPáz specificitását. Azt tapasztaltuk, hogy az ARHGAP25 csak a Rac-ot képes szabályozni, a Cdc42-re és a Rho-ra nem volt hatással (22. ábra). Ezen tulajdonságában eltér a bevezetőben bemutatott Bcr-tól, p50RhoGAP-tól és p190RhoGAP-tól, melyekről bebizonyosodott, hogy több Rho családba tartozó kis G-fehérjét is képesek szabályozni [50, 212, 217]. Kísérleteinkben a teljes hosszúságú ARHGAP25 és a GAP-domént tartalmazó fragmensei hasonló GAP-aktivitást mutattak (22. ábra A), ami arra utal, hogy – szemben néhány más Rac/RhoGAP-pal – az ARHGAP25 molekulán belül valószínűleg nincs a GAP-aktivitást gátló autoinhibitoros mechanizmus [50, 248-250]. Ezek mellett meghatároztuk a GAP-aktivitásért felelős, evolúciósan konzervált arginin helyzetét, amely a 192. aminosav-pozícióra tehető (21. ábra). Tényleges szerepét alaninra történő mutációját követően, *in vitro* GAP-aktivitás méréssel igazoltuk (22. ábra B).

A funkcióvesztett arginin-mutáns ARHGAP25R192A-t a továbbiakban sejtes kísérleti rendszerekben alkalmaztuk. Megfigyeléseink szerint a vad típusú teljes hosszúságú, és az arginin-mutáns CFP-ARHGAP25 egyaránt diffúz, citoplazmatikus lokalizációt mutatott COS7 sejtekben, és mindkét fehérje esetében részleges kolokalizációt fedeztünk fel az endogén Rac-kal, amely az ARHGAP25 és a Rac együttműködésére utalhat. A konzervált arginin mutációja nem okozott lokalizációbeli eltéréseket a vad típushoz képest (23. ábra C). A Rac jelátviteléhez köthető membránfodrozódást indukálva a transzfektált COS7 sejtekben az *in vitro* GAP-aktivitás méréssel egybehangzó eredményeket kaptunk. A vad típusú CFP-ARHGAP25 képes volt inaktiválni az endogén Rac-ot, a funkcióvesztett mutáns CFP-ARHGAP25R192A nem (24. ábra). A mutáns ARHGAP25-tel transzfektált COS7 sejtekben még kis mértékben fokozódott is a membránfodrozódás a kontroll sejtekhez képest. Ennek magyarázata az lehet, hogy az ARHGAP25R192A csupán GAP aktivitását veszítette el, de ettől függetlenül kapcsolódni tud a GTP-t kötött aktív Rac-hoz, inaktiválni azonban nem képes. A bekötődött mutáns GAP miatt ugyanakkor más GAP-ok nem férnek hozzá a Rac-hoz, így a GTP hidrolízis jóval lassabb, tovább marad aktív állapotban a Rac, ami magyarázhatja az enyhén fokozott membránfodrozódást (24. ábra D).

Az ARHGAP25 funkciójára irányuló vizsgálatainkat két modell sejtvonalon, valamint humán primer makrofágokon végeztük. A COSPhoxFc γ R sejtek kifejezik a fagocita oxidáz összes alegységét, valamint az Fc γ RIIa receptort (mely meghatározó ezen sejtek fagocitáló képességét illetően), azonban nem expresszálnak endogén ARHGAP25-öt (23. ábra A). A COSPhoxFc γ R sejtekben túlexpresszált ARHGAP25 szignifikánsan csökkentette a kevert humán szérummal opsonizált élesztők fagocitózist a kontroll vektorral transzfektált sejtekhez képest (25. ábra). Ehhez képest, ha a funkcióvesztett mutáns ARHGAP25R192A-t fejeztük ki a sejtekben, azt tapasztaltuk, hogy az ARHGAP25 fagocitózist gátló hatása megszűnt (25. ábra). Ez a kísérlet bizonyítja, hogy az ARHGAP25 GTPáz aktiváló hatásán keresztül szabályozza a fagocitózist. Abban az esetben, ha egy másik Rac/RhoGAP-ot (jelen esetben a p50RhoGAP-ot) fejeztünk ki a sejtekben, melyről bebizonyosodott, hogy ugyancsak képes a Rac-ot szabályozni [204] (24. ábra D, H, I), nem tapasztaltunk változást a fagocitózistban (25. ábra). Számos kutató meggyőződése, hogy mindegy, melyik RacGAP-ot expresszáljuk az adott sejtes kísérleti rendszerben, mindegyik hatással lesz a vizsgált funkcióra, hiszen mindegyik egyaránt képes szabályozni a folyamatban részt vevő Rac-ot. Ezzel szemben a mi megfigyeléseink a másik „tábor” nézeteit támasztják alá, miszerint a GAP-ok specifikus molekuláris környezetben működnek, ezért – noha ugyanúgy az adott kis G-fehérjét szabályozzák – működésük egy-egy jelátviteli útvonalra, egy-egy funkció, vagy részfolyamat szabályozására korlátozódik.

Másik sejtes modellünk a PLB-985 sejtvonal volt, melyben az endogén ARHGAP25-öt stabil shRNS transzfekcióval lecsendesítettük (27. ábra D, E, F). Annak érdekében, hogy a fagocitózist hatékonyan, nagy elemszámmal tudjuk vizsgálni, a kísérleteket megelőzően beállítottunk egy áramlási citometrián alapuló módszert (28. ábra). Már a 80-as években léteztek kísérleti technikák baktériumok, zymozan, vagy mikrogyöngyök, illetve élesztő sejtek fagocitózisának citométeres mérésére [251-254]. Mi ezek közül a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőt alkalmaztuk, melynek nagy előnye költséghatékony, egyszerű kezelhetősége, valamint az, hogy könnyedén jelölhető Cell Tracker fluoreszcens festékekkel. A Cell Tracker festékek széles színskálája elérhető, jól alkalmazható fluoreszcens mikroszkópos, valamint áramlási citometriás mérések során. Kísérleteinkben nem tapasztaltuk, hogy a festék kidiffundált volna a hóvel előtt

élesztőkből, ezzel aspecifikus festődést okozva a fagocitákon, ahogy azt sem, hogy fluoreszcenciája változott volna a mérés ideje alatt.

Az így jelölt élesztőket használva azt figyeltük meg, hogy az ARHGAP25-csendesítés hatására fokozódott a PLB-985 sejtek élesztő felvétele (29. ábra). Ugyancsak növekedést tapasztaltunk az ARHGAP25-csendesített PLB-985 sejtek fagocitózist követő szuperoxid-termelésében is (32. ábra A). Az Fc receptoron keresztüli fagocitózist és szuperoxid-termelést vizsgálva a PLB-985 sejtek nagyon kis hatékonyságát tapasztaltunk, és a fent megfigyelt különbségek elmaradtak (29. ábra, 32. ábra B). Pivot-Pajot és munkatársai kimutatták, hogy a dimetil formamiddal neutrofil irányba differenciáltatott PLB-985 sejtvonal a neutrofil granulocitákhoz képest kevesebb Fc γ RIIa (CD32a) receptort expresszál, Fc γ RIII (CD16b) receptor pedig nincs jelen a felszínén [255]. Ezen megfigyeléseket saját mérési eredményeink is alátámasztották (nem ábrázolt adat). Az alacsony Fc γ R expresszió magyarázatul szolgálhat a hőinaktivált savóval opsonizált élesztők esetében tapasztalt csökkent fagocitózisa és csökkent szuperoxid termelésre, ugyanakkor valószínűsíti, hogy a fenti folyamatok elsősorban komplement-mediált útvonalon mennek végbe. Ezen ismeretek tekintetében az ARHGAP25-csendesített PLB-985 sejtek fagocitózisa során tett megfigyeléseinket primer humán makrofágokon is megerősítettük (30. ábra).

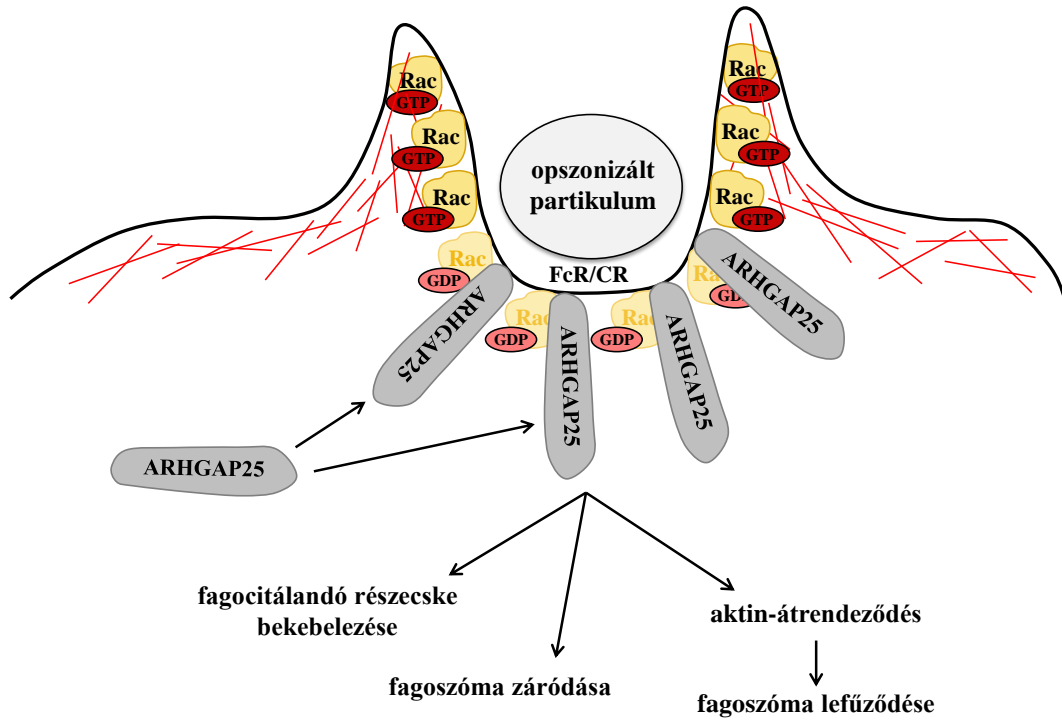
Abban az esetben, ha PMA-val indukáltuk a PLB-985 sejtek szuperoxid termelését, egy nem szignifikáns, kismértékű, ám tendenciózus növekedést tapasztaltunk a csendesített sejtek javára (32. ábra C). Ennek lehetséges okát (az ARHGAP25 esetleges közvetett/közvetlen érintettségét a szuperoxid termelés szabályozásában) további kísérletekben vizsgáljuk.

A két különböző modell sejtvonallal, illetve primer makrofágokkal kapott eredmények (a COSPhoxFc γ R sejtekben túlexpresszált ARHGAP25 gátolta, a PLB-985 sejtekben és primer makrofágokban csendesített fehérje fokozta a fagocitózist) egymást kiegészítve egyértelműen arra utalnak, hogy az ARHGAP25 a fagocitózis negatív regulátoraként működik. Korábban, makrofágokon végzett kísérletekből arra következtettek, hogy a Rac és a Cdc42 az Fc γ receptoron keresztüli fagocitózis jelátvitelében, míg a RhoA a komplement-mediált fagocitózisban érintett [161], ugyanakkor Forsberg és munkatársai kimutatták a Rac és a Cdc42 komplement-receptorhoz kötött aktivációját [256]. Saját eredményeink, melyek szerint az

ARHGAP25 mindkét receptor jelátvitelében képes a Rac-ot szabályozni, összhangban vannak a fenti megfigyelésekkel.

A Rho család kis G-fehérjéiről tudott, hogy fontos szerepet töltenek be az aktin-citoszkeleton működésének szabályozásában, és leírtak olyan GAP-okat is, melyek szerepe az említett folyamatban már bizonyított. Ilyen például az ARHGAP24, más néven FilGAP, mely jelentős homológiát mutat az ARHGAP25-tel, valamint szintén Rac-specifikus GAP [238]. Ohta és munkatársainak fibroblaszt sejteken végzett megfigyelései szerint az ARHGAP24 képes kötődni a filamin A-hoz, és az aktin citoszkeleton regulációján keresztül szabályozza a sejtek megnyúlását és összehúzódását [238]. Saját kísérleteinkben az ARHGAP25 csendesítése a PLB-985 sejtekben megnövekedett f-aktin mennyiséget eredményezett (31. ábra), mely alapján feltételezzük, hogy az ARHGAP25 fagocitózisra gyakorolt hatását az aktin-hálózat lokális regulációján keresztül valósítja meg. Alátámasztja ezen elméletünket az, hogy fagocitózis során a döntően citoplazmatikus ARHGAP25 (23. ábra) a fagoszóma-membránhoz transzlokálódik (26. ábra).

Az ARHGAP25 általunk feltételezett működését a 33. ábra szemlélteti: Az ARHGAP25 a fagoszóma plazmamembrántól távolabbi részéhez transzlokálódik, és ott inaktíválja a Rac-ot, ezáltal aktin-citoszkeletonbeli változásokat indukál. Ennek következtében a fagocitálható részecske bekebelezésre kerül, illetve a fagoszóma záródik, majd lefűződik a plazmamembránról. Azt, hogy az ARHGAP25 hogyan helyeződik át a fagoszómamembránhoz, ő maga hogyan szabályozódik, valamint pontosan milyen jelátviteli partnerekkel működik együtt, jelenleg is vizsgáljuk.



33. ábra: Az ARHGAP25 fagocitózist szabályozó szerepéről alkotott hipotézisünk sematikus ábrája. Az ARHGAP25 kihelyeződik a fagoszóma plazmamembrántól távolabbi részéhez, és ott inaktiválja a Rac-ot. Ezáltal olyan aktin-citoszkeletonbeli változásokat indukál, melyek következtében a fagocitálható részecske bekebelezésre kerül, illetve a fagoszóma záródik, majd lefűződik a plazmamembránról.

8 Következtetések

Ph.D. dolgozatomban az ARHGAP25 humán neutrofil granulocitákban betöltött szabályozó szerepével kapcsolatos eredményeimet ismertettem, melyek alapján az alábbi következtetések vonhatók le:

1. Szöveti expressziós adatbázisok, valamint kollégáim Northern blot kísérlete alapján az ARHGAP25 főként fehérvérsejtekben expresszálódik.
2. Rekombináns módon kifejezhető a teljes hosszúságú fehérje csakúgy, mint különböző fragmentjei.
3. Az ARHGAP25 a Rac kis G-fehérjére specifikus, a Rho-ra és a Cdc42-re nincs szabályozó hatással.
4. A túlexpresszált ARHGAP25 gátolja, a csendesített endogén fehérje fokozza a fagocitózist.
5. Az ARHGAP25 csendesítése tendenciózus növekedést okoz a filamentáris aktin mennyiségében.
6. Az ARHGAP25 csendesítése fokozza a fagocitózist követő szuperoxid-termelést.
7. A főleg citoszolikus fehérje fagocitózis során a fagoszómamembránhoz transzlokálódik.

9 Összefoglalás

A fagocitózis rendkívül összetett folyamat: a bekebelezésre kerülő részecskék specifikus receptorokon keresztüli megkötése számtalan jelátviteli útvonalat indít el, amelyek végül aktin-átrendeződéshez, a foszfoinozítid-metabolizmusban bekövetkező változásokhoz, illetve a fagocita NADPH oxidáz összeszerelődéséhez vezetnek. Mindezen folyamatok kulcsfontosságú szabályozói a Rho családba tartozó kis G-fehérjék. Térbeni és időbeni finomhangolásukat az őket reguláló GAP-ok, GEF-ek és GDI-végzik. Nagy számuk ellenére neutrofilekben eddig csupán öt GAP-ot írtak le.

Munkánk során azonosítottunk humán neutrofilekben egy új, eddig nem vizsgált GTPáz aktiváló fehérjét, az ARHGAP25-öt, mely főként fehérvérsejtekben expresszálódik. *In vitro* kísérleti körülmények között, valamint élő sejtekben vizsgáltuk az ARHGAP25 kis G-fehérje specificitását, melynek során úgy találtuk, hogy csak a Rac-ot képes szabályozni.

Megfigyeltük, hogy a túlexpresszált ARHGAP25 gátolta a COSPhoxFc γ R sejtek élesztő felvételét. A neutrofil irányba differenciáltatott PLB-985 sejtekben, valamint humán primer makrofágokban az endogén ARHGAP25 csendesítése fokozta a fagocitózist, melyet az általunk beállított, citometriás mérési módszerrel vizsgáltunk. A csendesített ARHGAP25 emellett növekedett filamentáris aktin mennyiséget eredményezett, ugyanakkor fokozta a szuperoxid termelést is, de csak azon esetekben, amikor fagocitózisra alkalmas partikulumokkal stimuláltuk a folyamatot. A PMA-val indukált szuperoxid termelésben nem tapasztaltunk szignifikáns változást.

COSPhoxFc γ R sejtek élesztő felvétele során megfigyeltük, hogy az ARHGAP25 a fagoszóma-membránhoz transzlokálódik.

A fentieket összefoglalva úgy gondoljuk, hogy a fehérvérsejt-specifikus RacGAP ARHGAP25 a neutrofil granulociták fagocitózisának negatív szabályozója. Hatását valószínűleg a Rac-on keresztüli aktin-átrendeződésre hatva fejt ki. Feltehetően az Fc- és komplement receptorokból induló jelátviteli útvonalak valamely, a fagocita oxidáz összeszerelődését megelőző, közös lépésében érintett. Azt, hogy maga az ARHGAP25 hogyan szabályozódik, további kísérletekben kívánjuk vizsgálni.

10 Summary

Phagocytosis is a complex process: binding of the particles to specific receptors initiates diverse signaling pathways that lead to actin polymerization, alteration of the phosphoinositide metabolism, and assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex. All of these processes are regulated by Rho family small GTPases. Fine temporal and spatial coordination of the activity of small GTPases depends on the regulatory proteins GAPs, GEFs, and GDIs. Despite their large numbers only five Rac/RhoGAPs have been identified in neutrophils.

In this study we investigated the novel leukocyte-specific GTPase activating protein ARHGAP25 in human neutrophils. Investigating the small G protein specificity of ARHGAP25 in *in vitro* studies and in living cells, we found that it affects GTP-hydrolysis only on Rac.

We observed inhibition of yeast uptake in COSPhoxFc γ R cells overexpressing ARHGAP25. Silencing of the protein in differentiated PLB-985 cell and in primary human macrophages caused increased phagocytosis which was measured with a cytometric method developed by us.

In our experiments on differentiated PLB-985 cells, silencing of ARHGAP25 resulted in an increase of the f-actin level and caused an increase in phagocytosis-related superoxide production. In phorbol ester induced superoxide production we observed no significant difference between silenced and control cells.

In phagocytosing COSPhoxFc γ R cells ARHGAP25 was enriched around the phagosomes.

Taken together, we suggest that ARHGAP25, a novel leukocyte-specific RacGAP is a negative regulator of phagocytosis in neutrophilic granulocytes potentially acting via Rac-dependent f-actin reorganization. ARHGAP25 may be involved in a step that is common in the signaling pathway of Fc- and complement receptors, but upstream of the assembly of the NADPH oxidase complex. Investigation of the interacting partners and regulation of ARHGAP25 will be the subject of future studies.

11 Irodalomjegyzék

1. Erdei A, Sármay G, Prechl J. Immunológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2012: 25-205.
2. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 6578-6583.
3. Murphy KP, Travers P, Walport M, Ehrenstein M, Janeway CA. *Janeway's immunobiology*. Garland Science, New York ; London, 2008: 39-424.
4. Metschnikoff E. (1891) Lecture on Phagocytosis and Immunity. *Br Med J*, 1: 213-217.
5. Borregaard N. (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33: 657-670.
6. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. (2010) In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 116: 625-627.
7. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR. (1994) Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*, 84: 1737-1746.
8. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. (2005) Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 22: 285-294.
9. Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW. (2007) Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res*, 101: 234-247.
10. McEver RP. (2002) Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol*, 14: 581-586.
11. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7: 678-689.

12. May RC, Machesky LM. (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 114: 1061-1077.
13. Erdei A, Sármay G, Prechl J. *Immunológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest*, 2012: 52-53.
14. Zarembek KA, Godowski PJ. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol*, 168: 554-561.
15. Ligeti E, Csepányi-Komi R, Hunyady L. (2012) Physiological mechanisms of signal termination in biological systems. *Acta Physiol (Oxf)*, 204: 469-478.
16. Besse A, Lamothe B, Campos AD, Webster WK, Maddineni U, Lin SC, Wu H, Darnay BG. (2007) TAK1-dependent signaling requires functional interaction with TAB2/TAB3. *J Biol Chem*, 282: 3918-3928.
17. Akira S. (2003) Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*, 278: 38105-38108.
18. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*, 197: 1119-1124.
19. Molina H, Holers VM, Li B, Fung Y, Mariathasan S, Goellner J, Strauss-Schoenberger J, Karr RW, Chaplin DD. (1996) Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 3357-3361.
20. Sengelov H. (1995) Complement receptors in neutrophils. *Crit Rev Immunol*, 15: 107-131.
21. Symons M, Rusk N. (2003) Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. *Curr Biol*, 13: R409-418.
22. Burridge K, Wennerberg K. (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell*, 116: 167-179.
23. Aderem A, Underhill DM. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17: 593-623.
24. Garcia-Garcia E, Rosales C. (2002) Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol*, 72: 1092-1108.
25. Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL, DeFranco AL. (1997) A critical role for Syk in signal

- transduction and phagocytosis mediated by Fc γ receptors on macrophages. *J Exp Med*, 186: 1027-1039.
26. Patel JC, Hall A, Caron E. (2002) Vav regulates activation of Rac but not Cdc42 during Fc γ R-mediated phagocytosis. *Mol Biol Cell*, 13: 1215-1226.
 27. Takenawa T, Suetsugu S. (2007) The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 37-48.
 28. Pollard TD. (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 36: 451-477.
 29. Pollard TD, Borisy GG. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112: 453-465.
 30. Swanson JA, Hoppe AD. (2004) The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol*, 76: 1093-1103.
 31. Borregaard N, Cowland JB. (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89: 3503-3521.
 32. Babior BM. (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93: 1464-1476.
 33. DeLeo FR, Quinn MT. (1996) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol*, 60: 677-691.
 34. Harrison RE, Touret N, Grinstein S. (2002) Microbial killing: oxidants, proteases and ions. *Curr Biol*, 12: R357-359.
 35. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature*, 416: 291-297.
 36. Rada BK, Geiszt M, Kaldi K, Timar C, Ligeti E. (2004) Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. *Blood*, 104: 2947-2953.
 37. Bokoch GM, Diebold BA. (2002) Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood*, 100: 2692-2696.
 38. Lakshman R, Finn A. (2001) Neutrophil disorders and their management. *J Clin Pathol*, 54: 7-19.
 39. Robert P, Canault M, Farnarier C, Nurden A, Grosdidier C, Barlogis V, Bongrand P, Pierres A, Chambost H, Alessi MC. (2011) A novel leukocyte adhesion deficiency III variant: kindlin-3 deficiency results in integrin- and nonintegrin-

- related defects in different steps of leukocyte adhesion. *J Immunol*, 186: 5273-5283.
40. Bouma G, Doffinger R, Patel SY, Peskett E, Sinclair JC, Barcenas-Morales G, Cerron-Gutierrez L, Kumararatne DS, Davies EG, Thrasher AJ, Burns SO. (2009) Impaired neutrophil migration and phagocytosis in IRAK-4 deficiency. *Br J Haematol*, 147: 153-156.
 41. Kaplan J, De Domenico I, Ward DM. (2008) Chediak-Higashi syndrome. *Curr Opin Hematol*, 15: 22-29.
 42. Gombart AF, Shiohara M, Kwok SH, Agematsu K, Komiyama A, Koeffler HP. (2001) Neutrophil-specific granule deficiency: homozygous recessive inheritance of a frameshift mutation in the gene encoding transcription factor CCAAT/enhancer binding protein--epsilon. *Blood*, 97: 2561-2567.
 43. Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. (2003) Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol*, 15: 578-584.
 44. Ligeti E, Welti S, Scheffzek K. (2012) Inhibition and termination of physiological responses by GTPase activating proteins. *Physiol Rev*, 92: 237-272.
 45. Wettschureck N, Offermanns S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev*, 85: 1159-1204.
 46. An Y, Shao Y, Alory C, Matteson J, Sakisaka T, Chen W, Gibbs RA, Wilson IA, Balch WE. (2003) Geranylgeranyl switching regulates GDI-Rab GTPase recycling. *Structure*, 11: 347-357.
 47. Hoffman GR, Nassar N, Cerione RA. (2000) Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell*, 100: 345-356.
 48. Magee T, Newman C. (1992) The role of lipid anchors for small G proteins in membrane trafficking. *Trends Cell Biol*, 2: 318-323.
 49. McTaggart SJ. (2006) Isoprenylated proteins. *Cell Mol Life Sci*, 63: 255-267.
 50. Moskwa P, Paclet MH, Dagher MC, Ligeti E. (2005) Autoinhibition of p50 Rho GTPase-activating protein (GAP) is released by prenylated small GTPases. *J Biol Chem*, 280: 6716-6720.

51. Rak A, Pylypenko O, Durek T, Watzke A, Kushnir S, Brunsveld L, Waldmann H, Goody RS, Alexandrov K. (2003) Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. *Science*, 302: 646-650.
52. Scheffzek K, Stephan I, Jensen ON, Illenberger D, Gierschik P. (2000) The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nat Struct Biol*, 7: 122-126.
53. Self AJ, Hall A. (1995) Measurement of intrinsic nucleotide exchange and GTP hydrolysis rates. *Methods Enzymol*, 256: 67-76.
54. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349: 117-127.
55. Saraste M, Sibbald PR, Wittinghofer A. (1990) The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci*, 15: 430-434.
56. Vetter IR, Wittinghofer A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294: 1299-1304.
57. Milburn MV, Tong L, deVos AM, Brunger A, Yamaizumi Z, Nishimura S, Kim SH. (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science*, 247: 939-945.
58. Csepanyi-Komi R, Levay M, Ligeti E. (2012) Small G proteins and their regulators in cellular signalling. *Mol Cell Endocrinol*, 353: 10-20.
59. Ligeti E, Settleman J. (2006) Regulation of RhoGAP specificity by phospholipids and prenylation. *Methods Enzymol*, 406: 104-117.
60. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*, 118: 843-846.
61. Exton JH. (1998) Small GTPases minireview series. *J Biol Chem*, 273: 19923.
62. Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy DR. (1982) Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79: 4848-4852.
63. Harvey JJ. (1964) An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature*, 204: 1104-1105.
64. Kirsten WH, Schauf V, McCoy J. (1970) Properties of a murine sarcoma virus. *Bibl Haematol*: 246-249.

65. Hall A, Marshall CJ, Spurr NK, Weiss RA. (1983) Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature*, 303: 396-400.
66. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 81: 153-208.
67. Buday L, Downward J. (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell*, 73: 611-620.
68. Vojtek AB, Der CJ. (1998) Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem*, 273: 19925-19928.
69. Shin SY, Rath O, Choo SM, Fee F, McFerran B, Kolch W, Cho KH. (2009) Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *J Cell Sci*, 122: 425-435.
70. Franke TF. (2008) PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene*, 27: 6473-6488.
71. Harden TK, Hicks SN, Sondek J. (2009) Phospholipase C isozymes as effectors of Ras superfamily GTPases. *J Lipid Res*, 50 Suppl: S243-248.
72. van der Weyden L, Adams DJ. (2007) The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1776: 58-85.
73. Recino A, Sherwood V, Flaxman A, Cooper WN, Latif F, Ward A, Chalmers AD. (2010) Human RASSF7 regulates the microtubule cytoskeleton and is required for spindle formation, Aurora B activation and chromosomal congression during mitosis. *Biochem J*, 430: 207-213.
74. Lambert JM, Lambert QT, Reuther GW, Malliri A, Siderovski DP, Sondek J, Collard JG, Der CJ. (2002) Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat Cell Biol*, 4: 621-625.
75. Colicelli J. (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE*, 2004: RE13.
76. Pereira-Leal JB, Seabra MC. (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol*, 313: 889-901.
77. Barr FA. (2009) Rab GTPase function in Golgi trafficking. *Semin Cell Dev Biol*, 20: 780-783.

78. Stenmark H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 513-525.
79. Zerial M, McBride H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 107-117.
80. van der Sluijs P, Hull M, Webster P, Male P, Goud B, Mellman I. (1992) The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*, 70: 729-740.
81. Schimmoller F, Simon I, Pfeffer SR. (1998) Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J Biol Chem*, 273: 22161-22164.
82. Martinez O, Goud B. (1998) Rab proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1404: 101-112.
83. Gonzalez L, Jr., Scheller RH. (1999) Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. *Cell*, 96: 755-758.
84. Seachrist JL, Ferguson SS. (2003) Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci*, 74: 225-235.
85. Memon AR. (2004) The role of ADP-ribosylation factor and SAR1 in vesicular trafficking in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1664: 9-30.
86. Pasqualato S, Renault L, Cherfils J. (2002) Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO Rep*, 3: 1035-1041.
87. Uchida H, Kondo A, Yoshimura Y, Mazaki Y, Sabe H. (2001) PAG3/Papalpa/KIAA0400, a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor (ARF), regulates ARF6 in Fcγ receptor-mediated phagocytosis of macrophages. *J Exp Med*, 193: 955-966.
88. Weis K. (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, 112: 441-451.
89. Wilde A, Zheng Y. (1999) Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science*, 284: 1359-1362.
90. Kalab P, Pu RT, Dasso M. (1999) The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr Biol*, 9: 481-484.
91. Yamaguchi R, Newport J. (2003) A role for Ran-GTP and Crm1 in blocking re-replication. *Cell*, 113: 115-125.
92. Madaule P, Axel R. (1985) A novel ras-related gene family. *Cell*, 41: 31-40.

93. Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P. (2007) Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol*, 24: 203-216.
94. Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R. (1989) rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem*, 264: 16378-16382.
95. Shirsat NV, Pignolo RJ, Kreider BL, Rovera G. (1990) A member of the ras gene superfamily is expressed specifically in T, B and myeloid hemopoietic cells. *Oncogene*, 5: 769-772.
96. Nobes CD, Hall A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81: 53-62.
97. Ridley AJ, Hall A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70: 389-399.
98. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70: 401-410.
99. Puls A, Eliopoulos AG, Nobes CD, Bridges T, Young LS, Hall A. (1999) Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J Cell Sci*, 112 (Pt 17): 2983-2992.
100. Hall A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279: 509-514.
101. Etienne-Manneville S, Hall A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420: 629-635.
102. Jaffe AB, Hall A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21: 247-269.
103. Tybulewicz VL, Henderson RB. (2009) Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol*, 9: 630-644.
104. Bokoch GM. (2005) Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends Cell Biol*, 15: 163-171.
105. Bishop AL, Hall A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, 348 Pt 2: 241-255.

106. Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S. (1999) Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*, 1: 136-143.
107. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 273: 245-248.
108. Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. (1999) Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*, 285: 895-898.
109. Amano M, Mukai H, Ono Y, Chihara K, Matsui T, Hamajima Y, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. (1996) Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science*, 271: 648-650.
110. Vincent S, Settleman J. (1997) The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization. *Mol Cell Biol*, 17: 2247-2256.
111. Madaule P, Furuyashiki T, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Morii N, Narumiya S. (1995) A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS Lett*, 377: 243-248.
112. Madaule P, Eda M, Watanabe N, Fujisawa K, Matsuoka T, Bito H, Ishizaki T, Narumiya S. (1998) Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature*, 394: 491-494.
113. Chou MM, Blenis J. (1996) The 70 kDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. *Cell*, 85: 573-583.
114. Tapon N, Nagata K, Lamarche N, Hall A. (1998) A new rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF-kappaB signalling pathways. *EMBO J*, 17: 1395-1404.
115. Nagata K, Puls A, Futter C, Aspenstrom P, Schaefer E, Nakata T, Hirokawa N, Hall A. (1998) The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *EMBO J*, 17: 149-158.

116. Teramoto H, Coso OA, Miyata H, Igishi T, Miki T, Gutkind JS. (1996) Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem*, 271: 27225-27228.
117. Fanger GR, Johnson NL, Johnson GL. (1997) MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J*, 16: 4961-4972.
118. Bagrodia S, Cerione RA. (1999) Pak to the future. *Trends Cell Biol*, 9: 350-355.
119. Abo A, Qu J, Cammarano MS, Dan C, Fritsch A, Baud V, Belisle B, Minden A. (1998) PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J*, 17: 6527-6540.
120. Leung T, Chen XQ, Tan I, Manser E, Lim L. (1998) Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol*, 18: 130-140.
121. Manser E, Leung T, Salihuddin H, Tan L, Lim L. (1993) A non-receptor tyrosine kinase that inhibits the GTPase activity of p21cdc42. *Nature*, 363: 364-367.
122. Yang W, Cerione RA. (1997) Cloning and characterization of a novel Cdc42-associated tyrosine kinase, ACK-2, from bovine brain. *J Biol Chem*, 272: 24819-24824.
123. Gilmore AP, Burridge K. (1996) Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature*, 381: 531-535.
124. Ren XD, Bokoch GM, Traynor-Kaplan A, Jenkins GH, Anderson RA, Schwartz MA. (1996) Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 cells. *Mol Biol Cell*, 7: 435-442.
125. Toliaas KF, Couvillon AD, Cantley LC, Carpenter CL. (1998) Characterization of a Rac1- and RhoGDI-associated lipid kinase signaling complex. *Mol Cell Biol*, 18: 762-770.
126. Toliaas KF, Cantley LC, Carpenter CL. (1995) Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem*, 270: 17656-17659.

127. Bokoch GM, Vlahos CJ, Wang Y, Knaus UG, Traynor-Kaplan AE. (1996) Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J*, 315 (Pt 3): 775-779.
128. Zheng Y, Bagrodia S, Cerione RA. (1994) Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J Biol Chem*, 269: 18727-18730.
129. Houssa B, de Widt J, Kranenburg O, Moolenaar WH, van Blitterswijk WJ. (1999) Diacylglycerol kinase theta binds to and is negatively regulated by active RhoA. *J Biol Chem*, 274: 6820-6822.
130. Malcolm KC, Elliott CM, Exton JH. (1996) Evidence for Rho-mediated agonist stimulation of phospholipase D in rat1 fibroblasts. Effects of Clostridium botulinum C3 exoenzyme. *J Biol Chem*, 271: 13135-13139.
131. Hess JA, Ross AH, Qiu RG, Symons M, Exton JH. (1997) Role of Rho family proteins in phospholipase D activation by growth factors. *J Biol Chem*, 272: 1615-1620.
132. Han JS, Kim HC, Chung JK, Kang HS, Donaldson J, Koh JK. (1998) The potential role for CDC42 protein from rat brain cytosol in phospholipase D activation. *Biochem Mol Biol Int*, 45: 1089-1103.
133. Bae CD, Min DS, Fleming IN, Exton JH. (1998) Determination of interaction sites on the small G protein RhoA for phospholipase D. *J Biol Chem*, 273: 11596-11604.
134. Illenberger D, Schwald F, Pimmer D, Binder W, Maier G, Dietrich A, Gierschik P. (1998) Stimulation of phospholipase C-beta2 by the Rho GTPases Cdc42Hs and Rac1. *EMBO J*, 17: 6241-6249.
135. Watanabe G, Saito Y, Madaule P, Ishizaki T, Fujisawa K, Morii N, Mukai H, Ono Y, Kakizuka A, Narumiya S. (1996) Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho. *Science*, 271: 645-648.
136. Reid T, Furuyashiki T, Ishizaki T, Watanabe G, Watanabe N, Fujisawa K, Morii N, Madaule P, Narumiya S. (1996) Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem*, 271: 13556-13560.

137. Hotta K, Tanaka K, Mino A, Kohno H, Takai Y. (1996) Interaction of the Rho family small G proteins with kinectin, an anchoring protein of kinesin motor. *Biochem Biophys Res Commun*, 225: 69-74.
138. Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Saito Y, Nakao K, Jockusch BM, Narumiya S. (1997) p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J*, 16: 3044-3056.
139. Machesky LM, Insall RH. (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, 8: 1347-1356.
140. Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW. (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, 97: 221-231.
141. Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T. (1998) Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature*, 391: 93-96.
142. Machesky LM, Mullins RD, Higgs HN, Kaiser DA, Blanchoin L, May RC, Hall ME, Pollard TD. (1999) Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 3739-3744.
143. Miki H, Suetsugu S, Takenawa T. (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J*, 17: 6932-6941.
144. Van Aelst L, Joneson T, Bar-Sagi D. (1996) Identification of a novel Rac1-interacting protein involved in membrane ruffling. *EMBO J*, 15: 3778-3786.
145. Kobayashi K, Kuroda S, Fukata M, Nakamura T, Nagase T, Nomura N, Matsuura Y, Yoshida-Kubomura N, Iwamatsu A, Kaibuchi K. (1998) p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J Biol Chem*, 273: 291-295.
146. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW. (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature*, 353: 668-670.
147. Nisimoto Y, Freeman JL, Motalebi SA, Hirshberg M, Lambeth JD. (1997) Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region

- and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J Biol Chem*, 272: 18834-18841.
148. Diekmann D, Abo A, Johnston C, Segal AW, Hall A. (1994) Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science*, 265: 531-533.
 149. Burbelo PD, Snow DM, Bahou W, Spiegel S. (1999) MSE55, a Cdc42 effector protein, induces long cellular extensions in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 9083-9088.
 150. Joberty G, Perlungher RR, Macara IG. (1999) The Borgs, a new family of Cdc42 and TC10 GTPase-interacting proteins. *Mol Cell Biol*, 19: 6585-6597.
 151. Kaibuchi K, Kuroda S, Fukata M, Nakagawa M. (1999) Regulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by the Rho family GTPases. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 591-596.
 152. Joyal JL, Annan RS, Ho YD, Huddleston ME, Carr SA, Hart MJ, Sacks DB. (1997) Calmodulin modulates the interaction between IQGAP1 and Cdc42. Identification of IQGAP1 by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *J Biol Chem*, 272: 15419-15425.
 153. Fukata M, Kuroda S, Fujii K, Nakamura T, Shoji I, Matsuura Y, Okawa K, Iwamatsu A, Kikuchi A, Kaibuchi K. (1997) Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J Biol Chem*, 272: 29579-29583.
 154. Aspenstrom P. (1997) A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. *Curr Biol*, 7: 479-487.
 155. Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR. (2000) Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science*, 287: 1037-1040.
 156. Wang F, Herzmark P, Weiner OD, Srinivasan S, Servant G, Bourne HR. (2002) Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nat Cell Biol*, 4: 513-518.
 157. Sun CX, Downey GP, Zhu F, Koh AL, Thang H, Glogauer M. (2004) Rac1 is the small GTPase responsible for regulating the neutrophil chemotaxis compass. *Blood*, 104: 3758-3765.

158. Cicchetti G, Allen PG, Glogauer M. (2002) Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13: 220-228.
159. Zigmond SH, Joyce M, Borleis J, Bokoch GM, Devreotes PN. (1997) Regulation of actin polymerization in cell-free systems by GTPgammaS and Cdc42. *J Cell Biol*, 138: 363-374.
160. Hall A. (1992) Ras-related GTPases and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, 3: 475-479.
161. Caron E, Hall A. (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*, 282: 1717-1721.
162. Cox D, Chang P, Zhang Q, Reddy PG, Bokoch GM, Greenberg S. (1997) Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med*, 186: 1487-1494.
163. Massol P, Montcourrier P, Guillemot JC, Chavrier P. (1998) Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *EMBO J*, 17: 6219-6229.
164. Hoppe AD, Swanson JA. (2004) Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis. *Mol Biol Cell*, 15: 3509-3519.
165. Cox D, Greenberg S. (2001) Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Semin Immunol*, 13: 339-345.
166. Marshall JG, Booth JW, Stambolic V, Mak T, Balla T, Schreiber AD, Meyer T, Grinstein S. (2001) Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *J Cell Biol*, 153: 1369-1380.
167. Srinivasan S, Wang F, Glavas S, Ott A, Hofmann F, Aktories K, Kalman D, Bourne HR. (2003) Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol*, 160: 375-385.
168. Lorenzi R, Brickell PM, Katz DR, Kinnon C, Thrasher AJ. (2000) Wiskott-Aldrich syndrome protein is necessary for efficient IgG-mediated phagocytosis. *Blood*, 95: 2943-2946.
169. Dharmawardhane S, Brownson D, Lennartz M, Bokoch GM. (1999) Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pseudopodia, membrane ruffles, and phagocytic cups in activated human neutrophils. *J Leukoc Biol*, 66: 521-527.

170. Dharmawardhane S, Schurmann A, Sells MA, Chernoff J, Schmid SL, Bokoch GM. (2000) Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Mol Biol Cell*, 11: 3341-3352.
171. Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM. (1991) Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science*, 254: 1512-1515.
172. Heyworth PG, Bohl BP, Bokoch GM, Curnutte JT. (1994) Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. *J Biol Chem*, 269: 30749-30752.
173. Freeman JL, Kreck ML, Uhlinger DJ, Lambeth JD. (1994) Ras effector-homologue region on Rac regulates protein associations in the neutrophil respiratory burst oxidase complex. *Biochemistry*, 33: 13431-13435.
174. Xu X, Barry DC, Settleman J, Schwartz MA, Bokoch GM. (1994) Differing structural requirements for GTPase-activating protein responsiveness and NADPH oxidase activation by Rac. *J Biol Chem*, 269: 23569-23574.
175. Blatch GL, Lasse M. (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays*, 21: 932-939.
176. Koga H, Terasawa H, Nuno H, Takeshige K, Inagaki F, Sumimoto H. (1999) Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem*, 274: 25051-25060.
177. Lapouge K, Smith SJ, Walker PA, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Rittinger K. (2000) Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP. *Mol Cell*, 6: 899-907.
178. Diebold BA, Bokoch GM. (2001) Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase. *Nat Immunol*, 2: 211-215.
179. Cerione RA, Zheng Y. (1996) The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol*, 8: 216-222.
180. Boriack-Sjodin PA, Margarit SM, Bar-Sagi D, Kuriyan J. (1998) The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature*, 394: 337-343.

181. Worthylake DK, Rossman KL, Sondek J. (2000) Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature*, 408: 682-688.
182. Renault L, Kuhlmann J, Henkel A, Wittinghofer A. (2001) Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1). *Cell*, 105: 245-255.
183. Goldberg J. (1998) Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell*, 95: 237-248.
184. Itzen A, Pylypenko O, Goody RS, Alexandrov K, Rak A. (2006) Nucleotide exchange via local protein unfolding--structure of Rab8 in complex with MSS4. *EMBO J*, 25: 1445-1455.
185. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129: 865-877.
186. Longenecker K, Read P, Derewenda U, Dauter Z, Liu X, Garrard S, Walker L, Somlyo AV, Nakamoto RK, Somlyo AP, Derewenda ZS. (1999) How RhoGDI binds Rho. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 55: 1503-1515.
187. Grizot S, Faure J, Fieschi F, Vignais PV, Dagher MC, Pebay-Peyroula E. (2001) Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation. *Biochemistry*, 40: 10007-10013.
188. DerMardirossian C, Bokoch GM. (2005) GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol*, 15: 356-363.
189. Fukumoto Y, Kaibuchi K, Hori Y, Fujioka H, Araki S, Ueda T, Kikuchi A, Takai Y. (1990) Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene*, 5: 1321-1328.
190. Leonard D, Hart MJ, Platko JV, Eva A, Henzel W, Evans T, Cerione RA. (1992) The identification and characterization of a GDP-dissociation inhibitor (GDI) for the CDC42Hs protein. *J Biol Chem*, 267: 22860-22868.
191. Lelias JM, Adra CN, Wulf GM, Guillemot JC, Khagad M, Caput D, Lim B. (1993) cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 1479-1483.

192. Scherle P, Behrens T, Staudt LM. (1993) Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 7568-7572.
193. Platko JV, Leonard DA, Adra CN, Shaw RJ, Cerione RA, Lim B. (1995) A single residue can modify target-binding affinity and activity of the functional domain of the Rho-subfamily GDP dissociation inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 2974-2978.
194. Brunet N, Morin A, Olofsson B. (2002) RhoGDI-3 regulates RhoG and targets this protein to the Golgi complex through its unique N-terminal domain. *Traffic*, 3: 342-357.
195. Zalcman G, Closson V, Camonis J, Honore N, Rousseau-Merck MF, Tavitian A, Olofsson B. (1996) RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. *J Biol Chem*, 271: 30366-30374.
196. Adra CN, Manor D, Ko JL, Zhu S, Horiuchi T, Van Aelst L, Cerione RA, Lim B. (1997) RhoGDI γ : a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 4279-4284.
197. Bernards A. (2003) GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta*, 1603: 47-82.
198. Peck J, Douglas Gt, Wu CH, Burbelo PD. (2002) Human RhoGAP domain-containing proteins: structure, function and evolutionary relationships. *FEBS Lett*, 528: 27-34.
199. Tcherkezian J, Lamarche-Vane N. (2007) Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell*, 99: 67-86.
200. Musacchio A, Cantley LC, Harrison SC. (1996) Crystal structure of the breakpoint cluster region-homology domain from phosphoinositide 3-kinase p85 alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 14373-14378.
201. Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Smerdon SJ, Gamblin SJ. (1997) Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature*, 389: 758-762.

202. Nassar N, Hoffman GR, Manor D, Clardy JC, Cerione RA. (1998) Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP. *Nat Struct Biol*, 5: 1047-1052.
203. Rittinger K, Walker PA, Eccleston JF, Nurmahomed K, Owen D, Laue E, Gamblin SJ, Smerdon SJ. (1997) Crystal structure of a small G protein in complex with the GTPase-activating protein rhoGAP. *Nature*, 388: 693-697.
204. Geiszt M, Dagher MC, Molnar G, Havasi A, Faure J, Paclet MH, Morel F, Ligeti E. (2001) Characterization of membrane-localized and cytosolic Rac-GTPase-activating proteins in human neutrophil granulocytes: contribution to the regulation of NADPH oxidase. *Biochem J*, 355: 851-858.
205. Voncken JW, van Schaick H, Kaartinen V, Deemer K, Coates T, Landing B, Pattengale P, Dorseuil O, Bokoch GM, Groffen J, et al. (1995) Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell*, 80: 719-728.
206. Cho YJ, Cunnick JM, Yi SJ, Kaartinen V, Groffen J, Heisterkamp N. (2007) Abr and Bcr, two homologous Rac GTPase-activating proteins, control multiple cellular functions of murine macrophages. *Mol Cell Biol*, 27: 899-911.
207. Cunnick JM, Schmidhuber S, Chen G, Yu M, Yi SJ, Cho YJ, Kaartinen V, Minoo P, Warburton D, Groffen J, Heisterkamp N. (2009) Bcr and Abr cooperate in negatively regulating acute inflammatory responses. *Mol Cell Biol*, 29: 5742-5750.
208. Costa C, Barberis L, Ambrogio C, Manazza AD, Patrucco E, Azzolino O, Nielsen PO, Ciralo E, Altruda F, Prestwich GD, Chiarle R, Wymann M, Ridley A, Hirsch E. (2007) Negative feedback regulation of Rac in leukocytes from mice expressing a constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 14354-14359.
209. Costa C, Germena G, Martin-Conte EL, Molineris I, Bosco E, Marengo S, Azzolino O, Altruda F, Ranieri VM, Hirsch E. (2011) The RacGAP ArhGAP15 is a master negative regulator of neutrophil functions. *Blood*, 118: 1099-1108.
210. de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR. (1982) A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, 300: 765-767.

211. Heisterkamp N, Groffen J. (1991) Molecular insights into the Philadelphia translocation. *Hematol Pathol*, 5: 1-10.
212. Chuang TH, Xu X, Kaartinen V, Heisterkamp N, Groffen J, Bokoch GM. (1995) Abr and Bcr are multifunctional regulators of the Rho GTP-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 10282-10286.
213. Heisterkamp N, Kaartinen V, van Soest S, Bokoch GM, Groffen J. (1993) Human ABR encodes a protein with GAPrac activity and homology to the DBL nucleotide exchange factor domain. *J Biol Chem*, 268: 16903-16906.
214. Settleman J, Albright CF, Foster LC, Weinberg RA. (1992) Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature*, 359: 153-154.
215. Settleman J, Narasimhan V, Foster LC, Weinberg RA. (1992) Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. *Cell*, 69: 539-549.
216. Burbelo PD, Miyamoto S, Utani A, Brill S, Yamada KM, Hall A, Yamada Y. (1995) p190-B, a new member of the Rho GAP family, and Rho are induced to cluster after integrin cross-linking. *J Biol Chem*, 270: 30919-30926.
217. Levay M, Settleman J, Ligeti E. (2009) Regulation of the substrate preference of p190RhoGAP by protein kinase C-mediated phosphorylation of a phospholipid binding site. *Biochemistry*, 48: 8615-8623.
218. Ligeti E, Dagher MC, Hernandez SE, Koleske AJ, Settleman J. (2004) Phospholipids can switch the GTPase substrate preference of a GTPase-activating protein. *J Biol Chem*, 279: 5055-5058.
219. Arthur WT, Petch LA, Burridge K. (2000) Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol*, 10: 719-722.
220. Bass MD, Morgan MR, Roach KA, Settleman J, Goryachev AB, Humphries MJ. (2008) p190RhoGAP is the convergence point of adhesion signals from alpha 5 beta 1 integrin and syndecan-4. *J Cell Biol*, 181: 1013-1026.
221. Hernandez SE, Settleman J, Koleske AJ. (2004) Adhesion-dependent regulation of p190RhoGAP in the developing brain by the Abl-related gene tyrosine kinase. *Curr Biol*, 14: 691-696.
222. Nakahara H, Mueller SC, Nomizu M, Yamada Y, Yeh Y, Chen WT. (1998) Activation of beta1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of

- p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *J Biol Chem*, 273: 9-12.
223. Brouns MR, Matheson SF, Hu KQ, Delalle I, Caviness VS, Silver J, Bronson RT, Settleman J. (2000) The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development*, 127: 4891-4903.
224. Brouns MR, Matheson SF, Settleman J. (2001) p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat Cell Biol*, 3: 361-367.
225. Heyworth PG, Knaus UG, Settleman J, Curnutte JT, Bokoch GM. (1993) Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Mol Biol Cell*, 4: 1217-1223.
226. Dusi S, Donini M, Wientjes F, Rossi F. (1996) Translocation of p190rho guanosine triphosphatase-activating protein from cytosol to the membrane in human neutrophils stimulated with different agonists. *Biochem Biophys Res Commun*, 219: 859-862.
227. Dib K, Melander F, Andersson T. (2001) Role of p190RhoGAP in beta 2 integrin regulation of RhoA in human neutrophils. *J Immunol*, 166: 6311-6322.
228. Nemeth T, Futosi K, Hably C, Brouns MR, Jakob SM, Kovacs M, Kertesz Z, Walzog B, Settleman J, Mocsai A. (2010) Neutrophil functions and autoimmune arthritis in the absence of p190RhoGAP: generation and analysis of a novel null mutation in mice. *J Immunol*, 185: 3064-3075.
229. Seoh ML, Ng CH, Yong J, Lim L, Leung T. (2003) ArhGAP15, a novel human RacGAP protein with GTPase binding property. *FEBS Lett*, 539: 131-137.
230. Zhang Z, Wu C, Wang S, Huang W, Zhou Z, Ying K, Xie Y, Mao Y. (2002) Cloning and characterization of ARHGAP12, a novel human rhoGAP gene. *Int J Biochem Cell Biol*, 34: 325-331.
231. Barfod ET, Zheng Y, Kuang WJ, Hart MJ, Evans T, Cerione RA, Ashkenazi A. (1993) Cloning and expression of a human CDC42 GTPase-activating protein reveals a functional SH3-binding domain. *J Biol Chem*, 268: 26059-26062.

232. Lancaster CA, Taylor-Harris PM, Self AJ, Brill S, van Erp HE, Hall A. (1994) Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. *J Biol Chem*, 269: 1137-1142.
233. Wang L, Yang L, Burns K, Kuan CY, Zheng Y. (2005) Cdc42GAP regulates c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated apoptosis and cell number during mammalian perinatal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 13484-13489.
234. Wang L, Yang L, Filippi MD, Williams DA, Zheng Y. (2006) Genetic deletion of Cdc42GAP reveals a role of Cdc42 in erythropoiesis and hematopoietic stem/progenitor cell survival, adhesion, and engraftment. *Blood*, 107: 98-105.
235. Szczur K, Xu H, Atkinson S, Zheng Y, Filippi MD. (2006) Rho GTPase CDC42 regulates directionality and random movement via distinct MAPK pathways in neutrophils. *Blood*, 108: 4205-4213.
236. Sirokmany G, Szidonya L, Kaldi K, Gaborik Z, Ligeti E, Geiszt M. (2006) Sec14 homology domain targets p50RhoGAP to endosomes and provides a link between Rab and Rho GTPases. *J Biol Chem*, 281: 6096-6105.
237. Katoh M. (2004) Identification and characterization of ARHGAP24 and ARHGAP25 genes in silico. *Int J Mol Med*, 14: 333-338.
238. Ohta Y, Hartwig JH, Stossel TP. (2006) FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat Cell Biol*, 8: 803-814.
239. Detwiler KY, Fernando NT, Segal NH, Ryeom SW, D'Amore PA, Yoon SS. (2005) Analysis of hypoxia-related gene expression in sarcomas and effect of hypoxia on RNA interference of vascular endothelial cell growth factor A. *Cancer Res*, 65: 5881-5889.
240. Yoon SS, Segal NH, Park PJ, Detwiler KY, Fernando NT, Ryeom SW, Brennan MF, Singer S. (2006) Angiogenic profile of soft tissue sarcomas based on analysis of circulating factors and microarray gene expression. *J Surg Res*, 135: 282-290.
241. Jeffrey KL, Brummer T, Rolph MS, Liu SM, Callejas NA, Grumont RJ, Gillieron C, Mackay F, Grey S, Camps M, Rommel C, Gerondakis SD, Mackay CR. (2006) Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nat Immunol*, 7: 274-283.

242. Rada BK, Geiszt M, Van Bruggen R, Nemet K, Roos D, Ligeti E. (2003) Calcium signalling is altered in myeloid cells with a deficiency in NADPH oxidase activity. *Clin Exp Immunol*, 132: 53-60.
243. Suh CI, Stull ND, Li XJ, Tian W, Price MO, Grinstein S, Yaffe MB, Atkinson S, Dinauer MC. (2006) The phosphoinositide-binding protein p40phox activates the NADPH oxidase during Fc γ IIA receptor-induced phagocytosis. *J Exp Med*, 203: 1915-1925.
244. Scheffzek K, Ahmadian MR. (2005) GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell Mol Life Sci*, 62: 3014-3038.
245. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
246. Shinohara M, Terada Y, Iwamatsu A, Shinohara A, Mochizuki N, Higuchi M, Gotoh Y, Ihara S, Nagata S, Itoh H, Fukui Y, Jessberger R. (2002) SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling. *Nature*, 416: 759-763.
247. Price MO, McPhail LC, Lambeth JD, Han CH, Knaus UG, Dinauer MC. (2002) Creation of a genetic system for analysis of the phagocyte respiratory burst: high-level reconstitution of the NADPH oxidase in a nonhematopoietic system. *Blood*, 99: 2653-2661.
248. Colon-Gonzalez F, Leskow FC, Kazanietz MG. (2008) Identification of an autoinhibitory mechanism that restricts C1 domain-mediated activation of the Rac-GAP α 2-chimaerin. *J Biol Chem*, 283: 35247-35257.
249. Eberth A, Lundmark R, Gremer L, Dvorsky R, Koessmeier KT, McMahon HT, Ahmadian MR. (2009) A BAR domain-mediated autoinhibitory mechanism for RhoGAPs of the GRAF family. *Biochem J*, 417: 371-377.
250. Fauchereau F, Herbrand U, Chafey P, Eberth A, Koulakoff A, Vinet MC, Ahmadian MR, Chelly J, Billuart P. (2003) The RhoGAP activity of OPHN1, a new F-actin-binding protein, is negatively controlled by its amino-terminal domain. *Mol Cell Neurosci*, 23: 574-586.
251. Bassoe CF. (1984) Processing of staphylococcus aureus and zymosan particles by human leukocytes measured by flow cytometry. *Cytometry*, 5: 86-91.

252. Stewart CC, Lehnert BE, Steinkamp JA. (1986) In vitro and in vivo measurement of phagocytosis by flow cytometry. *Methods Enzymol*, 132: 183-192.
253. Steinkamp JA, Wilson JS, Saunders GC, Stewart CC. (1982) Phagocytosis: flow cytometric quantitation with fluorescent microspheres. *Science*, 215: 64-66.
254. Derer M, Walker C, Kristensen F, Reinhardt MC. (1983) A simple and rapid flow cytometric method for routine assessment of baker's yeast uptake by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol Methods*, 61: 359-365.
255. Pivot-Pajot C, Chouinard FC, El Azreq MA, Harbour D, Bourgoin SG. (2010) Characterisation of degranulation and phagocytic capacity of a human neutrophilic cellular model, PLB-985 cells. *Immunobiology*, 215: 38-52.
256. Forsberg M, Druid P, Zheng L, Stendahl O, Sarndahl E. (2003) Activation of Rac2 and Cdc42 on Fc and complement receptor ligation in human neutrophils. *J Leukoc Biol*, 74: 611-619.

12 Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapját képező publikációk

1. **Csépányi-Kömi R**, Sirokmány G, Geiszt M, Ligeti E. (2012) ARHGAP25, a novel Rac GTPase-activating protein, regulates phagocytosis in human neutrophilic granulocytes. *Blood*, 119: 573-582.
IF: 9,898
2. Izsépi E, Balogh A, Farkas A, Molnár A, Solymos E, Tóth EA, **Csépányi-Kömi R**, Matkó J. (2012) The AC8 IgG3 monoclonal anti-cholesterol antibody modulates uptake and presentation of antigens for T cell activation. *Immunol Lett*, 143: 106-115.
IF: 2,526
3. **Csépányi-Kömi R**, Sáfár D, Grósz V, Ligeti E. (2013) In silico tissue-distribution of human Rho family GTPase activating proteins. *Small GTPases*, közlésre elfogadva, DOI: 10.4161/sgtp.23708
IF: -

Egyéb publikációk

4. **Csépányi-Kömi R**, Lévay M, Ligeti E. (2012) Rho/RacGAPs: embarras de richesse? *Small GTPases*, 3: 178-182.
IF: -
5. **Csépányi-Kömi R**, Lévay M, Ligeti E. (2012) Small G proteins and their regulators in cellular signalling. *Mol Cell Endocrinol*, 353: 10-20.
IF: 4,192

6. Ligeti E, **Csépányi-Kömi R**, Hunyady L. (2012) Physiological mechanisms of signal termination in biological systems. *Acta Physiol (Oxf)*, 204: 469-478.
IF: 3,09

7. Timár Cs, Lőrincz Á, **Csépányi-Kömi R**, Vályi-Nagy A, Nagy G, Buzás E, Iványi Z, Kittel Á, Powell D, McLeish K, Ligeti E. (2013) Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*, 121: 510-518.
IF: 9,898

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Ligeti Erzsébetnek, témavezetőmnek, aki lehetővé tette, hogy laborjában dolgozzak, odaadó segítségével, hasznos tanácsaival, ötleteivel, kritikáival segítette és támogatta szakmai fejlődésemet és a laborban végzett kutatói munkámat.

Köszönöm Dr. Hunyady Lászlónak, az Élettani Intézet vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra és támogatta az intézetben végzett tudományos munkámat.

Köszönöm Dr. Geiszt Miklósnak és Dr. Sirokmány Gábornak, hogy felhívták figyelmemet az ARHGAP25-re. Köszönöm a kezdeti nehézségek során, valamint a későbbi kísérletekben és a közlemények elkészítésében nyújtott értékes segítségüket.

Külön köszönet illeti volt és jelenlegi tudományos diákkörös hallgatóimat, Lázár Enikőt, Wisniewski Évát, Szabó Juditot, Grósz Veronikát és Sáfár Dávidot, akik szinte minden idejüket a laborban töltve rengeteg hasznos, értékes kísérlettel, kitartásukkal és ötleteikkel vették ki igen jelentős részüket az itt végzett munkámból.

Köszönet illeti Sütő Krisztinát, Járay Györgyit, Fedina Editet, Horváthné Seres Erzsébetet és Tóth Kun Reginát, akik asszisztensi munkájukkal segítették és megkönnyítették kísérleteinket.

Szeretném megköszönni Dr. Gyöngyösi Norbertnek a kísérleti eredmények statisztikai elemzésében nyújtott segítségét, értékes tanácsait és a közös szakmai beszélgetéseket. Külön köszönöm Ella Krisztinának és Zana Melindának, hogy nem sajnálták idejüket ezen értekezés figyelmes, kritikus átnézésétől.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Élettani Intézet valamennyi munkatársának.

Végül szeretném megköszönni mindazt a támogatást, segítséget, amit családomtól és barátaimtól kaptam.