

JELÁTVITEL ÉS IMMUNGENOMIKA: ÚJ EREDMÉNYEK AZ IMMUNSEJTEK JE- LÁTVITELI FOLYAMATAINAK VIZSGÁLA- TÁBAN

Sármay Gabriella

a biológiai tudomány doktora, egyetemi tanár
Eötvös Loránd Tudományegyetem, Immunológiai Tanszék
sarmayg@cerberus.elte.hu

Kertész Ákos

PhD-hallgató
Semmelweis Egyetem, Budapest

Angyal Adrienn

PhD-hallgató
ELTE Immunológiai Tanszék

Maus Máté

PhD-hallgató
ELTE Immunológiai Tanszék

Medgyesi Dávid

pre-doktor
MTA Kutatócsoport, ELTE Immunológiai Tanszék

Bevezetés

Jelátvitel alatt azt a folyamatot értjük, amelynek során a sejt jelfogó molekulái (receptorai) felől információátadás történik a sejt mag irányába, amire a sejt funkcióinak megváltoztatásával válaszol. A receptorok ligandum felismerését a sejten belül számos enzim, köztük kinázok, foszfatázok, foszfolipázok aktiválódása követi. A jelátvitel során fehérjehálózatok lépnek kölcsönhatásba, enzimek aktiválódása és inaktiválódása, sejten belüli és membránfehérjék átrendeződése megy végbe, és az egymásra épülő, kaszkádszerűen bekövetkező események végén a transzkripció faktorok aktiválódása következtében génátírási folyamatok kezdődnek el a sejt magban. A legtöbb jelátvivő fehérjét fejlődéstani vizsgálatok, illetve tumorsejtek vizsgálata alapján írták le mint a sejt differenciálódását és a sejt osztódását szabályozó molekulákat. Az immunsejtek antigénfelismerő receptoraikon keresztül ismerik fel a

kórokozókat, a szervezet számára idegen anyagot, ami elindítja a sejtaktiválódáshoz vezető jelátviteli folyamatot. Az antigénreceptor mellett számos más receptor, például a mintázatfelismerő receptorok, a citokin és kemokin receptorok, az ellenanyagmolekulák konstans részét felismerő Fc receptorok, a komplement receptorok stb. közvetítésével is elindulnak jelátviteli folyamatok T- és B-limfocitákban, amelyek összegződnének, és végső soron az immunválasz kialakulásához vezetnek.

A jelátvitel folyamata számos ponton meghibásodhat, ami – ha a hibát a szervezet vagy az adott sejt nem tudja kijavítani – kóros folyamatok kialakulását eredményezheti. Ilyen lehet például a korlátlan sejtburjánzás vagy éppen a sejtihalál, vagy egyes fehérjék túl- illetve alultermelése. Bizonyos immunológiai betegségek egyértelműen a jelátvitelben részt vevő fehérjék hibáira vezethetők vissza – ilyen például a *X kromoszómához kötött Bruton-típusú agammaglobulinémia*, amit

a *Bruton-típusú protein tirozin kinázban* bekövetkező mutáció eredményez, vagy a szintén *X kromoszómához kapcsolt limfoproliferatív szindróma* (XLP), ahol a betegségért egy *SH2 domént tartalmazó adaptor protein* (SAP) hiánya felelős; míg más betegségek esetében csak valószínűsítik ezt a kapcsolatot.

Az utóbbi években megismert jelátvivő fehérjék száma ugrásszerű növekedést mutatott, ami nem könnyíti meg a tájékozódást ezen a gyorsan fejlődő területen. A molekuláris kölcsönhatások felderítése az egyes jelpályákon belül és azok között, továbbá a jelátvitel – géinaktiválódás – funkció összefüggéseinek felderítése a genom szintjén lehetővé teszi az egyes betegségekért felelős gének megismerését. Egyetlen nukleotid megváltozása a genomban a kódolt jelátvivő molekula funkcionális megváltozásával járhat, ami a jelátviteli hálózat működés-képtelenségét vagy túlműködését eredményezheti. Az immungenomikai kutatások eredményei alapján azonosítható molekulák érthető módon fontos célpontjai lehetnek a korszerű gyógyszerfejlesztésnek.

A Budapesten 2004. október 3–7. között megrendezésre került 1. International Basic and Clinical Immunogenomics (BCI) konferencián elhangzott előadások az immunsejtek jelátvitelének különböző aspektusaival foglalkoztak. Beszámoltak a *szignált adó limfocita aktivátor molekula* (SLAM) meglepő szerepéről az intracelluláris bakteriális fertőzések elleni védekezésben; a kizárólag antigén receptorok által aktiválható *szerin/treonin kináz* (PKD) működéséről a T-sejtek fejlődése során; a hisztaminnak a *citokin receptorok* jelátviteli folyamatait befolyásoló szerepéről; és megismerkedhettünk egy genomiai szintű, nagy átteresztőképességű szűrőre alapuló, új technológiával, amelynek segítségével számos új potenciális *onkogént*, illetve *tumorszuppresszort* azonosítottak. Saját előadásunk egy fontos adapter

fehérjecsaldót, a *Grb2- asszociált kapcsoló fehérjét* (*Grb2 associated binder – Gab*) mutatott be. Mindezekon kívül előadás hangzott el a szarvasmarha *neonatalis Fc receptor* klónozásáról, és ennek gyakorlati jelentőségéről új vakcinációs eljárások fejlesztésében, amelynek részletes ismertetésére külön közleményben kerül sor.

A továbbiakban röviden ismertetjük az elhangzott előadásokat, majd saját eredményeinket foglaljuk össze.

A SLAM és SAP géncsaládok közötti kölcsönhatások mikrobiális fertőzésekre adott válasz során

A SLAM receptorokhoz kötődő SAP adapter molekulát kódoló gén hiánya tehető felelősé az *X kromoszómához kapcsolt limfoproliferációs betegség* (XLP) kialakulásáért. Ennek leírásában magyar kutató, Lányi Árpád is részt vett (Morra, 2001). A SLAM receptorcsalád tíz immunoglobulin-szerű receptorból áll, amelyek különböző mértékben expresszálódnak hemopoetikus sejtekben. A SLAM családba tartozó receptorok legtöbbjének jelátadása a SAP vagy az EAT2 adaptereken keresztül, a sejtmembrán lipid raftjaiban jelen levő, *src* családba tartozó kinázok közvetítésével történik. Cox Terhorst és csoportja (Boston, USA) jelen vizsgálataiban a SLAM hiányának lehetséges szerepét vizsgálták különböző modellekben. Megfigyelték, hogy az XLP-ben szenvedők érzékenyek virális fertőzésekre, továbbá, hogy a SLAM-re vagy a receptorcsalád másik tagjára (Ly108) hiányos egerek a patogén baktériumokat nem tudják hatékonyan eltávolítani. Mindezek alapján felvetődött a kérdés, hogy szerepet játszanak-e a SLAM család fehérjéi a fagocitózis során, és a baktériumok sejten belüli elpusztításának folyamatában. Az eredmények azt mutatták, hogy a SLAM ellenőrzése alatt tartja a baktériumok elpusztításában fontos, reaktív oxigéngyökök képződéséhez vezető biokémiai útvonalakat a fagoszómákban.

Ennek és más új adatoknak a tükrében valószínűnek látszik, hogy az immunsejtek egyik specifikus receptora a SLAM több jelpályájában is szerepet játszik, és nemcsak a limfociták szaporodásához vezető jelátviteli lépéseket, hanem a makrofágok, neutrofilek és dendritikus sejtek fagoszómáiban zajló, oxidatív folyamatokat is szabályozhatja.

Szerin kinázok szabályozó szerepe és funkciója T-sejtekben

Dorin Cantrell kutatócsoportja (Dundee, UK) a T-sejteket szabályozó szerin kinázokkal foglalkozott. Kifejlesztettek egy modellt, amelyben T-sejtekre specifikus módon kiütötték a foszfoinozítid-függő kináz 1-et (PDK1) kódoló gént, majd a különböző T-sejt populációk kifejlődését követték nyomon. A sejtek túléléséhez szükséges jelek közvetítésében fontos PDK1 aktiválódásának előfeltétele a foszfatidil inozitol 3-kináz (PI3-K) aktiválódása, amely a foszfatidil inozitol 3,4,5-triszofzfát (PIP3) keletkezését eredményezi a sejtmembránban. Eredményeik szerint a PDK1 alapvető szerepet játszik az érett T-sejtek kifejlődésében, amíg az effektor T-sejtek kialakulása a PI3-K-tól függetlennek bizonyult. Tehát a PI3-K/PDK1 jelpálya különbséget tesz különböző fejlődési stádiumban levő T-sejtek között, és a sejtek differenciálódási fokától függően kapcsolódik be a fejlődési folyamat szabályozásába.

Ugyanez a csoport beszámolt egy másik szerin/teonin kinázzal, a protein kináz D1 (PKD1)-vel kapcsolatos vizsgálatairól is. A PKD1-re jellemző, hogy expressziója limfocitákban igen magas, és hogy szelektíven az antigén receptorok által elindított jelek aktiválják. Kísérletes rendszerükben különféle konstrukciókkal olyan sejteket hoztak létre, amelyekben a PKD1 vagy csak a sejtmembránon, vagy csak a citoplazmában jelent meg. A vizsgálatokból kiderült, hogy csak a sejtmembránon kifejezett PKD1 jelenlétében fejlődhetnek ki a CD4/CD8 dupla

pozitív T-sejtek, a citoplazmában jelen levő PKD1 ezt nem tette lehetővé, jelezve, hogy a sejten belüli térben való elhelyezkedés meghatározó szerepet játszik a PKD1 által kiváltott jeltovábbítás során.

A hisztamin hatása a STAT aktiválódásra emberi helper T-sejtekben

Allergiás betegségekben a segítő (helper) TH1/TH2 limfociták közötti egyensúlyt a gyulladási folyamatok mediátorai, például a hisztamin, szabályozzák. A CD4+, CD25+ regulátor T-sejtekben a jelátadás a Janus-kinázok (JAK) és a jelátvitelért és transzkripcióért felelős faktorok (Signal Transducers and Activators of Transcription – STAT) kölcsönhatásán keresztül valósul meg. Ennek során a JAK foszforilálja a STAT molekulákat, következésképpen azok leválnak a JAK-ról és SH2 doménjeik közvetítésével dimereket képeznek egymással, majd bejutnak a sejtmagba, ahol génátírási folyamatokat indítanak el.

Friedhelm Diel munkacsoportja (Fulda, Germany) azt vizsgálta, milyen hatással van a hisztamin a citokin receptorok által közvetített jelpálya fontos elemeire, a STAT1-re és a STAT6-ra. Összehasonlították atópiás és nem atópiás egyének limfocitáinak *ex vivo* osztódó képességét IL-4 és IL-13 hatására. A hisztamin egymaga nem befolyásolta a STAT1 aktivációt sem az atópiás, sem a kontrollcsoport mintáiban, míg mind a hisztamin, mind az IL-4/IL-13 emelte a STAT6 foszforilációt az atópiás csoport mintáiban. Az eredmények arra utalnak, hogy a hisztamin első sorban a különböző allergiás betegségekben szenvedő, atópiás betegeknél modulálja az IL-4/IL-13 által kiváltott JAK/STAT foszforilációs folyamatot. Ennek során a STAT1 expresszió csökken, miközben a STAT6 foszforiláció emelkedik. Az eredmények elősegítik a regulátor T-sejtek szerepének jobb megértését, és bizonyítják az atópiás embereknél fokozottabban érvényesülő autokrin TH2-sejt stimulációt és a TH1 citokintermelés

visszaszorulását, ami hozzájárul az allergiás betegség súlyosbodásához.

Az NFκB transzkripciós faktor új szabályozó molekuláinak azonosítása

A Novartis egyik csoportjából Enrique Saez (San Diego, CA, USA) széleskörű, genomális szinten végzett vizsgálatokról számolt be. Körülbelül 25 ezer (teljes hosszúságú) cDNS és 15 ezer siRNS felhasználásával olyan vizsgálati *microarray* rendszert alakítottak ki, melynek segítségével a génavtivitásokat és azok funkcionális következményeit tudják vizsgálni. E nagy áteresztőképességű szűrés alkalmas párhuzamosan, különféle sejttypusokban, több jelpálya számos fehérjét kódoló gén aktivitásának nyomon követésére. Az AP-1 illetve a p53 jelpálya vizsgálata során azonosítottak számos feltételezett és új onkogént, valamint tumorsuppresszor molekulát. Ezt a technológiát alkalmazták az NFκB jelpályát szabályozó fehérjék azonosításához. Találtak számos olyan cDNS-t, amelyek túlzott expresszió esetén erősítették a tumor nektrózis faktorról (TNF) kiváltható, NFκB által aktivált génextpressziót. Biokémiai módszerekkel igazolták, hogy az azonosított molekulák közül kettő az inhibitor kB (IkB) komplex része. Ez a technológia új gyógyszer-célpont-molekulák azonosítását teszi lehetővé.

Egy többfunkciós adapter, a Grb2 asszociált kapcsoló fehérje (Gab) család

Az adapter fehérjék a sejten belüli jelátvitel fontos szabályozói. Központi szerepet töltenek be a sejtaktiválódás és sejtfejlődés folyamatában. Leglényegesebb tulajdonságuk, hogy nem rendelkeznek enzimaktivitással, és szerepüket a jeltovábbításban részt vevő, különböző molekulák összekapcsolása útján fejtik ki, például szabályozhatják enzimek aktivitását. Azokat az adaptereket, amelyek számos különböző molekulával (fehérjékkel, lipidekkel) képesek kapcsolatot létesíteni, és így biztosítani a működésükhöz szükséges

szerkezetet vázfehérjéknek (scaffolding) is nevezzük. A jelátadó molekulák adapterekhez való kötődésének következménye lehet a sejten belül egymástól függetlenül elhelyezkedő fehérjék áthelyeződése a citoplazmából a sejtmembrán belső felére, vagy egyes enzimek (kinázok, foszfatázok, foszfolipázok) rendeződése szubsztrátjuk közelébe. Az adapterek által összekapcsolt fehérjék konformációja megváltozhat, ami az enzimek aktiválódását eredményezi, és növeli a jeltovábbítás hatékonyságát.

Az adapterek funkcióját olyan szerkezeti modulok biztosítják, amelyek képesek bizonyos más fehérje vagy lipid szerkezeti egységekhez szelektíven kapcsolódni. Az adapter fehérjék és más jeltovábbító molekulák kapcsolódásának három legfontosabb fajtája: a *src* homológ 2 (SH2) domének kötődése a foszforilált tirozin maradványokat tartalmazó motívumokhoz, az *src* homológ 3 (SH3) domének és a prolinban gazdag szekvenciák között létrejövő kapcsolat, és a *plekstrin* homológ (PH) domének kötődése a sejtmembrán többszörösen foszforilált foszfoinozidideihez, elsősorban a foszfatidil inozitol 3,4,5-trisziszfoszfáthoz (PIP3). Az SH2, SH3 és PH domének a különböző jeltovábbító molekulákban, kinázokban, foszfatázokban, foszfolipázokban és adapter fehérjékben eltérő számban és kombinációban fordulnak elő. Az adapter fehérjék a sejtaktiválódás során tirozin kinázok célpontjává válhatnak, majd a foszforilált tirozint tartalmazó motívumaikon keresztül további fehérjekapcsolatokat létesíthetnek (Pawson, 1997; Schlessinger, 2000). Az adapter fehérjék kölcsönhatásaik következtében sokszor vesznek részt negatív vagy pozitív visszacsatolási folyamatokban, így a sejtaktiválódás finom szabályozásáért tehető felelőssé.

A Gab adapterfehérjék szerkezete

A Gab/Dos család adapterfehérjei nevüket egy velük kölcsönhatásba lépő másik adapterrel

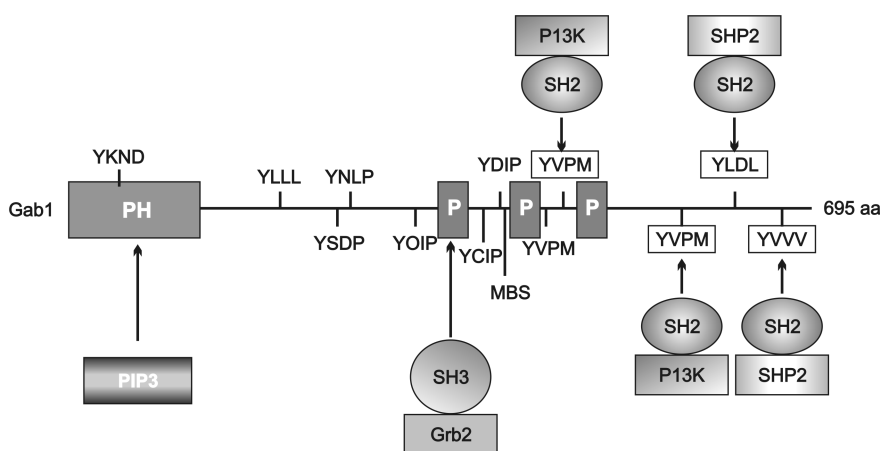
(Grb2) való kapcsolódásuk apján kapták: *Grb2 associated binder*. Számos sejt típusban megtalálhatók, és sokféle receptor jelátadási folyamataiban vesznek részt. Először *Drosophila*-ban mutattak ki ilyen funkcióval rendelkező fehérjét (Dos), de távoli rokonmolekulákat már a *Cenorhabditis elegans*-nál is találunk (Soc). Emlősökben három izoformát, a Gab1, Gab2, és Gab3 fehérjét írták le (Nishida, 2003).

Valamennyi Gab adapter rendelkezik *PH* doménnel, amelynek segítségével az eredetileg a citoplazmában jelen levő adapter fehérje áthelyeződhet a sejtmembránhoz; több *prolinban gazdag szekvencia*-részlettel; valamint számos *tirozinmaradékkal*, amelyek foszforilálódnak a különféle receptorok ligandum felismerését követő tirozin kináz aktiválódás eredményeként. A foszforilált motívumok több fehérje SH2 doménjével kapcsolódhatnak: eddig a *foszfolipáz C gamma* (PLC γ , az *SH2* domént tartalmazó fehérje tirozin foszfatáz (SHP-2), a *foszfatidilinozitol 3-kináz* (PI3-K) p85 alegysége, a Crk kináz, valamint egy másik adapter fehérje (Shc) közvetlen kötődéséről számoltak be. A foszforilált Gab1- SHP-2 kölcsönhatás bizonyítottan, a PI3-K-vel való kölcsönhatás

feltehetően fokozza az enzimek aktivitását, de az még nem tisztázott, hogy a kölcsönhatások közül melyiknek milyen sejtben van valóban fiziológias jelentősége (Gu, 2003) (1. ábra).

A Gab fehérjék sejtben belüli lokalizációja

A Gab adapter fehérjék sejtmembránhoz való kötődése nélkülözhetetlen funkciójuk kifejtése szempontjából. Ezt a különböző sejt típusokban más-más mechanizmus biztosítja. A hepatocita növekedési faktor receptor (HGFR) esetében például a Gab1 a receptor Met doménjén és a Grb2-n keresztül kapcsolódik a receptor intracelluláris részéhez (Bardelli, 1997). Az IL-3 és a vele rokon szerkezetű receptoroknál a Shc-Grb2 adapterpáros biztosítja a Gab1 és a receptorok közös b láncá közötti kapcsolatot (Gu, 1998; Nishida, 1999), az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) (Holdago-Madruga 1996) és a B-sejt receptor (BCR) esetében pedig a Gab1 PH doménje a PI3-K által termelt PIP3-hoz kapcsolódik a sejtmembránban (Hibi, 2000). Ez utóbbi kölcsönhatás egyben a PI3-K aktivitását pozitív visszacsatolás útján fokozza, hiszen a PIP3-hoz kötődött és foszforilálódott Gab1 újabb PI3-K molekulák



1. ábra • A Gab1/2 adapter fehérjék molekuláris kölcsönhatásai

megkötésére, s egyre több PIP₃ termelés kiváltására képes.

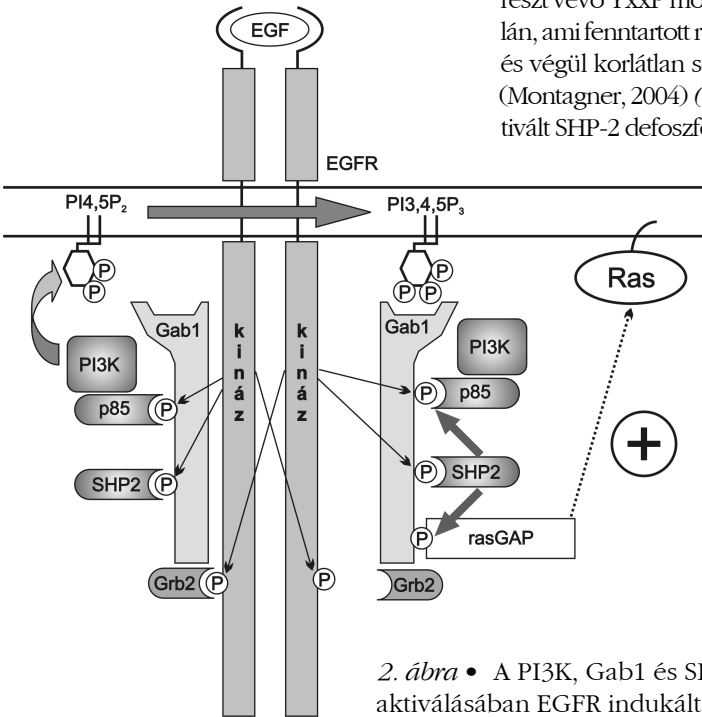
A Gab fehérjék foszforilációja, és ennek következményei

A sejtmembránhoz különbözőképpen kötődött Gab adapter fehérjét tirozin kinázok foszforilálják. Ezek lehetnek maguk a kináz aktivitással rendelkező növekedési faktor receptorok (EGFR, HGFR), vagy receptorhoz asszociált, az *src* vagy a *ZAP70* családba tartozó kinázok, mint a B-sejt receptor (BCR), illetve a T-sejt receptor (TCR) komplexek által közvetített jelátvitel során. B-sejtekben a *lyn* és a *fyn* kinázok játszhatnak szerepet a Gab foszforilációjában (Gu, 2003).

A szerin/treonin kinázok közé tartozó, extracelluláris szignálok által regulált kinázok (Erk) ugyancsak foszforilálhatják a Gab1-t, de ezzel kapcsolatban ellentmondásos eredmények láttak napvilágot. Az Erk2 a 477 Thr foszfori-

lálásával fokozhatja, míg az EGF receptoron keresztül elindított jelátvitel során egy másik, nem azonosított szerin/treonin foszforiláció útján gátolhatja a Gab1 tirozinon történő foszforilációját, és így a PI3-K kötődését (Yu, 2002). T-sejtekben IL-2 hatására a Gab2 Erk közvetített foszforilációja gátolja a tirozin foszforilációt, így az SHP-2 kötődését és aktiválódását, ami negatív visszacsatolással az Erk aktivitás gátlásához vezet (Arnaud, 2004).

Az SHP-2-Gab kölcsönhatás többféle szabályozás lehetőségét rejti magában. EGF receptorok esetében leírták, hogy a Gab1 által aktivált SHP-2 defoszforilálhatja a Gab1 valamelyik foszforilált tirozinját, vagy valamelyik, hozzá kötődő, esetleg a közelében levő fehérjét. Újabban leírták a p21 ras fehérje negatív szabályozásában részt vevő, GTP-áz aktivitást fokozó fehérje (rasGAP) SHP-2 által közvetített szabályozását tumorsejtekben. Az SHP-2 defoszforilálja a rasGAP kötődésében részt vevő YxxP motívumot a Gab1 molekulán, ami fenntartott ras és Erk aktiválódáshoz és végül korlátlan sejtosztódáshoz vezethet (Montagner, 2004) (2. ábra). A Gab1 által aktivált SHP-2 defoszforilálhatja a PI3-K-t kötő



2. ábra • A PI3K, Gab1 és SHP-2 szerepe a Ras aktiválásában EGFR indukált jelátvitelben

két Gab1 motívumot is, így inaktíválhatja a PI3-K-t (Gu, 2003).

A Gab fehérjék által betöltött biológiai funkciók

A biológia funkciókat vizsgálva a kép még összetettebb. Az eddig leírt Gab izoformák különféle funkciókkal rendelkeznek, és más a működésük az egyes sejttípusokban a különféle receptorokon keresztül elindított jelátadás során is.

A Gab1 gén kiütése embrionálisan letális, a növekedési faktor receptorokon (EGFR, HGFR) és citokín receptorokon keresztül közvetített defektív jelátvitel következtében az élőlény kifejlődése lehetetlenné válik. Ezért a Gab1 funkcióját a géniütött állatokból nyert főtális májsejtekkel újratelepített kiméra egerekben tanulmányozták. A kiméra állatok vad típusú Gab1-gyel való transzfektálását követően csökkent mértékben alakult ki a T-sejtektől független-2 típusú antigénekre adott válasz, és kiderült, hogy a Gab1 negatív szabályozó hatásában az SHP-2 kötőhelynek van szerepe (Itoh, 2002).

Ezzel szemben a Gab2 géniütött állatok életképesek, de hízósejtheik működése gyengül, az azonnali túlérzékenységet kiváltó mediátor anyagok felszabadulása erősen csökkent, és ez a jelenség valamilyen módon Gab2 PI3-K kötőhelyéhez kapcsolódik (Nishida, 2003). T-sejtekben a foszforilált Gab2 számos SH2 doménnel rendelkező fehérjéhez kapcsolódik, ezek között azonosították a ZAP70-et, a CD3 ζ láncát, SHP-2-t és a LAT adaptor fehérjét. TCR-en keresztül történő sejtaktiválás során a Gab2 hatékony negatív visszacsatolási körben vehet részt azáltal, hogy a jelátadást negatívan szabályozó molekulákat toboroz a lipid mikrodoménekbe (raftokba), amelyek kompetícióba lépnek a jelátvitelt pozitívan szabályozó fehérjékkel (Yamasaki, 2003). A szerzők feltételezik, hogy a Gab2 az antigén specifikus aktiválást gátló hatással rendelkezik T-sejtekben, és ezt

legnagyobb részben az SHP-2–Gab2 kölcsönhatás közvetíti. A T-sejt receptor közvetített válasz során a Gab2 PI3-K-től függő negatív szabályozó hatását is leírták (Pratt, 2000). Ugyanakkor a citokín receptorok által közvetített jelátadásnak is fontos eleme a Gab2, és ebben az esetben pozitív szabályozó szerepet játszik (Nishida, 1999).

A Gab3 géniütött egerekben nem találtak semmilyen jelentős különbséget a vad típusú egerekkel összehasonlítva (Gu, 2003).

Mindezek alapján elmondható, hogy a Gab családba tartozó adaptor fehérjék a jelátadás során mind pozitív, mind pedig negatív szerepet betölthetnek. Ez függ a sejt- illetve a jelátadást elindító receptor típusától, és az abban kifejezésre jutott Gab izoformától. A szabályozó funkció előjelét befolyásolhatja a Gab-hoz kötődő molekulák foszforilációs állapotának az adott jel hatására bekövetkező változása, és a Gab sejten belüli lokalizációja. Mindezek a tényezők meghatározók abból a szempontból, hogy a Gab adapter fehérje a megfelelő időben a megfelelő helyen legyen a sejtben, és megszabják a Gab által összetartott molekula komplex összetételét is.

A Gab1 és Gab2 adapter fehérjék szerepe B-limfocitákban

Saját vizsgálatainkban arra kerestünk választ, hogy milyen jelpályák állnak a Gab adaptor család két tagja, a Gab1 és a Gab2 szabályozása alatt B-limfocitákban. Az irodalmi adatok szerint a BCR-en keresztül kiváltott tirozín kináz aktiválódás következtében a Gab1 foszforilálódik, és képes közvetlen kölcsönhatásba lépni az SHP-2, PI3-K, PLC γ és a Shc fehérjékkel. A Grb2 kötődése konstitutív, de ennek mértékét a BCR-en keresztül történő stimuláció fokozza (Ingham, 1998).

Nem tisztázott azonban a Gab adapter fehérjék pontos szerepe B-sejtekben, és annak módja sem, hogy miképpen szabályozzák a Gab fehérjék a BCR által elindított jelátviteli folyamatokat. Korábbi kísérleteink során ki-

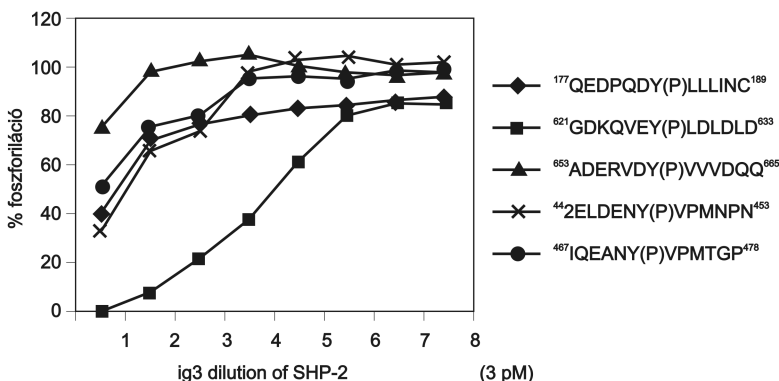
mutattuk, hogy a IIb típusú Fc γ receptoroktól (Fc γ RIIb) függő B-sejt aktivációgátlás egyik lehetséges mechanizmusa a Gab1 közvetítésével valósulhat meg. Amikor az Fc γ RII-t és a BCR-t IgG tartalmú immunkomplexek összekapcsolják, a BCR által aktivált *lyn* tirozin kináz foszforilálja az Fc γ RIIb-t is. Ennek következtében az SHP-2 fehérje foszfatáz kötődik az Fc γ RIIb tirozin alapú inhibíciós motívumához (ITIM). Ugyanakkor azonban a Gab1 is foszforilálódik és kapcsolódik az SHP-2 másik SH2 doménjéhez. A komplexen belül az Fc γ RIIb ITIM és a Gab1 foszforilált motívuma együttesen aktiválja az SHP-2-t, ami azonnal defoszforilálja a Gab1 PI3-K-t kötő motívumát. Ennek eredményeként a PI3-K aktivitás és a PIP3-függő további folyamatok gátlódnak (Sármay, 1997; Koncz, 2001).

A Gab1 foszfopeptidek SHP-2-t aktiváló hatása, és funkcionális vizsgálata

Annak tisztázására, hogy az egyes foszforilált Gab1 motívumok hogyan befolyásolják az SHP-2 foszfatáz aktivitását, először a Gab1 foszforilált motívumainak megfelelő, szintetikus foszfopeptidek SHP2 aktiváló hatását

vizsgáltuk. Az SHP-2 két SH2 doménnel rendelkezik, és korábban kimutatták, hogy a foszfatáz aktiválásához mindkét SH2 doménnek kapcsolatba kell lépnie tirozinon foszforilált motívummal. Vizsgálataink során két SHP-2-t kötő és két PI3-K-t kötő motívumnak megfelelő foszfopeptidet hasonlítottunk össze. A foszfatáz aktivitás mérésére avidinnel fedett ELISA lemezekre mértük az előzetesen SHP-2-vel kezelt, biotinált foszfopeptideket, majd a foszfortirozintartalmat specifikus ellenanyag segítségével mértük vissza. Az YLDL motívumot tartalmazó foszfopeptid hatékonyan aktiválta a rekombináns foszfatázt, míg a másik három peptid lényegesen kisebb aktivitást mutatott, jelezve, hogy a két *SHP-2-hez kötődő motívum funkcionális szerepe nem azonos* (3. ábra).

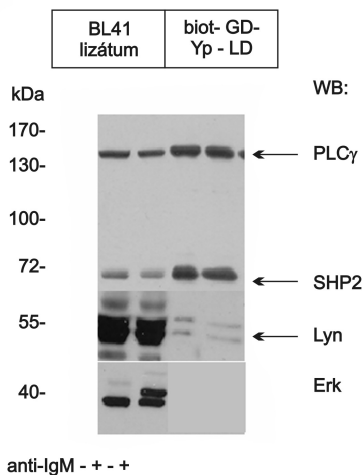
Annak vizsgálatára, hogy a foszfopeptidek közül melyik lehet a foszfatáz szubsztátja, a biotint nem tartalmazó, SHP-2-t jól aktiváló peptidet (YLDL) együtt adtuk az SHP-2-höz a biotinált, alacsony foszfatázaktiváló képességű peptiddel, és az utóbbi foszforilációs állapotát mértük. Az eredmények azt mutatják, hogy a PI3-K kötő motívum hatékonyabban defoszforilálódik az SHP2-t



3. ábra • Gab1 foszfopeptidek SHP-2 aktiváló hatásának összehasonlítása. A biotinált foszfopeptideket rekombináns SHP2 különböző mennyiségeivel inkubáltuk 37 °C-on egy órát, majd a mintákat avidinnel fedett ELISA lemezekre vittük. Az inkubálási idő leteltével a lemezt mostuk, majd a reakciót anti-foszfortirozinnal hívtuk elő.

aktiváló YLDL peptid jelenlétében, ami arra enged következtetni, hogy a PI3-K kötő foszfopeptidek bár nem aktiválják az SHP-2-t, jó szubsztrátjai a foszfatáznak. Ez az eredmény alátámasztja korábbi adatainkat, melyben a BCR-FcγRIIb keresztökötött mintákban kimutattuk, hogy az SHP-2 aktiválódása következtében a Gab1-hez kötődő PI3-K mennyisége és a PI3-K aktivitás csökkent (Koncz 2001).

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a két SHP-2 illetve PI3-K-t megkötő foszfopeptid még milyen jelátviteli molekulákkal léphet kölcsönhatásba. A biotinált peptideket avidinnel fedett gyöngyökhöz kötöttük, és a kapcsolódó molekulákat elektroforézist követően Western blot módszerrel mutattuk



4. ábra • A Gab1⁶²¹GDKQVEY(P)LDLDDLD⁶³³ motívumának megfelelő szintetikus peptidhez kötődő fehérjék azonosítása. Kezeletlen és anti-IgM-mel két percig kezelt sejt lizátum mintákat (első két minta), illetve a szilárd fázishoz kötött biotinált foszfopeptidhez kötődő fehérjéket (harmadik és negyedik minta) SDS-poliakrilamid elektroforézissel szétválasztottuk, a mintákat nitrocellulóz membránra vittük át, majd PLCγ, SHP-2, Lyn és Erk specifikus ellenanyagokkal hívtuk elő a membránt (Western blot, WB).

ki. Az SHP-2-t megkötő peptidek mintáiban PLCγ és *lyn* tirozin kináz jelenlétét tudtuk még kimutatni, míg a PI3-K kötő peptidek más fehérjével nem reagáltak (4. ábra). Ennek alapján feltételezzük, hogy az SHP-2 vetélkedhet a PLCγ-vel a Gab1-hez való kötődésért, és így a Gab1 befolyásolhatja a PLCγ aktivitását is.

Annak eldöntésére, hogy az YLDL peptid módosíthatja-e a sejten belüli jelátviteli folyamatokat, és milyen szerepet játszhat a natív molekulában, a sejtmembránon átjutó foszfopeptidet terveztünk, és vizsgáltuk annak hatását a sejten belüli kalciummobilizációra. A PLCγ-aktiválódás inozitol triszfoszfát (IP3) felszabadulással jár, ami az endoplazmatikus retikulum IP3 receptoraihoz kötődve a sejten belüli raktárakból Ca²⁺ ionok felszabadulását eredményezi. A peptidet oktanoil csoport és nyolc arginin (O-R8) hozzákapcsolásával tettük alkalmassá arra, hogy a sejtmembránon átjusson. Az O-R8- YLDL tartalmú foszfopeptid kis mértékű, de reprodukálható, gyors Ca²⁺ felszabadulást váltott ki. Ennek alapján azt feltételezzük, hogy a foszfopeptid valószínűleg az SH2 doménekhez való kötődése révén a PLCγ-t aktiválja.

A Gab1 gén átmeneti funkcionális kiütésének következményei

A Gab1 B-sejtekben betöltött funkciójának vizsgálatára a Gab1 gén átmeneti elcsendesítését terveztük. Ennek egyik módja a Gab1 specifikus, rövid szintetikus RNS (siRNS) alkalmazása, amely sejtbe való bejuttatása után az azonos szekvenciájú Gab1 mRNS-hez kötődve kiváltja annak degradálódását, s így a fehérje mennyiségének átmeneti csökkenését. Az siRNS-sel kezelt mintákban a Gab1 mennyisége 24 óra elteltével jelentősen csökkent. A Gab1 közvetített funkciók közül az Akt/PKB, valamint az Erk aktiválódást követtük nyomon a BCR-en keresztül stimulált mintákban. Mindkét kináz aktiválódását foszforilációja jelzi, amit a foszforilált formára

specifikus ellenanyagok segítségével, Western blotton mutattunk ki. A 24 órás Gab1 siRNS kezelést követően az Akt foszforiláció mértéke csökkent, ami arra utal, hogy a PI3-K/Akt útvonalat a Gab1-en kívül más fehérjék is szabályozzák. Ugyanakkor az Erk foszforiláció vizsgálata azt mutatta, hogy a részleges Gab1 expresszió csökkenést mutató mintákban is jelentős mértékben csökkent az Erk foszforiláció, vagyis Gab1 hiányában a BCR-en keresztül elindított jelátviteli folyamatok hatására az Erk nem, vagy sokkal kisebb mértékben aktiválódott. Ez arra utal, hogy a Gab1 elsődleges feladata B-sejtekben az Erk aktiválódás szabályozása lehet.

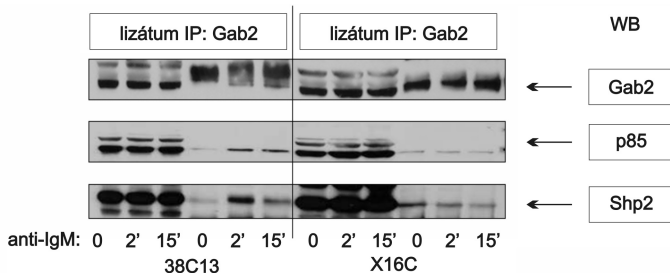
A Gab2 szerepe egér B-sejtekben

A Gab2 szerepét olyan egér B-sejtekben vizsgáltuk, melyek Gab1-t nem tartalmaznak. A 38C13 sejtvonal az éretlen B-sejtekre jellemző vonásokkal rendelkezik, míg vizsgálataink alapján az X16c sejtvonal a marginális zóna B-sejtekhez hasonló. A Gab2-t specifikus ellenanyag segítségével immunprecipitáltuk, majd vizsgáltuk a tirozin foszforilációt, és azonosítottuk a Gab2-höz kapcsolódó fehérjéket. A 38C16 sejtekben a Gab2 a BCR keresztkö-

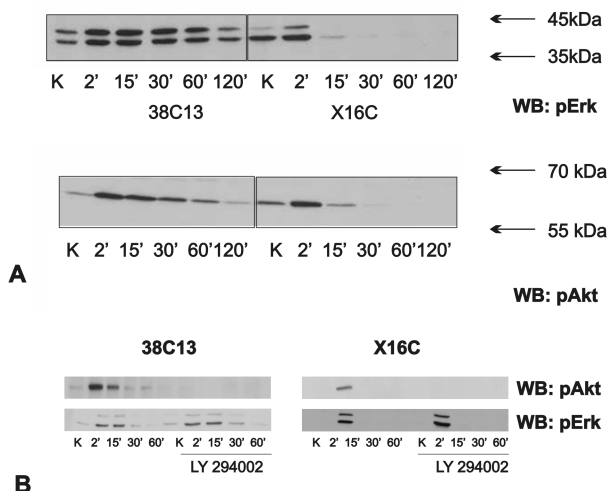
tés hatására tirozin foszforiláción esett át, ami elektroforetikus mobilitása megváltozásával járt. Ezzel szemben az X16c sejtekben a Gab2 nem mutatott indukált tirozin foszforilációt. A Gab2-höz kötődő fehérjék vizsgálata során a 38C16 sejtekben a PI3-K és az SHP-2 kötődését tudtuk kimutatni. Ugyanakkor az X16c sejtekben csak konstitutív módon, kis mértékben kapcsolódtak a Gab2-höz ezek a fehérjék (5. ábra).

Megvizsgáltuk az Erk és az Akt aktiválódás (foszforiláció) kinetikáját is. A 38C16 sejtekben mind az Erk, mind az Akt foszforilációja indukálódott, és fennmaradt hatvan percen át, míg az X16c sejtekben tizenöt perc után mindkét aktivitás megszűnt. Ez arra utal, hogy a Gab2 BCR indukált tirozin foszforilációja előfeltétele a fenntartott Erk és Akt jel kialakulásának (6a. ábra).

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy szükséges-e a PI3-K aktivitása a Gab2 további fehérjékkel való kölcsönhatásaihoz. PI3-K gátlószer (LY294002) mellett a Gab2 /SHP-2 kapcsolat nem jött létre, ami jelzi, hogy a Gab2, feltehetőleg a PH domén / PIP3 kapcsolat hiányában nem foszforilálódott. A PI3-K gátló teljesen megszüntette az Akt



5. ábra • A Gab2 foszforilációja BCR stimulus következtében és a Gab2-höz kötődő fehérjék azonosítása 38C13 és X16C sejtekben. 38C13, illetve X16C sejteket anti-IgM-mel stimuláltunk 2 és 15 percig, majd a sejteket Triton X100 detergens tartalmú pufferben szolubilizáltuk (lizátum). A lizátummintákat és a Protein G gyöngyökhöz kötött Gab2-specifikus ellenanyaggal immunprecipitált (IP) mintákat SDS-poliakrilamid elektroforézisnek vettettük alá, nitrocellulóz membránra vittük át, majd Gab2 -re, PI3-K p85 alegységére, és SHP-2-re specifikus ellenanyagokkal hívtuk elő.



6. *ábra* • Az Erk és az Akt foszforilálódásának kinetikája BCR keresztökést követően 38C13 és X16C sejtekben. b) A PI 3-kináz gátló LY294002 hatása az Akt és az Erk foszforilációra. A kezeletlen, illetve LY294002 kezelt sejteket anti-IgM-mel különböző ideig stimuláltuk, majd szolubilizáltuk detergens tartalmú pufferben, SDS-poliakrilamid elektroforézist követően a mintákat nitrocellulóz membránra vittük át, majd az Erk, illetve az Akt foszforilált (aktivált) formájára specifikus ellenanyagokkal hívtuk elő.

aktiválódását is. Ennek elsősorban az lehet az oka, hogy az Akt szabályozásában PI3-K függő kináz, a PDK vesz részt, és mind az Akt, mind PDK aktiválódásához nélkülözhetetlen a PIP₃, amelyhez PH doménjeiken keresztül kapcsolódnak. Ugyanakkor a PI3-K gátlása egyáltalán nem befolyásolta az Erk foszforilálódását egyik sejt típusban sem, ami arra utal, hogy ez B-sejtekben a Gab2/SHP-2 kölcsönhatástól független folyamat (6b. *ábra*).

A Gab2 sejtben belüli eloszlásának *konfokális mikroszkópos* analízise azt mutatta, hogy 38C16 sejtekben néhány perccel az aktiválást követően a Gab2 a citoplazmából a sejtmembránhoz helyeződött át, míg a X16c sejtekben inkább a sejtmag közelében helyezkedett el. Az előző adatokkal együtt ez az eredmény azt igazolja, hogy a Gab2 foszforilációjának előfeltétele az adapter fehérje sejtmembránhoz való áthelyeződése.

Összegezve elmondhatjuk: a Gab1 és Gab2 eltérő szerepet tölt be B-sejtekben. A Gab1 elsősorban az Erk aktiválásában vesz részt, míg a PI3-K-től függő folyamatokat, így pl. a sejt túléléséhez vezető anti-apoptotikus jeleket gátolhatja is. A Gab2 /SHP-2 útvonal azonban – legalábbis a vizsgált egér B-sejt vonalakban – nem befolyásolja az Erk foszforilációját, de a Gab2 tirozin foszforilációja szerepet játszik az Erk aktiváció fenntartásában.

A Gab fehérjék tehát az immunsejtekben éppúgy, mint a tumorsejtekben kulcsszerepet játszanak különféle jelátviteli útvonalak során. A továbbiakban számos fontos kérdés vár még tisztázásra, mint például az SHP-2 célmolekuláinak azonosítása, és az egyes Gab fehérjékhez kapcsolt sejt-specifikus funkciók megismerése.

Kulcsszavak: *jelátvitel, SLAM, SAP, GAB, tirozinkináz, stat, Jak*

IRODALOM

- Arnaud, Mary – Crouin, C. – Deon, C. – Loyaux, D. – Bertoglio, J. (2004): Phosphorylation of Grb-2 Associated Binder 2 on Serine 623 by Erk MAPK Regulates Its Association with the Phosphatase SHP-2 and Decreases STAT5 Activation. *The Journal of Immunology*. 173, 3962–3971.
- Bardelli, Alberto – Longati, P. – Gramaglia, D. – Stella, M. C. – Comoglio, P. M. (1997): Gab1 Coupling to the HGF/Met Receptor Multifunctional Docking Site Requires Binding of Grb2 and Correlates with the Transforming Potential. *Oncogene*. 15, 3103–3111.
- Burdon, Tom – Stracey, C. – Chambers, I. – Nichols, J. – Smith, A. (1999): Suppression of SHP-2 and Erk Signaling Promotes Self Renewal of Embryonic. *Developmental Biology*. 210, 30–43.
- Gu, Haihua – Neel, Benjamin G. (2003): The “Gab” in Signal Transduction. *Trends in Cell Biology*. 13, 122–130.
- Gu, Haihua – Pratt, J. C. – Burakoff, S. J. – Neel, B. G. (1998): Cloning of p97/Gab2, the Major SHP-2 binding Protein in Haemopoietic Cell. *Molecular and Cellular Biology*. 2, 729–740.
- Hibi, Masahiko – Hirano, Toshio (2000): Gab Family Adaptor Molecules in Signal Transduction of Cytokine and Growth Factor Receptors, and T and B Antigen Receptors. *Leukemia and Lymphoma*. 37, 299–307.
- Holdago-Madruga, Marina – Emlet, D. R. – Moscatello, D. K. – et al. (1996): A Grb2 Associated Docking Protein in EGF and Insulin Receptor Signaling. *Nature*, 379, 560–564.
- Ingham, Robert J. – Holdago-Madruga, M. – Siu, C. – Wong, A. J. – Gold, M. R. (1998): The Gab1 Protein Is a Docking Site for Multiple Proteins Involved in Signaling by the B Cell Antigen Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 273, 30630–30637.
- Itoh, Shousaku – Itoh, M. – Nishida, K. – Yamasaki, S. – Yoshida, Y. – Narimatsu, M. – Park, S. J. – Hibi, M. – Ishiara, K. – Hirano, T. (2002): Adapter Molecule Grb-2 Associated Binder 1 Is Specifically Expressed in Marginal Zone B Cells and Negatively Regulates Thymus Independent Antigen-2 Responses. *The Journal of Immunology*. 168, 5110–5116.
- Koncz Gábor – Tóth G. K. – Bökönyi Gy. – Kéri Gy. – Pecht, I. – Medgyesi D. – Sármay G. (2001): Co-clustering of Fcγ and B cell Receptors Induces Dephosphorylation of the Grb2-associated Binder 1 Docking Protein. *European Journal of Biochemistry*. 268, 3898–3906.
- Montagner, Alexandra – Yart, A. – Dance, M. – Perret, B. – Salles, J.-P. – Raynal, P. (2004): A Novel Role for Gab1 and SHP-2 in Epidermal Growth Factor-induced Ras Activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 280, 5350–5360.
- Morra, Massimo – Simaro-Grande, M. – Martin, M. – Chen, A. S. – Lanyi A. – Silander, O. – Calpe, S. – Davis, J. – Pawson, T. – Eck, M. J. – Sumegi J. – Engel, P. – Li, S. C. – Terhorst, C. (2001): Characterization of SH2D1A Missense Mutations Identified in X-linked Lymphoproliferative Disease Patients. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 39, 36809–36816.
- Nishida Keigo – Yoshida, Y. – Itoh, M. – Fukada, T. – Ohtani T. – Shirogane, T. – Atsumi, T. – Takahashi-Tezuka M. – Ishihara, K. Hibi, M – Hirano T. (1999): Gab Family Adaptor Proteins Act Downstream of Cytokine and Growth Hormone Receptors. *Blood*. 93, 1809–1816.
- Nishida Keigo – Hirano, Toshio (2003): The Role of Gab Family Adapter Proteins in the Signal Transduction of Cytokine and Growth Factor Receptors. *Cancer Science*. 94, 1029–1033
- Pawson, Tony – Scott, John D. (1997): Signaling through Scaffold, Anchoring and Adaptor Proteins. *Science*. 278, 2075–2080
- Pratt, Joanne C. – Igras, V. E. – Maeda, H. – Baks, S. – Gelfand, E. W. – Burakoff, S. J. – Neel, B. G. – Gu, H. (2000): Gab2 Mediates an Inhibitory Phosphatidylinositol 3-kinase Pathway in T Cell Antigen Receptor Signaling. *The Journal of Immunology*. 165, 4158–4163.
- Sármay G. – Koncz G. – Pecht, I. – Gergely J. (1997): Fcγ Receptor Type IIb Induced Recruitment of Inositol and Protein Phosphatases to the Signal Transducing Complex of Human B Cells. *Immunology Letters*. 57, 159–164.
- Schlessinger, Joseph (2000): Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*. 103, 211–225.
- Yamasaki, Satoru – Nishida, K. – Sakuma, M. – Berry, D. – McGlade, C. J. – Hirano, T. – Saito, T. (2003): Gads/Grb2-mediated Association with LAT Is Critical for the Inhibitory Function of Gab2 in T Cells. *Molecular and Cellular Biology*. 23, 2515–2529.
- Yu, Cheng Fang – Liu, Z. X. – Cantley, L. G. (2002): Erk Negatively Regulates the EGF-Mediated Interaction of Gab1 and the PI3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 277, 19382–19388.