

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion Matematisk-naturvetenskapliga fakulteten		Laitos – Institution Biovetenskapliga Institutionen, Genetik	
Tekijä – Författare Johanna Furuholm			
Työn nimi – Arbetets titel H-Ras, R-Ras och RhoA som GFP-fusionsproteiner			
Oppiaine – Läroämne Genetik			
Työn laji – Arbetets art Pro-Gradu		Aika – Datum September 2000	Sivumäärä – Sidoantal 57
<p>Tiivistelmä Referat</p> <p>Små GTPaser bildar en stor grupp protein vars funktioner i cellen är många, till dessa hör bl.a. reglering av celltillväxt, cellmotilitet, riktgivning av axonernas tillväxt, cytokines, transport till och från nukleus samt reglering av membrantransport. Dessa proteiner binder till en guanin-nukleotid. Denna nukleotid kan antingen vara i GTP eller GDP form. Bindandet av nukleotiderna åstadkommer antingen en aktivering eller en inaktivering av proteinet. Denna aktivering och inaktivering sker genom en s.k. GTPas cykel som är grunden till funktionen av proteinen. Då proteinet är bundet till GTP befinner det sig i en aktiv konformation och kan då göra interaktioner med effektorproteiner. GTP nukleotiden hydrolyseras till GDP och P_i och proteinen befinner sig då i en inaktiv form. GDP nukleotiden kan frigöras från proteinet och gör det möjligt för proteinet att binda en ny GTP molekyl. Denna cykel regleras av många olika proteiner.</p> <p>Ras var det första GTPaset som upptäcktes och idag bildar Ras-liknande proteiner en superfamilj som består av över hundra proteiner. Ras-familjen är indelad i sex underfamiljer: Ras, Rho, ADP-ribosyleringsfaktor (ARF), Rab, Sar och Ran. Ras-proteinen reglerar cellens tillväxt och differentiering, Rho-proteinen har kopplats till funktioner som kontrollerar cellens aktincytoskelett, Rab-proteinen spelar en viktig roll i regleringen av cellens membrantransport och Ran-proteinen är i sin tur viktig vid protein- och RNA-trafiken mellan cellkärnan och övriga delar av cellen.</p> <p>För att cellen skall kunna differentiera, migrera och dela sig behövs dess aktincytoskelett. Aktinet i celler förekommer i två olika former F-aktin, som är långa aktin filament, och G-aktin som är aktinmonomerer. Dessa monomerer används vid bildandet av filamenten. Bildandet och nedbrytandet av aktinfilamenten är en viktig process i cellen och den regleras av en mängd olika proteiner. För att en organism skall kunna utvecklas måste dessa byggstenar, d.v.s. cellerna, kunna förflytta sig från en plats till en annan. Denna förflyttning kräver att cellen först skall polariseras och därefter röra sig. Denna förändring kräver mycket av cellen och här spelar aktinet en mycket viktig roll.</p> <p>GFP (green fluorescence protein) upptäcktes för ca 10 år sedan och har senare modifierats för att kunna användas effektivare. Detta protein används som markör för att kunna detektera andra proteiner i celler eller som en indikator för händelser i celler. I detta arbetet har jag använt GFP för att kunna lokalisera H-Ras-, R-Ras- och RhoA- GTPaserna i HeLa celler.</p> <p>I detta arbete har jag fokuserat mig på Ras-proteinen H-Ras och R-Ras, samt på Rho-proteinet RhoA. För att lättare kunna se de effekter dessa proteiner har cellerna, använde jag mig, utöver viltypsformerna, av aktiva och inaktiva mutanter av dessa protein. Mitt arbete började med att modifiera en GFP-vektor kallad pEGFP-C1 genom att sätta in en alaninlinker för att GFP-proteinet inte skulle sitta så nära målprotein. Denna nära lokalisering har visat sig inhibera proteinets funktion och rätta lokalisering i cellen. Till vektorn framställdes också en polylinker för att skapa flera restriktionsplatser och på så vis underlätta flyttandet av fragment från och till vektorn. Som följande konstruerade jag de aktiva och inaktiva mutanterna av R-Ras. Detta gjordes genom sekvensspecifik mutering. Mutanterna av H-Ras och RhoA hade tidigare gjorts i gruppen. Alla protein klonades in i den modifierade GFP-vektorn och dessa konstrukt transfekterades i HeLa celler och en lokaliseringsanalys gjordes. Lokaliseringen av R-Ras berodde mycket starkt på om proteinet var inaktivt eller aktivt. Den aktiva formen lokaliserades till plasmamembranen och till rynkor i cellens ytterkanter. I cellerna transfekterade med den inaktiva formen syntes små cellulära vesikler. Orsaken till ackumuleringen av vesiklerna är oklar men den kan bero på att R-Ras i GDP-form också under normala omständigheter lagras på interna vesikler. Vid aktivering skulle populationen aktiveras och därmed skulle vesiklerna fusioneras med plasmamembranen, var R-Ras sedan skulle aktiveras. Morfologin hos cellerna transfekterade med den aktiva formen av H-Ras förändrades mycket kraftigt. Cellkontaktorna försvinner och man kan observera neuritliknande utskott. Denna starka transformering korrelerar med tidigare information om att H-Ras genen är en onkogen och att aktivt H-Ras kan transformera ett antal olika celler till cancerceller. Aktivt RhoA åstadkommer starka stressfibrer i HeLa medan inaktiva formen inte inducerade några stressfibrer. Den negativa formen lokaliserades till plasmamembranen och organellstrukturer runt cellkärnan.</p> <p>Som en fortsättning på detta projekt kommer jag att närmare undersöka R-Ras exakta lokalisering i celler i förhållande till andra kända proteiner. Det är också meningen att ja skall genomföra en sondering av proteiner som gör direkta interaktioner till den aktiva formen av R-Ras.</p>			
Avainsanat - Nyckelord Ras, Rho, GTPaser, GFP, aktin, cellrörelse			
Säilytyspaikka - Förvaringsställe Genetiska avdelningens bibliotek			