

ZÁRÓJELENTÉS – OTKA 49231

„Az intracelluláris jelátvitel szerepe a proliferáció és differenciálódás szabályozásában”

Kísérleteinkben az egyik központi intracelluláris jelátviteli molekulacsalád, a protein kináz C (PKC) rendszer izoenzimjeinek a sejtnövekedés, valamint a kapcsolódó biológiai folyamatok szabályozásában betöltött szerepét vizsgáltuk.

1. A PKC izoenzimek szerepe harántcsíkolt izomsejtek *in vitro* és *in vivo* növekedésének szabályozásában

A jelen kísérleteket megelőző munkánk során C2C12 egér myoblast sejtvonalban számos PKC izoforma rekombináns stabil overexpresszióját valósítottuk meg. Ezen sejtek folyamatait vizsgálva kimutattuk, hogy a különféle PKC izoenzimek overexpressziója eltérő módon változtatta meg a sejtek *in vitro* proliferációját és differenciálódását, valamint az *in vivo* tumorgenezis folyamatát. Megállapítottuk, hogy a „kalcium-függő” cPKC α és β izoenzimek overexpressziója jelentősen lecsökkentette a C2C12 myoblastok *in vitro* proliferációját, valamint növelte a differenciálódási marker dezmin expresszióját. Bebizonyosodott továbbá, hogy ezen izoformákat overexpresszáló sejtek immunhiányos (SCID) egerekben a kontroll sejtek által kiváltott daganatokhoz képest nagyon hasonló szövettani jelegzetességekkel bíró, jóindulatú, ugyanakkor kisebb méretű tumorokat indukáltak.

Ezzel ellentétben a nPKC δ overexpressziója drámaian fokozta a sejtek *in vitro* proliferációját, valamint lecsökkentette a dezmin expresszióját. RNS-interferencia (siRNA) technika alkalmazásával kimutattuk emellett, hogy a nPKC δ siRNA-mediált down-regulációja teljes mértékben felfüggesztette a sejtek proliferációját. Fontos eredménynek adódott továbbá, hogy az ezen izoformát kifejező sejtek extrém nagy méretű, gyakran kifeléyesedő és vérző, valamint (számos esetben) a kísérleti állat jelentős súlyvesztését és halálát eredményező tumorok kifejlődését eredményezték. Szövettanilag ezen daganatok igen magas sejtosztódási rátával, a rhabdoid differenciálódás teljes hiányával, valamint infiltratív (azaz malignus) növekedési tulajdonságokkal voltak jellemezhetőek, mely a kísérleti állat subcutan szöveteinek

feldarabolódásához és roncsolódásához vezetett. Mindezek alapján a nPKC δ overexpresszor C2C12 myoblastok által indukált tumorok malignus rhabdomyosarcomáknak voltak diagnosztizálhatók. Érdekes megfigyelésünk volt végezetül, hogy a C2C12 sejtekben endogén módon ki nem fejeződő nPKC ϵ overexpressziója nem volt hatással a vizsgált folyamatokra.

Mindezen adataink azt sugallták, hogy a cPKC α és β izoformák a sejtek proliferációjának (kismértékű) gátlásában vehetnek részt, míg a nPKC δ központi szerepet játszhat a C2C12 vázizomsejtek *in vitro* és *in vivo* proliferációjának, valamint malignus transzformációjának serkentésében és kialakításában. Mindezen hipotézist tovább vizsgálva humán malignus rhabdomyosarcomából származó mintákon (valamint egészséges szöveten) elemeztük a PKC izoformák gén- (kvantitatív „real-time” Q-PCR) és fehérje (Western blot) szintű kifejeződését. Megállapítottuk, hogy a nPKC δ expressziója a legtöbb mintában szignifikánsan nőtt, míg a cPKC α szintje jelentősen csökkent. Ezen adatok jó egyezést mutattak a C2C12 sejteken mért fenti eredményekkel.

Végezetül vizsgáltuk a nPKC δ overexpresszor C2C12 sejtek által a SCID egerekben indukált tumorok farmakológiai érzékenységét is. Kimutattuk, hogy a nPKC δ szelektív gátlószere, a Rottlerin, valamint a nPKC δ szelektív down-regulációját kiváltó (így az enzim aktivitását jelentősen csökkentő) Bryostatin-1 jelentősen és dózis-függően lecsökkentette az agresszív tumorok növekedését és méretét.

2. A PKC izoenzimek szerepe harántcsíkolt izomsejtek transzmembrán szignalizációjának szabályozásában

Párhuzamos kísérleteinkben primer humán vázizomsejteken és C2C12 myoblastokon vizsgáltuk a PKC izoenzimek szerepét a transzmembrán szignalizáció szabályozásában. Megállapítottuk, hogy a „hiperproliferatív” nPKC δ izoforma meghatározó szereppel bír bizonyos sejtfelszíni receptorokhoz kapcsolt celluláris válaszok kifejlődésében is. Humán vázizomsejteken kimutattuk ugyanis, hogy az inzulin-szerű növekedési faktor-I (IGF-I) fokozta a sejtek proliferációját és differenciálódását, mely hatás kizárólag a nPKC δ specifikus aktivitásához volt rendelhető. C2C12 myoblastokon megállapítottuk emellett, hogy az IGF-I mitogén (azaz sejtproliferációt, fúziót és differenciálódást fokozó) hatásának kifejlődéséhez a

nPKC δ izoforma, valamint a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) rendszer nPKC δ -függő aktiválódása szükséges.

C2C12 sejtekben emellett vizsgáltuk a PKC izoenzimek szerepét a purinoreceptor-mediált szignalizációban is. Megállapítottuk, hogy a megnövekedett differenciálódással jellemezhető cPKC α overexpresszor sejtekben (a kontroll sejtekhez viszonyítva) igen jelentősen fokozódott az extracelluláris ATP hatására kialakuló intracelluláris kalciumkoncentráció-emelkedés. Kimutattuk ugyanakkor azt is, hogy ezen változás mind mértékét, mind kinetikai paramétereit tekintve különbözött a tenyésztés-indukálta differenciálódási folyamat sokán mért kalciumjelek értékeitől. Megállapítottuk emellett, hogy a cPKC α overexpresszió jelentősen megváltoztatta a sejtek purinoreceptor mintázatát, mely ismételtén különbözött a tenyésztés során kialakuló differenciálódáskor mértéktől. Mindezen adataink a cPKC α differenciálódási állapot-függő szerepét valószínűsítették a purinerg jelátvitel szabályozásában.

3. A PKC izoenzimek szerepe a humán bőr függelékeiből származó sejtek biológiai folyamatainak szabályozásában

Kísérleteink során először humán bőr függelékeiből származó sejtenyészeten jellemeztük a PKC rendszer tagjait. Humán izolált szőrtüsző-eredetű primer külső gyökérhüvely (ORS) keratinocytákon Western blot, immuncitokémia, valamint Q-PCR technikák alkalmazásával megállapítottuk, hogy a sejtek kifejezik a cPKC α és β ; a nPKC δ , ϵ és η ; valamint az „atípusos” aPKC ζ izoformákat. Egyik módszer alkalmazásával sem sikerült ugyanakkor a nPKC θ ; az aPKC μ ; valamint a PKC μ jelenlétét igazolnunk.

Hasonló megközelítést alkalmazva humán SZ95 sebocyta sejtvonalon (mely a humán faggyúmirigyből származó primer sebocyták egyik legkiválóbb modelljének tekinthető) kimutattuk, hogy a sejtekben a cPKC α és β ; az nPKC δ , ϵ , θ és η ; az aPKC ζ ; valamint a PKC μ fejeződik ki. Kvantitatív denzitometriás Western blot analízissel, valamint Q-PCR technikával megállapítottuk továbbá, hogy a sejtek tenyésztésével párhuzamosan (azaz a proliferáció és differenciálódás előrehaladtával) a különféle izoenzimek szintje jelentős mértékben, de egymástól eltérő módon változik: azaz a cPKC α szintje kis mértékben (kb. 20%) és

egyenletesen, míg a cPKC β , nPKC ϵ , θ és η szintje kevésbé egyenletesen, de jelentősebb mértékben emelkedett (rendre kb. 40%, 60%, 80%, 40%); a nPKC δ expressziós szintje nem mutatott változást; az aPKC ζ szintje jelentősen csökkent (40%).

A PKC enzimek funkcionális szerepét tisztázandó az SZ95 sejteket farmakológiai vizsgálatoknak vetettük alá, az általános PKC aktivátor PMA (forbol-12-mirisztát-13-acetát), az általános PKC inhibitor GF109203X, a cPKC izoforma gátlószer Gö6976, valamint a nPKC δ gátlószere, a Rottlerin jelenlétében. Megállapítottuk, hogy a PMA fokozta a sejtek differenciálódásának markereként értelmezhető lipidszintézist, míg a PKC gátlószeresek önmagukban nem befolyásolták azt. Kimutattuk ugyanakkor, hogy a Rottlerin és a GF109203X szignifikánsan csökkentette a SZ95 sebocytákban a lipidszintézist jelentősen fokozó arachidonsav (AA) hatását, míg a Gö6976 semmilyen hatással nem volt a folyamatra.

Ezen eredményeink alapján feltételezhető volt, hogy a PKC rendszer endogén aktivitása nem vesz részt a sebocyták lipidtermelésének szabályozásában. Úgy tűnt ugyanakkor, hogy egyes PKC izoenzimek (pl. nPKC δ) funkcionális szereppel bírhatnak az AA lipidszintézist fokozó celluláris hatásának kifejlődésében. Ezen utóbbi hipotézis tovább elemezve siRNA technikával kimutattuk, hogy a cPKC α és β , valamint a nPKC ϵ siRNA-mediált „lecsendesítése” nem volt hatással sem a sejtek bazális, sem az AA-indukált lipidtermelésére. Megállapítottuk ugyanakkor, hogy (jó összhangban a fenti farmakológiai kísérletek eredményeivel) nPKC δ -specifikus siRNA próba alkalmazása jelentős mértékben kivédte az AA zsírszintézist fokozó hatását (ugyanakkor nem befolyásolta a bazális lipidtermelést), mely tovább erősített ezen izoforma meghatározó szerepét a fenti folyamatban.

Vizsgálni kívántuk emellett a PKC rendszer esetleges szerepét az SZ95 sejtek *in vivo* növekedésének szabályozásában is. Ezen kísérletek során először kontroll SZ95 sebocyták intradermális injektálásával kíséreltünk meg daganatokat létrehozni SCID egerekben. Érdekes módon a sejtek csak minimális (1-5 mm), teljes mértékben aspecifikus hisztológiai paraméterekkel jellemezhető „teriméket” hoztak létre; így a tumorgenezis vizsgálatára (ez esetben) sajnálatos módon nem nyílt módunk.

4. A PKC izoenzimek szerepe a humán epidermális keratinocyták sejt felszíni markereinek, valamint transzmembrán szignalizációjának szabályozásában

A PKC rendszer izoformáinak vizsgálatát tovább folytattuk humán epidermális keratinocytákon is, ezúttal a különféle sejt felszíni molekulák kifejeződésének szabályozását elemezve. Kimutattuk, hogy proliferáló humán epidermális HaCaT keratinocytákban jelentős mértékben expresszálódnak a basalis és spinosus réteg markerei, a P-cadherin (P-cad, adherens junctio-specifikus cadherin) és a desmoglein-3 (dsg-3, desmosomális cadherin), míg a differenciálódó sejtekben a desmoglein-1 (dsg-1) kifejeződése dominált.

Ezt követően olyan módosított HaCaT sejteket vizsgáltunk, melyekben vagy rekombináns PKC izoformákat termeltettünk, vagy siRNA-mediált PKC izoforma-specifikus „csendesítést” hajtottunk végre. A fentiekkel jó összhangban az nPKC δ -t overexpresszáló (fokozott differenciálódással jellemzett) sejtekben jelentősen megemelkedett a dsg-1 szintje, míg a P-cad és dsg-3 expressziója lecsökkent. Ehhez hasonló adhézions molekula mintázatot tapasztaltunk a cPKC α -t kifejező, ugyancsak differenciálódó sejtekben, de itt nem változott meg a dsg-1 szintje. Hiperproliferatív PKC-overexpresszor sejteket vizsgálva kimutattuk, hogy míg a nPKC ϵ -t kifejező sejtekben a dsg-1 szintje csökkent, a dsg-3 szintje nőtt, de a P-cad kifejeződése nem változott; addig az ugyancsak gyorsabb növekedési rátát mutató cPKC β overexpresszorokban csak a P-cad emelkedett expresszióját tudtuk tetten érni. Mindezen eredményeinket (értelemszerűen „fordított előjellel”) teljes mértékben alátámasztották siRNA kísérleteink is. Megállapítható tehát, hogy a különféle sejt felszíni adhézions molekulák kifejeződésének szabályozásában – a differenciáltsági állapot egyértelmű hatásán túl – egyes PKC izoformák specifikus, ugyanakkor egymással ellentétes szereppel bírhatnak.

Különféle cPKC izoformákat overexpresszáló HaCaT keratinocytákon elemeztük emellett a purinerg szignalizáció és az intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) szabályozásának kapcsolatát is. Megállapítottuk, hogy a cPKC α -t kifejező (alacsony proliferációs rátával és magas differenciáltsági fokkal jellemzett) sejtek nagyobb $[Ca^{2+}]_i$ növekménnyel válaszoltak ATP adagolásra (habár a sejtek nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ja változatlan maradt). Ezzel ellentétben, a cPKC β overexpresszor (hiperproliferatív és alacsony differenciáltságú) keratinocytákban megemelkedett a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$, de a

sejtek ATP-érzékenysége sokkal kisebb volt. Bebizonyosodott továbbá, hogy ezen kétféle sejtek eltérő purinoreceptor mintázattal rendelkeznek. Azaz, a cPKC β -t kifejező sejtekben (a kontroll és cPKC α -t overexpresszáló keratinocytákban mértékhez képes) lecsökkent P2X1 és megemelkedett P2Y1 receptor kifejeződése, míg cPKC α -HaCaT sejtekben szignifikáns mértékben fokozódott a P2X7 szintje (a P2X2 és P2Y2 kifejeződése nem változott egyik sejttypusban sem). Mindezen adatok arra utalnak, hogy a proliferációs és differenciáltsági állapot megváltozása együtt jár az $[Ca^{2+}]_i$ szabályozásának módosulásával. Eredményeink emellett azt is sugallják, hogy a PKC izoformák eltérő szereppel bírhatnak a foszfatidil-inozitol jelátviteli útvonal modulációjában.

Vizsgáltuk emellett a PKC izoformák kifejeződésében bekövetkező esetleges módosulásokat különféle humán epidermis-eredetű bőrdaganatokban. Basalsejtes carcinomát (basalioma) vizsgálva megállapítottuk, hogy a cPKC α és a nPKC δ kifejeződése (mely izoformák overexpressziója humán epidermalis HaCaT keratinocytákban az *in vitro* és *in vivo* növekedés lelassulását, valamint differenciáltabb fenotípus kialakulását eredményezte) jelentősen lecsökkent a kontroll minták értékeihez képes (érdekes módon a többi kifejeződő PKC izoforma szintje nem változott). Laphám carcinomában ugyanakkor eltérő PKC mintázatot tapasztaltunk: a nPKC δ és a nPKC η szintje jelentősen lecsökkent, míg a nPKC ϵ (melynek overexpressziója HaCaT keratinocytákban jelentősen fokozta a sejtek *in vitro* és *in vivo* növekedési rátáját) és aPKC ζ kifejeződése drámaian fokozódott a tumoros mintákban.

5. A PKC izoenzimek szerepe humán monocytoid sejtekben

Megvizsgáltuk továbbá a PKC izoformák szerepét humán monocytoid MonoMac-6 sejtek proliferációjának és AA-termelésének szabályozásában. PKC inhibitorok, valamint molekuláris biológiai technikák (rekombináns overexpresszió, siRNA) alkalmazásával kimutattuk, hogy az igen jelentős mértékben kifejeződő cPKC β és nPKC δ izoformák fokozzák a sejtek AA-termelését és proliferációját. Megállapítottuk emellett, hogy az enzimek fenti hatásait a kalcium-független foszfolipáz-A2 és a diacil-glicerol lipáz enzimek mediálthatják. Bebizonyosodott továbbá, hogy a többi kifejeződő PKC izoforma közül a cPKC α kismértékben gátolja, míg a nPKC ϵ és aPKC ζ nem befolyásolja a fenti sejtválaszokat.

6. Különbéle „PKC targetmolekulák” vizsgálata a humán bőr függelékeiből származó sejteken

Laboratóriumunkban számos olyan jelátviteli molekula működését tanulmányozzuk (pl. purinerg és cannabinoid receptorok, tranziens receptor potenciál csatornák), melyek funkciójának szabályozásában a PKC izoenzimek központi szereppel bírnak. Ezen „PKC targetmolekulák” vizsgálata során SZ95 sebocytákon az irodalomban elsőként mutattuk ki a tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1, azaz a „kapszaicin-receptor”) jelenlétét. Megállapítottuk, hogy a TRPV1 TRPV1 aktiválása kapszaicinnal dózis-függő és specifikus módon gátolta a sejtek bazális és AA indukálta lipidtermelését, lecsökkentette számos, a lipidtermelést fokozó gén expresszióját, valamint bifázisos módon megváltoztatta a sejtek proliferációját. siRNA technikát alkalmazva kimutattuk továbbá, hogy a kapszaicin a „TRPV1-csendesített” SZ95 sebocytákon teljes mértékben hatástalan volt (azaz nem befolyásolta sem a lipidtermelést, sem a proliferációt, sem a gének kifejeződését). Érdekes volt ugyanakkor megfigyelnünk, hogy a „TRPV1-csendesített” SZ95 sebocyták bazális lipidtermelése (hasonlóan a TRPV1 antagonistá I-RTX-kezelt sejtekhez) szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll sebocytáké. Úgy tűnt tehát, hogy a TRPV1-kapcsolt szignalizáció mintegy konstitutíven aktív endogén mechanizmus vesz részt a faggyúmirigy lipidtermelésének negatív szabályozásában.

Ezen mechanizmus endogén aktivátorai után kutatva SZ95 sebocytákon vizsgáltuk az AA-származék „endovanilloid” TRPV1 agonista anandamid (AEA) hatását is. Meglepetésre azt tapasztaltuk, hogy az AEA (az „exovanilloid” kapszaicin hatásával ellentétben) jelentősen fokozta a sejtek zsírtermelését, mely nem volt kivédhető TRPV1 antagonistákkal. Mivel az AEA egyben az endocannabinoidok egyik képviselője is, ezt követően megvizsgáltuk az endocannabinoid rendszer tagjainak jelenlétét a sejtekben. Kimutattuk, hogy a sebocyták jelentős mennyiségben termelnek endocannabinoidokat, valamint, hogy a cannabinoid receptorok (CB) közül főként a CB2-t expresszálják (a CB1-et ugyanakkor alig). Kombinált farmakológiai és molekuláris biológiai kísérleteinkben (szintetikus agonisták, antagonisták, siRNA technika) megállapítottuk továbbá, hogy az AEA zsírtermelést fokozó hatását a CB2 receptor közvetíti, számos intracelluláris jelátviteli mechanizmus (pl. a MAPK útvonal, nPKC δ , PPAR és RAR magreceptorok) aktiválódásán keresztül. Eredményeink alapján úgy tűnik tehát, hogy a humán faggyúmirigy sejtjeiben egymással

ellentétesen működő TRPV1/vanilloid (a zsírtermelést gátló) és CB2/cannabinoid (a faggyútermelést fokozó) rendszerek jelentléte valószínűsíthető.

További kísérletinkben humán szőrtüsző szervkultúrában is vizsgáltuk az endovanilloid/endocannabinoid AEA hatását. Kimutattuk, hogy az AEA – hasonlóan a kapszaicin korábban leírt TRPV1-mediált hatásához – dózis-függő módon meggátolta a szőrszál növekedését és a szőrtüsző mátrix keratinocyták proliferációját, valamint apoptózist és regressziós átalakulást (katagén) indukált. Leírtuk azt is, hogy ezen hatás (részben meglepő módon) nem a TRPV1 aktivációját keresztül, hanem a szőrtüsző epitheliális sejtrétegeiben kifejeződő cannabinoid receptor-1 (CB1) aktiválódásaként valósult meg. Ezzel jó összhangban megállapítottuk továbbá, hogy az exogén cannabinoid vegyület Δ^9 -tetrahydrocannabinol teljes mértékben „utánozta” az AEA celluláris hatásait. Végezetül bebizonyosodott az is, hogy a TRPV1- és CB1-mediált mechanizmusok egymástól függetlenül és additív módon vesznek részt a szőrtüsző növekedési folyamatainak negatív szabályozásában.

Végezetül TRPV1 kifejeződését vizsgáltuk egér bőrben. Az irodalomban elsőként mutattuk ki, hogy a receptor kifejeződik a bőr epidermális keratinocytáiban, valamint a szőrtüsző epitheliális kompartmentjeiben. Bebizonyosodott ugyanakkor az is, hogy a hajciklus során jelentős módosulások tapasztalhatók a TRPV1 expresszió intenzitásában: a legerősebb TRPV1-specifikus immunreaktivitást a regressziós (katagén) és nyugvó (telogén) szakaszokban mértük. TRPV1-knockout állatok vizsgálata során megállapítottuk azt is, hogy jelentős késés regisztrálható ezen állatok hajciklusának idejében (a vad típusú állatok paramétereire viszonyítva), mely eredmény a receptor katagén regressziót serkentő voltára utal (hasonlóan a laboratóriumunk által korábban közölt humán adatokhoz).

7. Konklúzió

Kísérletes eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a különféle PKC izoformák specifikus, egymással gyakran ellentétes, ugyanakkor az adott sejt típusától igen jelentős mértékben függő módon képesek a proliferáció, differenciálódás, a mediátortermelés, valamint receptor-mediált jelátvitel folyamatainak szabályozására.