



Ph. D. értekezés tézisei



The role of small GTPase Rac1 in stress signaling

Burçin Güngör

Témavezető: Dr. Ibolya Horváth

Tudományos főmunkatárs

SzTE-TTIK

Biológus Doktori Iskola

Biokémiai Intézet

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Szeged 2014

BEVEZETŐ

Minden élőlény számos olyan stressztényezőnek van kitéve, mint például a magas hőmérséklet, oxidatív stressz, ultraibolya sugárzás, hipoxia, amelyek denaturálhatják fehérjéiket és károsíthatják a DNS-üket. E külső tényezők mellett kórélettani állapotok, mint pl. a neurodegeneratív betegségek, a cukorbetegség és a rák, is komoly stressztényező a sejtek számára.. E stressztényezők legtöbbje a lipidekre és membránokra is káros hatással van. Mindezek tekintetében egy szervezet túléléséhez alapfeltétel a káros körülményekhez való alkalmazkodóképesség. Ennek érdekében a sejtek összetett és speciális védelmi rendszert használnak, amely összességében egy gyors és átmeneti, úgynevezett "stresszválasz", ami által a sejtek belső környezete stabilis marad. A hőstressz összetett jelátviteli utakat aktivál az adaptáció és túlélés érdekében. A stressz súlyossága és időtartama függvényében megkülönböztetünk enyhe illetve súlyos hőstresszt. A gyenge hőstressz feltételezhetően pozitívan szabályozza a sejtciklust és differenciációt összetett kaszkádszerű események aktiválásán keresztül, mint a Rac1 jelátviteli út.

A hő sokk indukálta stresszválaszt elsősorban a hő sokkfehérjék (HSP) kifejeződése jellemzi, melyek elősegítik a sejtek stresszből való felépülését és stressztoleranciához vezetnek. E fehérjék magasfokú konzerváltságot mutatnak és számos stressztényező indukálhatja termelésüket. Nevüket a molekulásúlyuk alapján kapják: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 és a kismólsúlyú HSP-k (sHSP). Előfordulásuk helyszíne sejten belül változó és képesek akár a membránokhoz is kötődni specifikus fehérje és lipid kölcsönhatásaik által. A HSP-k molekuláris chaperonok, melyek stabilizálják az instabil konformációjú fehérjéket, valamint elősegítik, hogy a nem megfelelően feltekeredett fehérjék felvegyék megfelelő szerkezetüket.

Egyre több irodalmi adat utal arra, hogy a különböző stressztényezők által indukált HSP-k termelése a plazmamembrán (PM) finomszerkezeti és lipidösszetételbeli változásával jár együtt. A hőmérsékletváltozást a sejtek a fehérjedenaturáció és a nukleinsavak konformációváltozása mellett a PM fluiditásának és mikrodomén szerkezetének apró változásai által is érzékelhetik. A „membrán, mint hőérzékelő” modell szerint a fent leírt változások módosítják a PM-mel asszociált stresszérzékelést és jelátvitelt, így ezáltal a HSP-k termelését.

A PM szerkezetének, szerveződésének és funkciójának alaposabb feltérképezésével új távlatok nyíltak meg a stresszérzékelésben betöltött szerepének megértésében. A lipid

mikrodomének koleszterin, szfingomielin és telített zsírsavakat tartalmazó lipidek által létrehozott rendezett szigetek a PM szerkezetében. E mikrodoménekhez (lipid “tutajokhoz”) specifikus jelátviteli fehérjék kötődhetnek. A Rho fehérjecsaldába tartozó kis GTPáz Rac1 fehérje különböző jelátviteleket közvetít ily módon. Ilyenek például a növekedési faktorok receptoraitól érkező jelek, az integrinek által létrehozott, ill. a daganatok áttételeiből és betöréséből származó jelek. Ismert, hogy a Rac1 elősegíti az aktin fehérjék szerveződését, és fontos szerepet játszik a lamellipódiák és a PM fodrozottságának kialakulásában. Növekedési faktorok jelenlétében a Rac1 koleszterinben gazdag mikrodoménnel asszociálható, enyhe hőmérsékletnövekedés következtében pedig az aktin polimerizációját serkenti. Ezen felül a Rac1 befolyásolhatja a HSP expressziót is enyhe hő esetén, amikor a sejtek külső ingerként fogják fel az enyhe hőt és nem károsító hatásként reagálnak rá.

A PM mint hőérzékelő modelljére alapozva a jelenlegi munkahipotézisünk szerint a Rac1 jelátviteli útvonalnak a mikrodoménekre való hatásán keresztül a stressztényezők közvetítésében van szerepe. A PM szerkezetének és /vagy fluiditásának enyhe hőstressz következtében létrejött változása aktiválhatja a tirozin kináz növekedési faktor receptort azáltal, hogy indukálja a nem specifikus csoportosulásukat. Az ilyen sejt felszíni receptorok aktivációja serkentheti a PI3K-t, amely aktiválja a Rac1-et. Az aktiváció pillanatában a Rac1 elszakad a Rho-GDI fehérjétől, amely a Rac1-et a geranil-geranil csoportjának lefedése által a citoszolban “oldottan” tartotta. Ezután a Rac1 palmitoilezésen esik át, majd átkerül a PM koleszterinben gazdag doménjéhez. Ezt követően a Rac1 kölcsönhatásba lép a Pak1 effektor molekulával, amely jelátvitelt közvetít a MAPK molekulákhoz, mint például a p38MAPK, amelyek a HSF1 transzkripciós faktor foszforilációján keresztül befolyásolják a HSP termelését.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja az volt, hogy felderítsük a Rac1 emlős sejtek stressz jelátvitelében betöltött szerepét. Fő céljaink a következők voltak:

- Rac1 plazmamembránon való lokalizációjának vizsgálata hőstressz esetén, a plazmamembrán mikrodomének változásainak nyomkövetése Rac1 lokalizáció és aktivitás függvényében.
- Igazolni a Rac1 citoskeletális változásokra gyakorolt hatását hőstressz esetén,
- a Rac1 HSP expresszióban betöltött szerepének felderítése,

- ellenőrizni, a Rac1 hozzájárulását a HSP indukcióhoz a membránnal kapcsolatba lépő, HSP koinducer gyógyszer-kandidánsok felhasználásával.

MÓDSZEREK

Sejttenyésztés

Tranziens transzfekció

Plazma membrán és összmembrán izolálás

Western blot

Kvantitatív reverz transzkripció kapcsolt polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

Konfokális pásztázó mikroszkópia

Pásztázó elektronmikroszkópia (SEM)

Teljes belső visszaverődéses fluoreszcencia mikroszkópia (TIRF)

Áramlási citometria

EREDMÉNYEK

Az értekezésben tárgyalt munka során kapott legfontosabb eredményeket az alábbiakban foglalhatjuk össze

1. A Rac1 egy membránhoz kötődő fehérje és a vizsgált stresszkörülmények egyértelműen kiváltották a Rac1 plazmamembránhoz való kapcsolódását. Funkcionálisan inaktív Rac1 fehérje kötődhet a membránhoz ami azt jelenti, hogy noha az aktivitáshoz mindig szükség van a membánkötésre, ez utóbbi nem mindig jár “kéz a kézben” az aktivitással. A palmitoilezés előfeltétele a Rac1 PM-lokalizációjához
2. Hősokk hatására megnövekszik a PM mikrodoménjeinek mérete. A Rac1 palmitoilezése egy fontos szabályzó tényezője lehet a nagyobb, stabilabb membrán mikrodomének megjelenésének, amelyek stressz jelző platformként működnek hőstressz esetén.
3. Intenzív hőkezelés hatására fragmentálódik az F-aktin filamentum. A Rac1 az egyik fontos downstream elem a citoskeletonális elrendezésben, szerepet játszva a sejt alakjának elváltozásaiban, hisz gátlása megóvjá az ép F-aktint és megőrzi a sejt alakját súlyos hőstressz esetén.

4. Enyhe hősök mellett a Rac1 aktiválása befolyásolja a *hsp25* és *hsp70* expresszióját hírvivő RNS és fehérje szinten egyaránt. Ez utóbbi körülmény indukálja a Rac1 PM-lokalizációját is. A Rac1 szabályozza a BGP15 által közvetített HSP indukciót raft-stabilizáló hatása révén.
5. Enyhe hősök mellett a Rac1 szabályozza a p38MAPK foszforiláció szintjét. Annak ellenére, hogy az adataink nem mutattak változást a Rac1 által közvetített HSF1 hiperfoszforilációjában, feltételezhetjük, hogy az aktív p38MAPK a HSF1 foszforiláció révén csökkent HSP válaszhoz vezet. A Rac1 közvetített HSP szabályozás pontos mehanizmusának kiderítéséhez további vizsgálatok szükségesek.

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Gungor B, Gombos I, Crul T, Ayaydin F, Szabo L, Torok Z, Mates L, Vigh L, Horvath I, (2013) Rac1 participates in thermally induced alterations of the cytoskeleton, cell morphology and lipid rafts, and regulates the expression of heat shock proteins in B16 melanoma cells. *PLoS One* **9**(2): e89136.

I.F: 3.73

Gombos I, Crul T, Piotto S, **Gungor B**, Torok Z, Balogh G, Peter M, Slotte JP, Campana F, Pilbat AM, Hunya A, Toth N, Literati-Nagy Z, Vigh L Jr, Glatz A, Brameshuber M, Schutz GJ, Hevener A, Febbraio MA, Horvath I & Vigh L, (2011) Membrane-Lipid Therapy in Operation: The HSP Co-Inducer BGP-15 Activates Stress Signal Transduction Pathways by Remodeling Plasma Membrane Rafts. *PLoS One* **6**: e28818.

I.F: 3.73

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

Torok Z, Crul T, Maresca B, Schütz GJ, Viana F, Dindia L, Piotto S, Brameshuber M, Balogh G, Peter M, Porta A, Trapani A, Gombos I, Glatz A, **Gungor B**, Peksels B, Vigh L Jr, Csoboz B, Horvath I, Vijayan MM, Hooper PL, Harwood JL, Vigh L (2013) Plasma membrane as heat stress sensor: From lipid-controlled molecular switches to therapeutic applications. *Biochim Biophys Acta*, 1838(6):1594-1618. I.F: 3.92

Csoboz B, Balogh G, Kusz E, Gombos I, Peter M, Crul T, **Gungor B**, Haracska L, Bogdanovic G, Torok Z, Horvath I, Vigh L (2013) Membrane fluidity matters: hyperthermia from the aspects of lipids and membranes. *Int J Hyperthermi*, 29 (5):491-499. I.F: 2.59

Crul T, Toth N, Piotto S, Literati PN, Tory K, Haldimann P, Kalmar B, Greensmith L, Torok Z, Balogh G, Gombos I, Campana F, Concilio S, Gallyas F, Nagy G, Berente Z, **Gungor B**, Peter M, Glatz A, Hunya A, Literati-Nagy Z, Vigh L Jr, Hoogstra-Berends F, Heeres A, Kuipers I, Loen L, Seerden JP, Zhang D, Meijering R.A M, Henning RH, Brundel BJ, Kampinga HH, Koranyi L, Szilvassy Z, Mandl J, Sumegi B, Febbraio MA, Horvath I, Hooper PL & Vigh L, (2013) Hydroximic Acid Derivatives: Pleiotropic HSP Coinducers Restoring Homeostasis and Robustness. *Curr Pharm Des.*, 19(3):309-46. I.F: 3.31