

## Szakmai beszámoló

OTKA F37230

A sejtszóródást irányító jelpályák komponenseinek összehasonlító vizsgálatát végeztük HepG2 humán hepatoma sejt vonal modell rendszeren.

A sejtszóródáshoz szükséges aktin-citoszkeleton újrendeződést és az azt irányító mechanizmusokat vizsgálva a következőket állapítottuk meg. A polimerizált aktin detektálására alkalmas TRIC-falloidin alkalmazásával, fluoreszcens mikroszkópia segítségével kimutattuk, hogy a protein kináz C-t (PKC) intenzíven aktiváló **forbol észterrel kiváltott sejtszóródásra nagyszámú aktin stressz-kábel átmeneti megjelenése jellemző**. A stressz-kábelek a sejtszóródásnak abban a fázisában alakulnak ki, amikor az egyes sejtek kiválnak a szigetszerű kolóniákból és hozzátapadnak az extracelluláris mátrixnak megfelelő tenyésztőfelülethez. Szelektív foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3 kináz) gátlószert használva azt találtuk, hogy a forbol észterrel és PI3 kináz gátlóval egyszerre kezelt sejtekben az aktin stressz-kábelek megjelennek, majd később a sejtek apoptotizálnak. Az Src citoplazmatikus tirozin kináz specifikus gátlásával sem lehet a stressz-kábel hálózat kialakulását megakadályozni. **A forbol észter hatására bekövetkező citoszkeleton átrendeződéshez tehát nem szükséges sem a PI3 kináz, sem az Src kináz aktivitása**. A hepaticita növekedési faktorról (HGF) indukált szóródás ezzel szemben a PI3 kináz aktivitását igényli, de sokkal lassabban zajlik időben és folyamata során nem figyelhető meg aktin stressz-kábelek nagyobb számban való megjelenése. A citoszkeleton organizációját irányító fehérjék közül a p21-aktivált kináz (PAK) szerepét vizsgáltuk részletesen. Immunprecipitátumból mérve a kináz aktivitását megállapítottuk, hogy **a PAK1 izoenzim aktiválódik mind a forbol észterrel, mind a HGF-fel kiváltott sejtszóródás folyamán**. A PI3 kináz gátlószerevel végzett kísérleteink bizonyították, hogy a PAK1 aktivációjához a HGF jelpályában szükség van a PI3 kináz működésére, de nincs a forbol észterrel indított sejtszóródás során. A forbol észterrel kezelt sejtekben a jellegzetes citoszkeleton-átrendeződést időben megelőzi a PAK1 intenzív aktivációja, amit a nagyszámú aktin stressz-kábel megjelenésével egy időben a PAK1 tranziens down-regulációja követ. A PAK1 down-regulációja nem mutatható ki a HGF-fel szóródásra bírt HepG2 sejtekben, de megfigyelhető egy másik sejttípus, a HT-29 intesztinális karcinóma sejtek forbol észterrel indukált szóródása során. Eredményeink szerint **a PAK1 tranziens down-regulációja fontos szerepet játszik a forbol észterrel kiváltott sejtszóródás mechanizmusában**.

Megállapítottuk, hogy az Erk1/2 MAP kinázok lényeges funkciót töltenek be mind a forbol észterrel, mind a HGF-fel indított sejtszóródásban, mert **az Erk1/2 MAP kinázok intenzív és hosszantartó aktiválódása szükséges ahhoz, hogy a sejtekben fokozódjék azon integrinek ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 6$  és  $\beta 1$ ) expressziója, amelyek az extracelluláris mátrixhoz horgonyozva a sejteket kialakítják az elmozduláshoz nélkülözhetetlen fogódzópontokat.** Szelektív gátlószer felhasználásával bebizonyítottuk, hogy **az integrinek expressziójának HGF-fel indukált fokozódásához a PI3 kináz működése is szükséges.**

Azt is kimutattuk, hogy a sejteket szóródásra bíró HGF receptorának (c-Met) autofoszforilációja hosszú ideig fennmarad, míg a szóródást előidézeni nem képes epidermális növekedési faktor (EGF) receptorának (EGFR) autofoszforilációja gyorsan lecseng. Eredményeink szerint **a két növekedési faktor eltérő biológiai hatásának hátterében részben receptoraik defoszforilációjának eltérő kinetikája áll.** A két növekedési faktor által elindított azonos jelpályákat tovább vizsgáltuk. Immunprecipitátumból mérve a foszfatidilinozitol 3-kináz aktivitást azt találtuk, hogy a PI3 kináz intenzívebben aktiválódik a HGF-fel stimulált c-Met útján, mint az EGFR felől. A PKC a sejtszóródást irányító jelpályákban betöltött szerepét is részletesen analizáltuk. Megállapítottuk, hogy **a c-Met jeltovábbító rendszerében a PKC negatív regulátorként limitálja a PI3 kináz aktivációjának intenzitását és időtartamát** is. A PKC ezen negatív regulátor funkcióját az integrinek expressziójának szintjén is igazoltuk. Az aktivált c-Met és a hozzá kapcsolódó Gab1 dokkoló fehérje (amely a PI3 kináz aktiválódást közvetlenül biztosítja) tirozin foszforilációját vizsgálva kiderítettük, hogy rendszerünkben az irodalmi adatokkal ellentétben a PKC nem ezen fehérjék funkcionális állapotát befolyásolva fejt ki negatív regulátor szerepét. Azt is megállapítottuk, hogy a PKC forbol észterrel történő aktiválása esetén erősen csökken a PI3 kináz aktivitása a sejtekben, ezért azt feltételeztük, hogy a PKC közvetlen módon befolyásolhatja a PI3 kináz aktivitását. Immunprecipitált PI3 kináz és aktív PKC felhasználásával valószínűsítettük a közvetlen foszforilációt, ezért további kísérleteket végeztünk. Azt találtuk tisztított, rekombináns enzimek felhasználásával *in vitro*, hogy **a p110 $\alpha$ /p85 $\alpha$  PI3 kináz p110 $\alpha$  katalitikus alegységét a PKC izoenzimek közül a PKC $\alpha$  képes foszforilálni**, míg a PKC $\epsilon$  nem. A foszforiláció funkcióra gyakorolt hatását vizsgálva kimutattuk, hogy **a p110 $\alpha$  katalitikus alegység PKC $\alpha$  által katalizált foszforilációja csökkenti a PI3 kináz lipid kináz aktivitását.** Ennek a mechanizmusnak a felfedezést tartom a legfontosabb eredményünknek, amely merőben új kiindulópont lehet a PI3 kináz aktivitás szabályozásának további kutatásához.