

OTKA (T46130) pályázatunk munkatervében azt vállaltuk, hogy tanulmányozni fogunk két jelátviteli utat, melyek egyaránt a sejtek aktin citoskeletonját szabályozzák. Az egyik út az epidermális növekedési faktortól (EGF) indul el, míg a másikat az extracelluláris mátrix komponensei (fibronektin, laminin, stb.) aktiválják integrin receptorokon keresztül.

Az EGF jelpálya esetében jól ismert az irodalomban, hogy a növekedési hormonnal történő kezelés hatására a sejtek aktin citoskeletonja percek alatt átrendeződik és membrán fodrozódások (ruffling), illetve lamellipodiumok alakulnak ki. 2003-ban a témavezető és munkatársai – egy korábbi OTKA támogatás segítségével - kimutatták, hogy ebben a Vav2 RacGTP-áz-specifikus kicserélődési faktornak alapvető szerepe van. Bizonyították, hogy a Vav2 SH2 doménje révén asszociálódik az autofoszforylált EGF receptorral, mely ezután megfoszforylálja a kicserélődési faktor. Magának a foszforylációnak nincs szerepe a Vav2 aktiválásában, hanem a folyamatban annak PH (Pleckstrin-homológ) doménje játszik kulcsszerepet [1, 2].

Jelen OTKA pályázatunk egyik kérdése az volt, hogy a Vav2 szerepet játszik-e az extracelluláris mátrix/integrin jelpályában? Beállítottunk ezért egy olyan módszert, melyben az integrinektől induló jelet tudjuk monitorozni. Ennek lényege, hogy COS7 sejteket a szokásos sejtenyésző edényből tripszinnel mobilizáljuk, majd 1 óra tripszin inhibitor jelenlétében történt regenerálódást követően a sejteket fibronektinnel bevont fedőlemezekre tesszük ki. A sejtek intergrin receptoraik segítségével tapadnak ki a fibronektinhez, aminek következtében a sejtek kiterülése meggyorsul. Ehhez az aktin citoskeleton változása szükséges. Ha a fibronektinre való ültetés előtt a sejtekben különböző fehérjéket expresszálunk, akkor vizsgálni tudjuk ezen fehérjék hatását a fibronektinre való sejt-kiterülésre.

Meglévő konstrukcióinkat, illetve módszereinket alkalmazva over-expresszáltuk a Vav2 egyes mutánsait COS7 sejtekben és vizsgáltuk a sejtek fibronektin felszínre való kiterülését. Megállapítottuk, hogy a Vav2 expressziója a sejtekben fokozza, míg a domináns negatív Vav2 (katalitikus domén inaktiváló mutációja) expressziója gátolja a sejtek kiterülését. Ugyanakkor irodalomból ismert, hogy az integrinek a foszfatidilinozitol 3-kinázon (PI 3-kináz) keresztül szabályozzák az aktin citoskeleton változásait, melyet korábban mi is kimértünk. Ugyanakkor a Vav2 PH doménje önmagában nem gátolta a sejtek kiterülését, a PH domén mutáns Vav2 pedig a vad típushoz hasonlóan szintén fokozta a kiterülést. A Vav2 siRNA-sel történő eliminációja sem befolyásolta érdemben a vizsgált hatást. Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy bár a Vav2 over-expresszió befolyásolhatja a sejtek kiterülését, az endogén Vav2-nek a folyamatban nincsen meghatározó szerepe.

Balla Tamás (NIH, USA) munkacsoportjával együttműködve ezért elkezdtük vizsgálni, hogy különböző PH doméneket expresszálva COS7 sejtekben melyik PH domén képes a sejtek kiterülésének gátlására. Bár az általunk használt összes PH domén képes a PI 3-kináz lipid termékeit kötni in vitro, kizárólag a GRP1/ARNO családba tartozó fehérjék PH doménjei voltak képesek a sejten belül az integrin jelátvitelben gátló hatást kifejteni. A GRP1/ARNO család tagjai a RasGTP-áz szupercsaládba tartozó Arf fehérjék aktivátoraiként működnek. Ráadásul ismert, hogy az aktivált Arf fehérjék a Rac-on keresztül szabályozhatják az aktin polimerizációját. A PH domén mutációs analízisével kimutattuk, hogy az általunk vizsgált GRP1/ARNO PH domének nagy valószínűséggel nemcsak lipideket kötnek, hanem (membrán) fehérjéket is, s ez a kettős kölcsönhatás szükséges a PH domének sejten belüli funkciójához [3].

Munkacsoportunk másik vállalt feladata az volt, hogy megvizsgáljuk az aktin citoskeleton szabályozásában fontos szerepet játszó cortactin fehérje működését. Irodalmi adatok alapján ismeretes volt, hogy a PAK szerin/treonin kináz trombocitákban képes a cortactint foszforilálni [4]. Elkészítettünk ezért egy konstitutívan aktív PAK mutánst (T423E), melyet COS7 sejtekben expresszáltunk. Bizonyítottuk, hogy a PAK mutáns mind sejten belül, mind immunkomplexben képes a szubsztrát fehérjék foszforilációjára. Ugyanakkor megállapítottuk, hogy a PAK nem képes a cortactint foszforilálni sem *in vitro*, sem *in vivo* [5]. Ezen eredményünket azóta más munkacsoport is megerősítette [6]. Kimutattuk továbbá, hogy akár EGF jelpályában, akár olyan sejtekben, melyekben a Vav2-t over-expresszáltuk, a cortactin nem foszforilálódik tirozin oldalláncokon, holott ez több helyen előfordul az irodalomban [7]. Ráadásul a MAP kináz kaszkád gátlószereinek alkalmazásával megállapítottuk, hogy a MAP kináz sem szükséges a cortactin sejtmembránba történő transzlokációjához, illetve az azt követő membrán-fodrozódáshoz [5].

Megvizsgáltuk, hogy a cortactin fehérjének lehet-e szerepe az integrinektől kiinduló jelpályában. Elkészítettük ezért a cortactin fehérje N-terminális, illetve C-terminális doménjeit GFP fúziós fehérjeként. Ezeket a doméneket külön-külön expresszáva COS7 sejtekben azt találtuk, hogy mind a két konstrukció egyaránt gátolja a sejtek kiterülését. Ebből arra következtettünk, hogy a cortactinnak szerepe lehet az integrin-mediálta aktin citoskeleton szabályozásban. A fenti eredmény megerősítésére siRNS technikával kiütöttük a cortactint a sejtekből, ami szintén a sejt-kiterülés erős gátlásához vezetett [8]. Kimutattuk továbbá, hogy a sejt-kiterülés gátlása mellett a cortactin hiánya a sejtek adhéziójának gátlásához is vezet, ami arra utal, hogy cortactin jelenléte nélkül maguk az integrin receptorok sem működnek megfelelő módon. A sejtadhézió gátlását a cortactin hiányos sejtekben intenzíven kutatjuk. A cortactin fehérje daganatos sejtekben betöltött kóros működéséről összefoglaló cikket sikerült publikálnunk [9].

Dr. Faragó Anna professzorasszony munkacsoportjával az elmúlt években a HepG2 hepatóma sejt-vonalat vizsgálta intenzíven. Ennek a sejt-vonalnak az az egyik fő tulajdonsága, hogy sejt-sziget-csoportokban nő. Hepatocita növekedési faktor (HGF) vagy forbol észter hatására ezek a sejt-szigetek felbomlanak és a sejtek kivándorolnak (sejtszóródás) a csoportból. A cortactin szerepét vizsgálva HepG2 sejtekben igen érdekes dologra bukkantunk. Minden eddigi irodalmi adattal szemben, melyek a cortactin transzlokációját Rac-függő eseménynek gondolták, bizonyítottuk, hogy a cortactin forbol észter-függő transzlokációja májsejtekben Rac-független folyamat. Ezt a következő, egymástól független kísérleti tényekre alapozzuk: 1, a Pak szerin/treonin kináz ún. CRIB doménjével szekvesztrálva a GTP-kötött Rac fehérjét a sejtekben ez nem gátolta a cortactin transzlokációját; 2, ugyancsak nem gátolta a folyamatot, ha a Rac fehérje endogén szintjét siRNS technika segítségével közel 90%-ban gátoltuk; 3, végezetül megmértük „pull-down” technika segítségével a Rac aktiválódását forbol észterrel stimulált sejtekből. Kiderült, hogy a Rac nem aktiválódik ilyen körülmények között. Megvizsgáltuk még a cortactin fehérje foszforilációját is ezekben a sejtekben. Kimutattuk, hogy forbol észter kezelés hatására aktiválódik az Src tirozin kináz, mely foszforilálja a cortactint. Egyelőre nem tudtuk megállapítani, hogy ennek a foszforilációnak mi lehet a szerepe, ugyanis a cortactin sejt-szélre történő transzlokációját az esemény nem befolyásolta. Kimutattuk tehát, hogy HepG2 sejtekben a cortactin a sejt-szélre transzlokálódva valószínűleg részt vesz a membrán-fodrozódás, illetve a lamellipodium kialakulásában, de az Rac és Src-független folyamat (a kéziratot jelenleg állítjuk össze).

A szerződésben vállalt kutatási munkatervnek megfelelően a cortactinnal asszociálódó új fehérjéket is kívántunk azonosítani. Elkészítettük ezért a cortactin glutation-S-transzferáz (GST) fúziós fehérjéjét, melynek segítségével patkány agy kivonatából precipitáltunk fehérjéket. SDS poliakrilamid gélelektroforézis követően két fehérjét sikerült izolálnunk, melyek specifikusan kötődtek a cortactinhoz. A két fehérjét Szegeden, Dr. Medzihradzsky Katalin laborjában tömegspektroszkópiával azonosították számunkra. Az egyik fehérje a tubulin béta, míg a másik fehérje a neuron sejtekben előforduló Caskin1. Bár Dr. Ovádi Judit munkacsoportjával együttműködve megvizsgáltuk a cortactin esetleges hatását a tubulin polimerizációra, nem tudtunk értékelhető eredményt felmutatni. Ugyanakkor az állványfehérjék családjába tartozó caskin1 cDNS-t elkértük Dr. Thomas Südhof (Denver, USA) laboratóriumából, és jelenleg is intenzíven vizsgáljuk.

- [1] P. Tamas, Z. Solti, L. Buday, Membrane-targeting is critical for the phosphorylation of Vav2 by activated EGF receptor, *Cell Signal* 13 (2001) 475-481.
- [2] P. Tamas, Z. Solti, P. Bauer, A. Illes, S. Sipéki, A. Bauer, A. Farago, J. Downward, L. Buday, Mechanism of epidermal growth factor regulation of Vav2, a guanine nucleotide exchange factor for Rac, *J Biol Chem* 278 (2003) 5163-5171.
- [3] P. Varnai, T. Bondeva, P. Tamas, B. Toth, L. Buday, L. Hunyady, T. Balla, Selective cellular effects of overexpressed pleckstrin-homology domains that recognize PtdIns(3,4,5)P3 suggest their interaction with protein binding partners, *J Cell Sci* 118 (2005) 4879-4888.
- [4] C. Vidal, B. Geny, J. Melle, M. Jandrot-Perrus, M. Fontenay-Roupie, Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin, *Blood* 100 (2002) 4462-4469.
- [5] A. Illes, B. Enyedi, P. Tamas, A. Balazs, G. Bogel, L. Buday, Inducible phosphorylation of cortactin is not necessary for cortactin-mediated actin polymerisation, *Cell Signal* 18 (2006) 830-840.
- [6] B.A. Webb, S. Zhou, R. Eves, L. Shen, L. Jia, A.S. Mak, Phosphorylation of cortactin by p21-activated kinase, *Arch Biochem Biophys* (2006).
- [7] S.A. Weed, J.T. Parsons, Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly, *Oncogene* 20 (2001) 6418-6434.
- [8] A. Illes, B. Enyedi, P. Tamas, A. Balazs, G. Bogel, Melinda, Lukacs, L. Buday, Cortactin is required for integrin-mediated cell spreading, *Immunol Lett* 104 (2006) 124-130.
- [9] L. Buday, J. Downward, Roles of cortactin in tumor pathogenesis, *Biochim Biophys Acta* 1775 (2007) 263-273.