

A jelen kutatási időszakban végzett munkánkat az előző kutatási időszakban kapott eredményeinkre alapoztuk. Ezek azt mutatták, hogy a protein kináz C ellentétes szerepet játszhat a HepG2 humán hepatoma sejtek HGF, illetve forbol észter segítségével kiváltott migrációja során. Érdeklődésünk középpontjában a fiziológias szabályozási rendszer állt. A migráció fiziológias induktora a hepatocita növekedési faktor/scatter faktor. Ismert tény, hogy a HGF a foszfatidilinozitol 3-kináz aktiválódását követő Rac aktiválás útján stimulálja a folyamatos aktin-citoszkeleton átrendeződést, amely a migrációhoz vezet. A HGF a májsejtek számára elsősorban növekedési faktorként működik és a HepG2 sejtek esetében viszonylag enyhe szóródást vált ki. Ezt a szóródást tökéletesen meg tudtuk gátolni a PI 3-kináz aktivitásának gátlásával. Ezzel szemben, a protein kináz C aktivitásának a gátlásával fokozni tudtuk a szóródás intenzitását és megfigyeltük, hogy ugyanakkor, a protein kináz C aktivitásának gátlása segítségével, megnyújtja a HGF által indukált PI 3-kináz aktiválódás időtartamát. A kutatási időszak kezdetén már látszott, hogy a PKC szóródást gátló hatása összefügghet a PI 3-kináz aktivitásának a csökkentésével. Jelen munkánk fő kérdése az volt, hogy milyen mechanizmus segítségével képes ezt a PKC előidézni.

Az EGF és HGF jelpályák viselkedésének az összehasonlítása vezetett ahhoz a következtetésünkhöz, hogy a migráció feltétele a PI 3-kináz aktiválódásának hosszú időtartama. Megállapítottuk, hogy a PKC-nek a PI 3-kináz aktiválódás időtartamát csökkentő hatása csak a HGF-receptor, cMet által indított jelpályára vonatkozik, a HepG2 sejtek számára kizárólag növekedési faktorként funkcionáló és szóródást kiváltani nem képes EGF esetében a PKC gátlása nem befolyásolta a PI 3-kináz aktiválódás minden körülmények között rövid időtartamát. Az EGF receptor, szemben a cMet receptorral, csak rövid ideig aktiválódik és csak rövid ideig képes a PI 3-kináz aktiválásához szükséges dokkoló helyek tirozin foszforilációjának a fenntartására. Ezért a PI 3-kináz aktiválódás az EGF esetében hamar lecsengett. Nézetünk szerint ez lehet az oka annak, hogy az egyébként azonos jelpályákat indító EGF és HGF közül az EGF csak növekedési faktor, de egyáltalán nem képes migrációt kiváltani HepG2 sejtekben. A HGF viszont, méréseink szerint, a cMet receptor hosszú ideig fenntartott aktiválódása és a dokkoló helyek hosszan fenntartott tirozin foszforilációja segítségével, potenciálisan hosszan tartó PI 3-kináz aktiválódást tudott előidézni HepG2 sejtekben is. A HGF jelpályában aktiválódó és a migráció negatív feedback szabályozását végző PKC azonban nem befolyásolta sem a cMet receptor, sem a Gab1 fehérje tirozin foszforilációjának mértékét és időtartamát. A PI 3-kináz aktivitásának gátlása nem a dokkoló helyek tirozin foszforilációjának a csökkentésével történik (Cellular Signalling 2004, 16: 505-513).

Ezért megvizsgáltuk, hogy képes-e a PKC közvetlenül befolyásolni a PI 3-kináz aktivitását. Rekombináns enzimeken, *in vitro* végzett vizsgálataink bebizonyították, hogy a PKC izoenzim családból a PKC α , (de a PKC ϵ nem,) képes foszforilálni a p110 α /p85 PI 3-kináz katalitikus alegységét és ez a foszforiláció csökkenti a PI 3-kináz katalitikus aktivitását (BBRC 2005, 339: 122-125). A foszforiláció viszonylag hosszú időt vesz igénybe. Közvetett adataink azt valószínűsítik, hogy a HGF jelpályában, (vagy legalábbis annak migrációhoz vezető részében), elsősorban a p110 α /p85 PI 3-kináz aktiválódik. A tirozin kináz jelpályákban aktiválódó p110 α /p85, illetve p110 β /p85 izoformák enzimkinetikai paraméterei –irodalmi adatok és saját vizsgálataink alapján is – jelentősen különböznek egymástól. A HepG2 sejtekre vonatkozó vizsgálatainkban, (amelyekben a p85 regulátor alegység elleni antitesttel immunprecipitáció útján nyert PI 3-kináz aktivitását mértük), olyan mérési körülményeket használtunk, amelyek mellett túlnyomóan csak a p110 α katalitikus alegységgel rendelkező izoforma aktivitása érvényesül. Ez az aktivitás volt csökkenthető, a HepG2 sejtek forbol észteres kezelésével is. A p110 β katalitikus alegységgel rendelkező izoforma *in vitro* rendszerben mért katalitikus aktivitását a PKC nem csökkentette.

Mindezek alapján levontuk azt a következtetést, hogy a HepG2 sejtek HGF hatására indukálódó jelrendszerében a PKC α a migráció negatív feedback regulátora. A jelpályában aktiválódó PKC α közvetlenül foszforilálja - (a p85 regulátor alegység segítségével a cMet receptor, illetve a Gab1 dokkoló fehérje bizonyos foszfortirozin oldalláncjaihoz kötődő és aktiválódó) - p110 α /p85 PI 3-kináz katalitikus alegységét és ilyen módon csökkenti a migrációhoz szükséges, magas PI 3-kináz aktivitás időtartamát.

A kutatási tervünk egy másik kérdésében, amely a PKC migrációban játszott stimuláló szerepének a vizsgálatát tűzte ki célul, csak részleges eredményeket értünk el. A PKC izoenzim család minden c és n típusú tagját intenzíven aktiváló forbol észter igen erőteljes migrációra készíti a HepG2 sejteket, és a PKC aktivitás gátlása megakadályozza ezt a migrációt. Az előzőleg ismertetett eredményünkkel szemben, ez ellentmondásnak látszik. Az ellentmondást azonban feloldja néhány, Buday Lászlóval közös kísérletünk. Megfigyeltük ugyanis, hogy a forbol észterrel kiváltott aktin citoszkeleton átrendeződés teljesen más jelpályán indukálódik, mint a HGF hatására történő. Ennek legszembevetőbb jele az, hogy forbol észterrel kezelt sejtekben 15 perc után a cortactin igen erős transzlokációját látjuk a citoszolból a plazmamembránhoz, amely jelenség HGF kezelés hatására egyáltalán nem detektálható. Valószínű, hogy a forbol észterrel indukált rendszerben a cortactinnak van elsőrendű szerepe, a migrációt elindító, elágazódó aktin polimerizáció stimulálásában. A forbol észter hatására történő cortactin transzlokáció sejt-specifikus folyamat, Cos7 sejtekben

nem kiváltható. (A Cos7 sejteket azért használtuk kontrollként, mert Buday László és munkatársai részletesen vizsgálták a cortactin viselkedését ebben a sejttypusban.) Más jelpályákkal Cos7 sejtekben is kiváltható a cortactin transzlokáció, de ott ez egy PI 3-kináz-dependens folyamat, amelyben a Rac GTP-kötő fehérje fontos szerepet játszik és a folyamat meggátolható, ha a Rac-ot kivonjuk a forgalomból (egy Rac-hoz kötődő fehérje-fragmentum, a CRIB domén expressziójának segítségével). Ezzel szemben megállapítottuk, hogy a HepG2 sejtekben a cortactin forbol észterrel kiváltott transzlokációja nem igényli sem a PI 3-kináz aktivitását, sem a Rac működőképességét. Ez szolgál magyarázatul arra, hogy a protein kináz C hatására történő PI 3-kináz aktivitás csökkenése ellenére is bekövetkezhet a migráció. A forbol észter mind Cos7 sejtekben mind HepG2 sejtekben stimulálta az Src-kináz aktiválódását, de a fokozódó tirozin foszforiláció sem volt szükséges a cortactin transzlokációjához és a migrációhoz. (EMBO/HHMI Conference Proceedings, 2005)

Úgy tűnik, az aktin elágazódó polimerizációjához vezető, de minden eddig ismert és elfogadott ilyen jelátviteli mechanizmustól eltérő, sejt-specifikus folyamatot találtunk. Valószínűnek látszik, hogy a cortactin transzlokációját HepG2 sejtekben a PKC valamilyen sejt-specifikus szubsztrátjának a foszforilációja segíti elő, ez a szubsztrát azonban a HGF jelpályában aktiválódó PKC α hatására nem, csak a PKC izoenzim család forbol észterrel történő nagyon erőteljes aktiválódásakor foszforilálódik. A kérdéses sejt-specifikus szubsztrát fehérje keresését későbbi időre halasztottuk, mert a munkacsoport erőfeszítéseit egy újabb, fiziológiai (és patológiai) szempontból sokkal érdekesebbnek látszó szabályozási rendszer felderítése érdekében kellett koncentrálnunk.

A PI 3-kináz izoenzim foszforilációjának vizsgálata közben megfigyeltük, hogy bár a p110 β /p85 izoforma katalitikus aktivitását a PKC nem csökkentette, ennek ellenére, in vitro kísérletekben a PKC α , (és a PKC ϵ is) igen gyorsan és intenzíven katalizálta a p110 β katalitikus alegység foszforilációját. Kutatásainknak ezen a pontján nemzetközi kooperációt létesítettünk, partnerünk Peter Parker (Cancer Research, London). Peter Parker munkacsoportjának a közreműködésével meghatároztuk a PKC által katalizált foszforiláció helyét a p110 β alegység aminosav szekvenciájában. Egyetlen ilyen hely volt található, amely nem volt azonos a p110 β autofoszforilációs helyével és sokszorosan intenzívebben foszforilálódott annál. A PKC-dependens foszforilációs hely ismeretében, ugyancsak Peter Parker munkacsoportjának közreműködésével, egy olyan oligopeptid ellen termeltettünk poliklonális antitestet, amely peptid a foszforilált aminosavon kívül, az azt körülvevő aminosav szekvenciát tartalmazta. Az így kapott antitest, rekombináns enzimekkel végzett in vitro kísérleteinkben, (megfelelő körülmények között), kizárólag a p110 β alegység PKC által

foszforilált formájával reagált. Ezt az antitestet használtuk annak a vizsgálatára, hogy foszforilálódik-e sejten belül a p110 β katalitikus alegység.

A sejten belüli foszforiláció létezését HepG2 sejtekben ki tudtuk mutatni az antitest segítségével, Cos7 sejtekben azonban nem. Ez a folyamat is sejt-specifikusnak látszik. A további kísérletek azt bizonyítják, hogy ez a májra jellemző, de az eddigi érdeklődésünk középpontjában álló HGF-PCK jelpályától teljesen független, másik regulációs rendszer része lehet. A p110 β foszforilált formája HepG2 sejtekben ugyanis csak akkor volt kimutatható, ha a sejteket a foszfatáz aktivitást gátló calliculinnal kezeltük. A PKC-t aktiváló forbol észterrel viszont sem calliculin hiányában, sem annak jelenlétében nem tudtuk fokozni a foszforilált p110 β mennyiségét és a p110 β calliculin jelenlétében mutatott foszforilációját egyáltalán nem csökkentette a bisindolylmaleimid I, amely az in vitro vizsgálatokban egyértelműen gátolta a PKC által okozott foszforilációt és HepG2 sejtekben is felfüggesztette a PKC hatásait. A fentiek alapján a p110 β /p85 PI 3-kináz katalitikus alegysége ugyan valóban foszforilálódik a HepG2 sejtekben, de ezt a foszforilációt sejten belül nem a PKC katalizálja. Más protein kinázokat gátló szer hatását is megvizsgálva és összevetve az irodalomból ismert gátlási adatokkal, elképzelhető, hogy a foszforilációért esetleg a foszforiláz kináz lehet felelős. Az a tény azonban, hogy a foszforiláció csak a foszfatáz gátló calliculin jelenlétében volt detektálható, ahhoz a feltevéshez vezetett, hogy a p110 β alegység foszforiláltsági állapota a defoszforiláció szintjén van szabályozva elsősorban. Minthogy a májban a PP1 foszfatáz a ciklikus AMP szintjének emelkedésekor gátlódik, megvizsgáltuk ezt a lehetőséget. Megállapítottuk, hogy dibutiril-cAMP-vel kezelt HepG2 sejtekben a p110 β alegység foszforilációja calliculin nélkül is kimutatható. A p110 β /p85 PI 3-kináz izoforma katalitikus alegységének foszforilációja tehát a cAMP jelpálya egyik komponense lehet a májban. A PP1 foszfatáz cAMP hatására történő gátlása stabilizálja a foszforilált formát.

A zárójelentés megírásának napján ezen a ponton tartanak a kísérleteink, amelyeket természetesen tovább folytatunk. A p110 β /p85 PI 3-kináz foszforilációjának kezdeti vizsgálatáról eddig csak hazai fórumon tartott előadásban (Biokémiai Egyesület Vándorgyűlése, 2006) számoltunk be. Egy lehetséges közlemény körvonalai a fenti eredmények alapján éppen mostanra rajzolódtak ki. Megfontolandónak látszik azonban az a lehetőség is, hogy még egy lépéssel tovább megyünk a közlés előtt. Kérdés ugyanis, hogy mi lehet a funkciója ennek a foszforilációnak, minthogy a p110 β /p85 PI 3-kináz katalitikus alegységének foszforilációja in vitro kísérletekben egyáltalán nem gátolta az enzim katalitikus aktivitását. Feltételezésem szerint ez a foszforiláció, amelyet a májban a cAMP stimulál, az inzulin hatás bizonyos részének a szelektív gátlásában játszhat szerepet. Irodalmi adatok arra

utalnak, hogy májban, az inzulin jelpályának a glikogén szintézis fokozása felé vezető útja a p110 β /p85 PI 3-kináz aktiválódásán keresztül indul. Ugyancsak irodalmi adatok sugallják, hogy a II. típusú diabetes kialakulásának egyik komponense éppen ennek az útvonalnak a szelektív elakadásában keresendő. Elképzelhetőnek látszik az a lehetőség, hogy bár a p110 β alegység foszforilációja nem gátolja a katalitikus aktivitását in vitro, de a foszforiláció esetleg úgy változtatja meg a dimer fehérje szerkezetét, hogy a regulátor alegység kevésbé tud az inzulin jelpályában képződő foszfortirozin dokkoló helyhez (ez valószínűleg az inzulin receptor szubsztrát 2) kötődni. Így azután, a foszforiláció sejten belül mégis gátolni tudja a p110 β /p85 PI 3-kináz aktiválódását. Ennek a folyamatnak a lehetőségét mindenképpen meg kell vizsgálnunk. Amennyiben ez a feltevés igaznak bizonyulna, nem csupán az alapkutatót érintő eredményünk lenne nagyon izgalmas, de a további vizsgálatokhoz nélkülözhetetlen, kooperációban kifejlesztett antitest is komoly érdeklődésre tarthatna számot.

A kutatási pályázat benyújtásakor azért kértem, hogy a téma futamideje három év legyen, mert 2007 végén hivatalosan nyugdíjba vonultam és a projekt pénzügyi részét le szeretném zárni. A PI 3-kináz cAMP-dependens foszforilációjára vonatkozó vizsgálatokat azonban folytatjuk, a munkáról két éven belül mindenképpen közlemény fog megjelenni, amelynek első szerzője Sipeki Szabolcs.