

*A PROTEIN KINÁZ C IZOENZIMEK DIFFERENCIÁLT
SZEREPE VÁZIZOM- ÉS PORCSEJTEK IN VITRO ÉS IN VIVO
NÖVEKEDÉSÉNEK SZABÁLYOZÁSÁBAN*

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

**Írta:
Czifra Gabriella**

**Témavezető:
Dr. Bíró Tamás, egyetemi docens**



TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	4
Az izomregeneráció	4
Az IGF-I, mint az izomregeneráció egyik központi szabályozó molekulája.....	6
A protein kináz C (PKC) izoenzimek.....	8
A PKC izoenzimek és a harántcsíkolt izom kapcsolata.....	11
A hialinporc, a porcdifferenciáció legfontosabb lépései	13
A kondrogenezis szabályozása – a PKC rendszer lehetséges szerepe	14
CÉLKITŰZÉSEK	16
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	18
Humán vázizomsejtek tenyésztése	18
C2C12 sejtek tenyésztése.....	19
Porcosodó high density (HD) sejt kultúrák tenyésztése	19
A sejt növekedés és fúziós index vizsgálata humán vázizomsejteken	20
A sejtproliferáció vizsgálata C2C12 myoblastokon.....	20
A sejtproliferáció vizsgálata porcosodó sejttenyészeteken	22
PKC vektorok	22
Rekombináns PKC overexpresszálló C2C12 sejtek készítése	23
Antitestek.....	24
Western (immuno)blot.....	24
A rekombináns PKC izoenzimek aktivitásának meghatározása (kináz assay).....	26
PKC enzimaktivitás mérése porckultúrákban	26
Immunprecipitáció	27
Immuncitokémia és konfokális mikroszkópia	27
A porcsejtek metakromáziás festése és fénymikroszkópos vizsgálata	29
A tumorigenezis vizsgálata SCID egerekben.....	29
Hisztológia és immunohisztokémia	29
Statisztikai elemzések	30
EREDMÉNYEK	31
Az IGF-I fokozza a proliferációt, fúziót és az izomspecifikus differenciálódási marker dezmin kifejeződését humán vázizomsejtekben	31
Primer humán vázizomsejteken az IGF-I hatását az nPKC δ közvetíti, ugyanakkor a MAPK és PI3-K útvonal nem vesz részt a celluláris hatás kifejlődésében	33
C2C12 myoblastokon az nPKC δ mellett a MAPK útvonal is szerepet játszik az IGF-I celluláris hatásainak közvetítésében	37
C2C12 myoblastokon az IGF-I celluláris hatásának megjelenésében az nPKC δ a MAPK útvonal „upstream” regulátoraként viselkedik.....	44
Számos cPKC és nPKC izoforma stabil overexpressziója C2C12 myoblastokban.....	46
A különböző PKC izoformák overexpressziója eltérően módosítja C2C12 sejtek morfológiáját.....	48
A különböző PKC izoformák overexpressziója eltérő mértékben befolyásolja a sejtek proliferációját és a differenciálódási marker dezmin expresszióját C2C12 myoblastokon.	49
A különböző PKC inhibitorok eltérően befolyásolják, míg az nPKC δ kináz-negatív mutánsa (DN-PKC δ) gátolja a C2C12 myoblastok proliferációját	51
A PKC izoenzimek overexpressziója különböző tumorokat indukál SCID egerekben.....	52
A PKC izoenzimek expressziója és aktivitása változik a porcdifferenciálódás során – A PKC μ szerepe.....	54

MEGBESZÉLÉS.....	58
<i>Az nPKCδ központi és kizárólagos szereppel bír az IGF-I in vitro mitogén hatásának kifejlődésében humán vázizomsejteken</i>	58
<i>C2C12 myoblastokon az IGF-I hatásainak kifejlődésében az nPKCδ mellett a MAPK útvonal nPKCδ-függő részvétele is szükséges.....</i>	59
<i>A különböző PKC izoenzimek specifikus, differenciált és gyakran ellentétes szerepet töltenek be C2C12 myoblastok sejtfolymatainak szabályozásában</i>	61
<i>Az nPKCδ drámai módon fokozza C2C12 vázizomsejtek in vitro proliferációját, valamint malignus transzformációt indukál in vivo</i>	62
<i>A PKCμ központi szerepet játszik a porcdifferenciálódás folyamatainak serkentésében....</i>	64
<i>A kísérletes eredmények (potenciális) hasznosítása.....</i>	65
ÖSSZEFOGLALÁS.....	68
IRODALOMJEGYZÉK.....	69
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	79
KÖZLEMÉNYEK.....	80

BEVEZETÉS

Az izomregeneráció

A harántcsíkolt izom egyik jellegzetes tulajdonsága, hogy nagyfokú *in vivo* és *in vitro* regenerációs képességgel rendelkezik (Ehrhardt és Morgan, 2005; Tidball, 2005), mely központi szerepet játszik a sérülést követő, valamint a posztnekrótikus izomújraépülésben (pl. izomdystrophiák, myopathiák, myositisek) (Grounds, 1991; Dupont-Versteegden és mtsai, 2000; Cho-Chung és mtsai, 2002; Hyatt és mtsai, 2003). Az *in vivo* izomregeneráció kiinduló forrása a szatellitasejtek, melyek az izomrostok sejtmembránja és lamina basalis között található nyugvó, egymagvú izom prekursor sejtek (Armand és mtsai, 1983; Bischoff, 1990, 1994). Számuk felnőtt vázizomban limitált, és az életkor előrehaladtával csökkenő mértéket mutat (Schultz és Lipton, 1982; Ferrari és mtsai, 1998). A szatellitasejtek egyik igen fontos jellemzője, hogy specifikus ingerek hatására mitotikusan osztódni kezdenek (myoblastok kialakulása), DNS tartalmuk beépül a mitózisra már képtelen izomsejtek magjába, majd ezt követően (akár a sérült izomrosttal való) fúzió és differenciálódás után többmagvú izomsejteké olvadnak össze (Grounds, 1991; Chambers és McDermott, 1996). A folyamat *in vivo* vizsgálatára regenerálódó izomból származó biopsziák alkalmasak, melyek származhatnak beteg vagy kísérletesen létrehozott izomnekrózist szenvedett izomzatból is (Grounds, 1991; Cho-Chung és mtsai, 2002). Ezen modellek előnye, hogy a vizsgált rendszerben a szatellitasejteken kívül maguk a regenerálódó izomrostok is jelen vannak; hátrányuk viszont, hogy a proliferáció és differenciálódás időbeli és térbeli lépései csak nehézkesen vagy egyáltalán nem tanulmányozhatóak.

Az izomregeneráció kiválóan modellezhető *in vitro* humán vázizomsejtek tenyésztésével (Cossu és mtsai, 1980; Schultz és McCormick, 1994; Boczán és mtsai, 2000). Az enzimatis és mechanikus úton izombiopsziákból izolált szatellitasejtek és myoblastok (Bischoff, 1994) – megfelelő tenyésztési körülmények között – proliferálnak,

differenciálódnak és fuzionálnak, majd sokmagvú myotube-okat hoznak létre (Cossu és mtsai, 1980; Schultz és McCormick, 1994; Boczán és mtsai, 2000). Az *in vitro* vizsgálatok másik lehetséges módja szekunder tenyészetek létrehozása, melyek izomsejt eredetű sejtvonalakból indíthatóak, és megfelelő körülmények hatására a fentiekhez hasonló differenciálódási folyamat figyelhető meg bennük (Ostrovsky és mtsai, 2002; Koleva és mtsai, 2005).

Az izomregeneráció eseményei az alábbi folyamatsorral jellemezhetők (összefoglalta Wagers és Conboy, 2005): a mitotikusan inaktív szatellitasejtek aktivációját az izomsérülés helyére bevándorló polimorfonukleáris leukociták és a szatellitasejtek közötti sejt-sejt interakció (integrinek, adhéziós molekulák) indíthatja el (Jesse és mtsai, 1998; Disatnik és Rando, 1999). Ezzel párhuzamosan, az izomrostok és a szatellitasejtek által termelt máj növekedési faktor (hepatic growth factor, HGF) fokozza a sejtek proliferációját (Anastasi és mtsai, 1997), valamint a sérülés helyére történő migrációját (Bischoff, 1994). Ezt követően az aktivált szatellitasejtek további proliferációját, differenciálódását és fúzióját számos egyéb növekedési faktor és citokin autokrin és parakrin módon létrehozott kapcsolata szabályozza. Ilyen anyagok a makrofágokból felszabaduló interleukin-6 (IL-6) és leukémia gátló faktor (LIF) (Cantini és mtsai, 1994), a számos sejt által termelt fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor, FGF) (Grounds, 1991), a thrombocyta eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor, PDGF) (Yablonka és mtsai, 1990), valamint az alább részletezendő inzulinszerű növekedési faktor-I (IGF-I).

A szatellitasejtek proliferációját és differenciálódását különféle jelátviteli útvonalakon keresztül ható izomspecifikus szabályozó faktorok (myogenic regulatory factors, MRF) is befolyásolhatják. Ezen transzkripciós faktoroknak jelenleg négy képviselőjük ismert: a primer MRF-ek csoportjába tartozó MyoD és myf5 (Braun és mtsai, 1989; Sabourin és mtsai, 1999), valamint a szekunder MRF-okat alkotó myogenin (Wright és mtsai, 1989) és MRF4 (Rhodes és Konieczky, 1989; Sabourin és mtsai, 1999). Különböző vizsgálatok során bebizonyították,

hogy a nyugvó szatellitasejtek aktivációjához feltétlenül szükséges a MyoD vagy myf5 jelenléte, majd ezen két faktor koexpressziója biztosítja a differenciálódási program beindulását (Sabourin és Rudnicki, 2000). A differenciált myotube-okban ugyanakkor már a szekunder MRF-ek expressziója is megfigyelhető (Sabourin és Rudnicki, 2000). Fontos megemlítenünk, hogy ezen miogén regulációs faktorok aktivitását (melynek fokozódása izomspecifikus fehérjék termelődését indítja el) nagyban befolyásolja foszforilációs állapotuk, mely feltehetően a fent bemutatott növekedési faktorok és citokinek receptoraihoz kapcsolt jelátviteli útvonalakon keresztül módosulhat (Liu és mtsai, 1998; Song és mtsai, 1998; Li és mtsai, 1999). Bebizonyosodott továbbá, hogy a termelt fehérjék egy részének a regeneráció során tapasztalható expressziója eltér a differenciált izomrostban megszokottól, így azok (pl. dezmin, vimentin, α -aktin, α -aktinin) a regeneráció jelzőmolekuláiként is alkalmazhatók (Bornemann és Schmalbruch, 1992; van der Ven és mtsai, 1992).

Az IGF-I, mint az izomregeneráció egyik központi szabályozó molekulája

Az IGF-I az inzulinnal nagyfokú szerkezeti homológiát mutató növekedési faktor. A vérben keringő IGF-I-et (melynek szekrécióját az adenohypophysis növekedési hormonja szabályozza) elsősorban a májsejtek termelik. Az így szekretált IGF-I közvetíti a növekedési hormon hatásainak egy részét, elsősorban a csont- és porcszövet lineáris növekedésének serkentését. Az IGF-I ugyanakkor szinte minden más szövetben is termelődhet, így a növekedési faktor mintegy univerzális autokrin és parakrin szereppel bír a legtöbb sejttípus növekedésének, fejlődésének, valamint regenerációjának szabályozásában (Haugk és mtsai, 2000; Adams, 2002).

Az IGF-I a harántcsíkt izomszövetben is megtalálható, mint a szatellitasejtek terméke (Allen és Boxhorn, 1989; Florini és Magri, 1989; Butler és mtsai, 1998). Kimutatták, hogy az IGF-I az izom működésének egyik esszenciális növekedési faktora, hiszen jelenléte

szükséges az izom fejlődéséhez és növekedéséhez (Liu és mtsai, 1998). Myogenikus sejt kultúrákban megállapították ugyanis, hogy az IGF-I fokozza a génexpressziót, a DNS és protein szintézist, különféle transzport-mechanizmusok aktivitását, valamint a sejtek migrációját, proliferációját és differenciálódását (Allen és Boxhorn, 1989; Edwall és mtsai, 1989; Florini és Magri, 1989; Milasincic és mtsai, 1996; Palmer és mtsai, 1997; Glass, 2003; Zorzano és mtsai, 2003; Foulstone és mtsai, 2004; Jacquemin és mtsai, 2004).

Bebizonyosodott emellett, hogy izomsérülések és különféle eredetű izomatropiák után az szatellitasejtekben, myoblastokban, myotube-okban, valamint az izomrostokban fokozódott az IGF-I termelődése, mely maga után vonta a myoblastok fokozott proliferációját, fúzióját és differenciálódását (Jennische és mtsai, 1987; Jennische és Hansson, 1987; Grounds, 1991; Reardon és mtsai, 2001; Jones és mtsai, 2004). Ezen adatokat alátámasztandó megállapítást nyert továbbá, hogy különféle dystrophiában szenvedő betegek rekombináns humán IGF-I-gyel, valamint géntranszfer technikákkal történő kezelése jelentősen javította a beteg vázizom metabolizmusát és funkcióját (Vlachopapadopoulou és mtsai, 1995; Furling és mtsai, 1999; Rabinovsky és mtsai, 2003). Úgy tűnik tehát, hogy az IGF-I az izomregeneráció folyamatainak szabályozásában is központi szereppel bír (Husmann és mtsai, 1996; Barton-Davis, 1998).

Általánosan elfogadott, hogy az IGF-I mitogén hatását az egy transzmembrán doménnel rendelkező, tirozin-kináz aktivitással bíró receptorához kapcsolódva fejt ki (Dupont és LeRoith, 2001). Az is ismert, hogy az IGF-I receptorához történő kapcsolódása után a receptor (auto)foszforilációja, majd (ennek eredményeként) különböző intracelluláris kináz-rendszerek aktivitás-módosulása következik be (Kramer, 1996). Vázizomsejtek esetében ugyanakkor a különböző jelátviteli útvonalak és kinázok részvétele az IGF-I celluláris hatásainak kifejlődésében erősen fajfüggő jelenséget mutat. Különböző munkacsoportok számoltak be arról, hogy például patkány és egér vázizomsejt

tenyészetekben az IGF-I hatását részben a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonal, részben MAPK független jeltávíteli mechanizmusok, így az Akt/foszfatinilinozitol 3-kináz (PI3-K) és a protein kináz C (PKC) rendszerek közvetítetik (Milasincic és mtsai, 1996; Palmer és mtsai, 1997; Tsakiridis és mtsai, 2001; Haq és mtsai, 2003; Tiffin és mtsai, 2004).

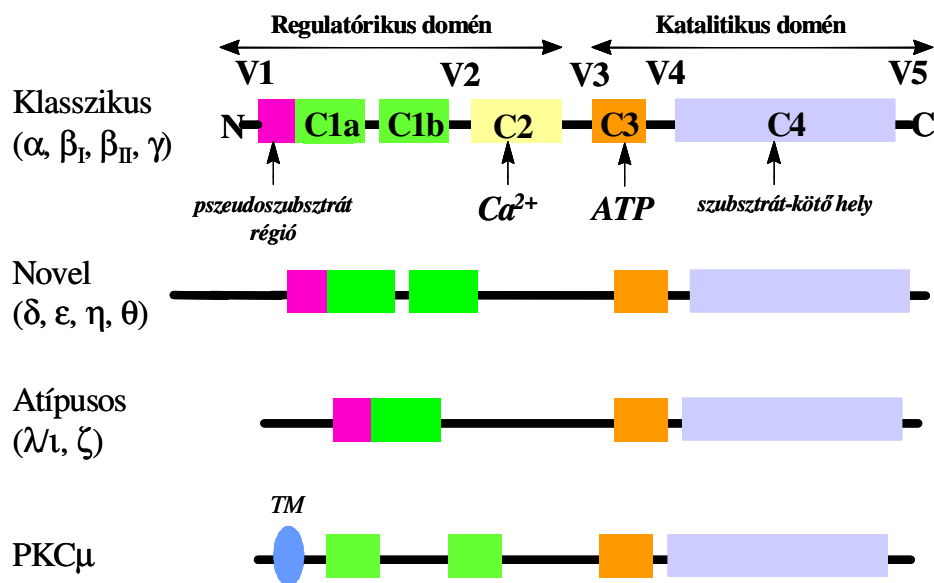
A legkevesebb adattal a humán vázizomsejtek IGF-I-mediált válaszait illetően rendelkezünk. Habár (az eddig megjelent igen kis számú közleményben) korábban bemutatták, hogy az IGF-I humán kultúrákban is fokozza a miogenikus sejtek hypertrophiáját és fúzióját, ezáltal a sejtek proliferációját és differenciálódását (Foulstone és mtsai, 2004; Jacquemin és mtsai, 2004), a potenciális terápia felhasználásához elengedhetetlenül szükséges celluláris hatásmechanizmus pontos leírása hiányzik.

A protein kináz C (PKC) izoenzimek

A protein kináz C (PKC) izoenzimcsalád a szerin-threonin kinázok egyik jelentős képviselője. A mai napig 11 különböző PKC izoenzimet különböztettek meg (Nishizuka, 1988; Jaken, 1996), melyeket aktivációs mechanizmusaik és szerkezeti sajátágaik alapján 4 nagyobb csoportba sorolhatunk (**1. ábra**).

A klasszikus csoportba (cPKC) a cPKC α , β I, β II és a γ izoenzimek tartoznak. Ezen izoformák közös jellemzője, hogy diacil-glicerol (DAG) és kalcium-dependensek, vagyis aktiválódásukhoz ezen anyagokat kofaktorként igénylik. A második csoportba a kalcium-független, de DAG-függő novel nPKC δ , ϵ , η és a θ izoenzimek tartoznak. Közös tulajdonságuk, hogy kalcium nélkül, diacil-glicerollal (illetve annak exogén megfelelőjeként bizonyos forbol-észterekkel) is maximálisan aktiválhatók. A harmadik csoportba az atípusos izoenzimek sorolhatók (aPKC), melyek közé a PKC ζ és λ /I tartoznak. Jellemzőjük, hogy aktiválódásukhoz sem kalciumot, sem phorbol-észtert nem igényelnek. A negyedik csoportot

egyetlen enzim alkotja, a PKC μ (újabb nevén a PKD), mely mind aktivációját, mind struktúráját tekintve rendhagyó izoformának tekinthető.



1.ábra A protein kináz C izoenzimek sematikus szerkezeti jellemzői

A PKC izoformák általános aktiválódásának sémája egy többlépcsős eseménysorral jellemezhető (Nishizuka, 1988, 1992; Jaken, 1996):

- az aktivátor molekulák regulátor doménhez való kötődése olyan konformációváltozást indukál, amelynek hatására a citoszólikus enzim pszeudoszubsztrát régiója eltávolodik a katalitikus domén szubsztrátkötő régiójáról, így az szabadabbá válik a foszforilálandó szubsztrát számára;
- ezután az enzim a C1 doménon keresztül egy intracelluláris struktúrához (sejtmembrán, Golgi-komplex, maghártya, citoskeletális komponensek) transzlokálódik, majd a katalitikus C3 domén foszforilálja az enzimre specifikus szubsztrátot (pl. citoskeletális fehérjék, ioncsatornák, receptorok, transzkripció faktorok, kinázok, foszfatázok);
- a tartós enzimaktivitás elkerülésére intracelluláris proteolitikus enzimek az aktivált PKC enzimet hasítják és lebontják (down-reguláció).

Szervezetünknek nincs olyan sejttípusa, amely ne rendelkezne valamely PKC izoformával, illetve izoformákkal. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy nem mindegyik izoenzim található meg minden sejttípusban; azaz a PKC izoenzimek a szervezetben az adott speciesre, szövetre, valamint sejtre jellemző megoszlást és mintázatot mutatnak (Nishizuka, 1988, 1992; Goodnight és mtsai, 1994; Way és mtsai, 2000; Gutcher és mtsai, 2003). Ezen megoszlás gazdagságából fakad, hogy a PKC enzimek az élettani szabályozó folyamatok legszélesebb skáláját képesek befolyásolni. Alapvető és központi szereppel bírnak (a teljesség igénye nélkül) például a sejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában, a programozott sejthalál (apoptózis) folyamatsorában, meghatározott sejttípusok által termelt mediátorok (vazoaktív anyagok, növekedési faktorok, citokinek) szintézisének szabályozásában, ingerlékeny szövetek elektrofiziológiai jellegzetességeinek (csatornaaktivitás, akciós potenciál kódolás, izomkontrakció) optimális kialakításában, a központi idegrendszer integritásának és működésének fenntartásában, a szervezet védekező mechanizmusainak regulációjában (fagocitózis, immunglobulin termelés), stb. (Nishizuka, 1988, 1992; Decker, 2003; Gutcher és mtsai, 2003; Becker és Hannun, 2005).

Az utóbbi időben azonban egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a PKC izoenzimek nemcsak szerkezeti, aktivációs és megoszlási heterogenitást mutatnak, hanem regulációjuk és biológiai szerepük is jelentősen különböz(het)ik egymástól (Nishizuka, 1992; Decker, 2003). Bebizonyosodott emellett az is, hogy egy adott sejtválasz (különös tekintettel a proliferáció és differenciálódás) kialakításában a különböző izoenzimek nemcsak eltérő aktivitással vehetnek részt, de hatásuk gyakran ellentétesnek adódik. Így például kiderült, hogy K-562 erythroleukémia sejtvonalban a cPKC α felelős a forbol-észter által indukált cytostasis kialakulásáért, míg a cPKC β_{II} ezen sejtek proliferációjában játszik szerepet (Murray és mtsai, 1993). Humán keratinocytákban (Papp és mtsai, 2004) és NIH 3T3 fibroblasztokban (Mischak és mtsai, 1993) kimutatták azt is, hogy míg a nPKC δ megállította a sejtek

proliferációját, addig a nPKC ϵ fokozta azt. Ezen túlmenően bebizonyították, hogy C6 glioma sejtekben (Brodie és mtsai, 1998) a PKC izoenzimek expressziós szintje feltűnően megváltozik a sejtek differenciálódása során.

A PKC izoenzimek és a harántcsíkolt izom kapcsolata

A PKC rendszer szabályozó szerepét vázizom esetén is leírták. Bebizonyították, hogy a PKC aktivitásának módosítása forbol-észterekkel fokozta az inzulinfüggő glükóz-transzportot (Henriksen és mtsai, 1989; Tanti és mtsai, 1989), stimulálta a D-vitamin indukálta kalciumfelvételt (Massheimer és de Boland, 1992), valamint utánozta a prosztanoidok hatását a myoblastok fúziójának serkentésében (Farzaneh és mtsai, 1989). A vázizomsejtek D-vitaminnal való kezelése módosította a PKC-k szubcelluláris lokalizációját (Marinissen és mtsai, 1998), ezzel támogatva azon hipotézist, amely a PKC szerepét feltételezi a vázizomsejtek különböző folyamatait módosító ágensek celluláris hatásainak közvetítésében. Bebizonyosodott továbbá, hogy a forbol-észterek képesek a kontraktilis proteinek kódoló génszakaszok down-regulációjára terminálisan differenciálódott myotube-okban (Zhu és mtsai, 1991) és megszünteti a myf5 gének (izomszabályozó-faktor, mely a vázizom prekursor sejtek kialakításában játszik szerepet) expressziójának dexamethason és az anisomycin általi up-regulációját.

Az izoenzimek specifikus szerepére vonatkozóan megállapították továbbá, hogy amíg az nPKC θ köponti szerepet játszik az inzulin vázizomhomeosztázist szabályozó folyamatainak kifejlődésében (Serra és mtsai, 2003), addig a cPKC α és az nPKC δ izoformák vesznek részt a tumor necrosis factor- α inzulin-szignalizációt gátló hatásában (Leitges és mtsai, 2002; Rosenzweig és mtsai, 2002). Ezen túlmenően kimutatták, hogy az nPKC δ és az aPKC ζ fokozza a glükóz-transzport mechanizmusok aktivitását (Braiman és mtsai, 1999, 2001a) valamint, hogy az aPKC ζ és λ izoformák meghatározó szereppel bírnak a fokozott

(izom)munkavégzés által beindított metabolikus és génexpressziós válaszok szabályozásában (Perrini és mtsai, 2004).

A PKC rendszer szerepet játszik a harántcsíkolt izomsejtek növekedésének szabályozásában is. Patkányból izolált primer vázizomsejt-kultúrákban specifikus PKC inhibitorral vagy a PKC aktivátor forbol 12-mirisztát 13-acetáttal (PMA) történő kezelés nem változtatta meg lényegesen a myogenikus differenciálódást (Lagord és mtsai, 1993). Ezzel szemben csirke vázizomsejteken a PMA módosította a differenciálódási marker expresszióját, szelektíven és reverzibilisen gátolta a differenciálódási programot (Mermelstein és mtsai, 1996), blokkolta a DNS-szintézist, valamint szelektíven down-regulálta a PKC α -t (Capiati és mtsai, 1999). Ehhez részben hasonlóan, normál tenyésztett humán izomban kimutatták, hogy a PMA dóziszfüggően gátolta a vázizomsejtek proliferációját és fúzióját, csökkentette az izomspecifikus differenciálódási marker dezmin expresszióját (Boczán és mtsai, 2001), valamint meggátolta a myogenezist a már fuzionált myotube-okban (Fisher és mtsai, 1982, 1983).

Meglehetősen szegényes, gyakran egymásnak ellentmondó, valamint (a fentiekhez hasonlóan) erősen fajfüggő jellegzetességeket mutató adatokkal rendelkezünk az egyes PKC izoformák specifikus szerepét illetően a vázizomsejtek proliferációjában és differenciálódásában. Legjobb tudomásunk szerint az eddigi vizsgálatok csupán azt állapították meg, hogy a cPKC α jelentős pozitív szabályozó szereppel bír csirke myoblastok proliferációjának fokozásában (Capiati és mtsai, 1999, 2000). Emellett kimutatták, hogy az nPKC θ overexpressziója fokozta egér (Miles és Wagner, 2000) és humán (Chalfant és mtsai, 2000) vázizomsejtek differenciálódását, habár az izoforma egér harántcsíkolt izomsejtekben történő overexpressziója nem érintette azok fúziós készségét (Miles és Wagner, 2000).

A hialinporc, a porcdifferenciáció legfontosabb lépései

A hialinporc különböző helyeken fordul elő a gerinces szervezetekben. Típusos lokalizáció a valódi ízületek csontfelszíneit borító ízületi porc, valamint a zsigerek falát merevítő állandó vagy zsigeri porc (Heinegard és Oldberg, 1989). Az állandó porcok sejtjei a perikondrium belső rétegében található kondrogenikus őssejtekből pótlódhatnak, míg a differenciált ízületi porc regenerációra képtelen a perikondrium hiánya miatt. Embrionális korban a porcszövet mezenchymális szövetből differenciálódik. A kondrogenikus őssejtek proliferációja, porcsejt irányba elkötelezett sejté alakulása, a porcsejt-fenotípus elnyerése és a porcszövet kialakítása egyaránt függ genomiális faktoroktól („master” gének, lásd alább), lokális mikrokörnyezeti tényezőktől (autokrin és parakrin növekedési faktorok és citokinek, extracelluláris mátrix és sejtadhéziós molekulák), valamint a differenciálódó sejtek felszíni receptorainak (integrinek, citokinreceptorok) mintázatától (Sandell és Adler, 1999). A porcsejtek differenciációját így módon számos, különböző forrásból származó faktor (hormonok, lokálisan termelt citokinek stb.) szabályozhatja. A porcdifferenciáció folyamatának kísérleti modellezésére kiválóan alkalmas a csirkeembriók végtagtelepeiből előállított primer, porcosodó high density (HD) sejt kultúra.

Mind az *in vivo*, mind az *in vitro* porcdifferenciálódás fontos kezdeti lépése a kondrogenikus sejtek kisebb sejtcsoportokba való kondenzációja. A saját kísérleteink során is használt HD mezenchimális kultúrákban a kondrogenikus sejtek kondenzációja az első tenyésztési nap folyamán zajlik, majd a második és harmadik napon a nodulusok sejtjei porcsejteké differenciálódnak (Ahrens és mtsai, 1977; San Antonio és Tuan, 1986). A korai sejt–sejt kapcsolatok a kondrogenikus sejtek felszínén megjelenő adhéziós molekulák révén valósulnak meg (Widelitz és mtsai, 1993; Oberlender és Tuan, 1994), ugyanakkor a szomszédos sejtek között számos gap junction is megjelenik (Kelley és Fallon, 1978). Az egyik legfontosabb citokincsoport, a transforming growth factor (TGF) család tagjairól

kimutatták, hogy az ide sorolható egyes citokinek (pl. bone morphogenetic proteinek [BMP] és receptoraik) a differenciáció több fázisában is befolyásolják a porcképződést (Kulyk és mtsai, 1989; Leonard és mtsai, 1991; Pizette és Niswander, 2000).

A sejtek felszínén és az intracellulárisan zajló változások mellett a differenciálódó sejteket körülvevő extracelluláris mátrix (ECM) is jelentős átalakulásokon megy keresztül. A sejtkondenzációt megelőzően és annak során a kondrogenikus sejtek nagy mennyiségű fibronektint választanak ki, miközben felszínükön fibronektint kötő integrinek expresszálódnak (Tavella és mtsai, 1997). A végtagbimbók mezenchimájának központi részében a hialuronsav koncentráció a kondenzáció fázisa előtt csökken (Toole, 1972); az I. típusú kollagén koncentrációja ekkor a legmagasabb, majd a porcsejtté való differenciálódás után fokozatosan csökken (Dessau és mtsai, 1980). A sejtek a továbbiakban megkezdik a porcspecifikus ECM-makromolekulák szintézisét, valamint a megkötésükhöz szükséges receptorok expresszióját. A differenciációt követően egyre nagyobb mennyiségben szintetizálódó II. típusú kollagén és aggregán teljesen körülveszi a porcsejteket. Ez az egyedi összetételű ECM nagy fontossággal bír a porcsejtek végleges fenotípusának kialakításában és fenntartásában (Cancedda és mtsai, 2000).

A kondrogenézis szabályozása – a PKC rendszer lehetséges szerepe

A porcdifferenciáció folyamatának egyik központi „master” génje a transzkripciós faktor Sox9 (de Crombrughe és mtsai, 2000). A differenciálódás szabályozásában ugyancsak kiemelkedő szerepet tulajdonítanak annak, hogy a sejtek jelentős mennyiségű prostaglandin E₂-t termelnek, ami az intracelluláris cAMP szintjének emelkedéséhez, majd a cAMP függő protein kináz A (PKA) aktiválódásához vezet (Biddulph és mtsai, 2000). Megállapították, hogy a porcdifferenciáció során a PKA cAMP és BMP-2 hatására egyaránt aktiválódik (Lee és Chuong, 1997). Bebizonyosodott az is, hogy a kondrogenikus sejtekben a PKA

foszforilálja a Sox9-et, s ezzel aktiválja a ECM-ot kialakító II. típusú kollagén és az aggregán központi fehérjéjének a génjét (Lefebvre és de Crombrughe, 1998; Healy és mtsai, 1999; de Crombrughe és mtsai, 2000). A PKA másik lehetséges target molekulája a „cAMP responsive element binding protein” (CREB). Megállapították, hogy a CREB-család transzkripciós faktorainak foszforilációja mind cAMP, mind a TGF-család (pl. BMP-2) mezenchimális kondenzációt elősegítő hatására fokozódik (Lee és Chuong, 1997).

Kiderült ugyanakkor az is, hogy kondrocitákban a CREB a PKC-rendszer jelátviteli útvonalainak eredményeképpen is foszforilálódhat (Xie és Rothstein, 1995), mely felvetette a PKC-kapcsolt szignalizáció esetleges szerepét a porcdifferenciálódás szabályozásában. Kezdetben azt gondolták, hogy a PKC gátolja a porcdifferenciációt, hisz a staurosporin (mint PKC inhibitor) fokozta a kondrogenezist; később azonban kiderült, hogy a staurosporin egyéb hatásainak következtében fokozódott a porcdifferenciáció (Chang és mtsai, 1998). Megállapították ugyanakkor azt is, hogy a PKC-aktivitás általános gátlása (például PKC-specifikus forbol-észterekkel) a porcdifferenciáció csökkenéséhez vezetett (Sonn és Solursh, 1993). Érdekes megfigyelés volt ugyanakkor, hogy a MAPK Erk-1 foszforiláltsága a PKC-aktivitás gátlásával párhuzamosan emelkedett, mely felvetette, hogy a PKC gátlása az Erk-1 aktiválódásán keresztül gátolhatja a porcdifferenciációt (Chang és mtsai, 1998).

Mindezen kisszámú irodalmi adat – habár egyértelműen alátámasztotta a PKC rendszer porcdifferenciálódásban betöltött szerepének fontosságát – nem adott egyértelmű választ a PKC-függő folyamatok részleteiről. Szinte teljes mértékben hiányzik emellett az egyes PKC izoenzimek specifikus szerepének leírása a kondrogenézis folyamataiban.

CÉLKITŰZÉSEK

Mint azt korábban bemutattuk, meglehetősen szegényes információval rendelkezünk az (izomregeneráció folyamatainak tekintetében) egyik legfontosabb növekedési faktor, az IGF-I celluláris hatásmechanizmusát illetően humán tenyésztett vázizomsejteken. Ezért kísérleteink első részében az alábbi célkitűzések kísérletes megvalósítását hajtottuk végre:

1. Először az IGF-I hatását kívántuk jellemezni primer humán vázizomsejtek *in vitro* növekedésére, fúziójára és differenciálódására.
2. Ezt követően, kombinált farmakológiai és képkotó módszerek alkalmazásával, vizsgáltuk az IGF-I celluláris hatásának kifejlődésében (potenciálisan) résztvevő jelátviteli útvonalak (MAPK, PI3-K, PKC izoenzimek) szerepét.
3. Egy más speciesből származó vázizomsejtekkel való összehasonlítás érdekében fenti kísérleteinket elvégeztük az egér C2C12 myoblast sejtvonalon is. A C2C12 sejtek használata emellett lehetővé tette, hogy kísérletes technikáinkat molekuláris biológiai módszerekkel (pl. rekombináns overexpresszió) is kiegészítsük, melyek segítségével a szignalizációs útvonalak szerepe még pontosabban volt tisztázható.

Kísérleteink második részében a PKC család tagjainak izoforma-specifikus szerepét kívántuk tanulmányozni a vázizomsejtek *in vitro* és *in vivo* proliferációjának szabályozásában.

1. Célunk megvalósításának érdekében ezért rekombináns technikákkal bizonyos PKC izoformákat (cPKC α és β ; nPKC δ és ϵ) stabilan overexpresszáló C2C12 myoblastokat készítettünk, majd ezen molekuláris biológiailag megváltoztatott sejteken elemeztük az *in vitro* proliferáció, fúzió és differenciálódás folyamatait, valamint a morfológiai jellegzetességeket.
2. Ezzel párhuzamosan, az egyes PKC izoenzimek endogén szerepének további tisztázására, különféle szelektív és specifikus PKC gátlószereket alkalmaztunk, majd

vizsgáltuk az alkalmazott anyagok hatását kontroll C2C12 myoblastok sejtproliferációjára és differenciálódására.

3. Végezetül *in vivo* kísérleteinkben a rekombináns módszerekkel megváltoztatott PKC overexpresszor C2C12 sejteket immunhiányos (Severe Combined Immuno Deficiency, SCID) egerekbe injektáltuk, majd a kifejlődött daganatokat elemezve vizsgáltuk a PKC izoenzimek szerepét a tumorigenezis folyamatainak szabályozásában.

Kísérleteink harmadik lépésében csirkeembriókból izolált primer high density porckultúrákban vizsgáltuk a PKC izoformák szerepét az *in vitro* porcdifferenciálódás szabályozásában.

1. Vizsgálataink első lépésében feltérképeztük a porckultúrák PKC izoenzimintázatát, valamint nyomonkövettük a porcdifferenciálódás során expressziójukban bekövetkező változásokat.
2. Vizsgálni kívántuk emellett a PKC izoenzimek, különös tekintettel a PKC μ enzimaktivitásában bekövetkező változásokat a differenciálódás előrehaladtával.
3. Végül a PKC μ inhibitor rezveratrol jelenlétében vizsgáltuk a porcképződés folyamatát.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Humán vázizomsejtek tenyésztése

A szatellitasejtek tenyésztéséhez az izomminták ortopédsebészeti beavatkozásokból származtak, a Debreceni Egyetem Etikai Bizottságának jóváhagyásával. Az izomsejtek tenyésztésének technikája Boczán és mtsai (2000) módszerét követte. A minták enzimatis emésztése (3 x 15 perc) 37 °C-on kollagenázt (250 U/ml, Type II, Sigma, St. Louis, MO, USA) és baktotripsint (3%, Difco, Detroit, USA) tartalmazó kalcium/magnézium-mentes foszfát-pufferben (CMF-PBS, pH: 7,4) történt. A reakció leállításához Hank-oldatot (136,75 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 0,34 mM Na₂HPO₄, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,81 mM MgSO₄, 1,26 mM CaCl₂, 5,56 mM glükóz, 4,17 mM NaHCO₃, 10 mg/ml fenol vörös, pH 7,2) alkalmaztunk, amelyet 10% főtális borjúsavóval (FCS) (Invitrogen, Paisley, UK) egészítettünk ki. Kísérleteink következő lépésében a sejtszuspenzió fibroblast-mentesítése végett mágneses szeparálást végeztünk (Magnetic Cell Sorting (MACS); Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Németország). A szűrések és centrifugálások után (3×100g, 10 percig) a pelletet kétszer mostuk 0,5% borjú szérum albumint (BSA, Sigma) tartalmazó PBS-ben. Ezt követően a pelletet 20% anti-fibroblaszt MicroBead-et (Miltenyi Biotech) tartalmazó PBS-BSA-ban reszuszpendáltuk, majd 30 percig szobahőmérsékleten, sötét szobában inkubáltuk. A nem kötődő antitestek PBS-BSA-val történő kimosása után a sejteket a MACS mágneses terébe helyezett szeparációs oszlopra vittük fel. Ezután az oszlopot 5 ml PBS-BSA-val mostuk. Mivel a mágnesesen jelölt fibroblasztok fennmaradtak az oszlopon, ezért csak az átcöpögő frakciót gyűjtöttük össze. Ezen fibroblaszt-mentes izomsejt-szuspenziót szűrések és centrifugálások után (3×100g, 10 percig) 5% FCS-t és 5% lószérumot (HS; Invitrogen) tartalmazó Ham F-12 (Sigma) tápoldatban reszuszpendáltuk (2,5 mg/ml glükóz, 0,3 mg/ml glutamát, 1,2 mg/ml NaHCO₃, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 1,25 µg/ml fungison), mely magas szérumtartalom elősegítette a sejtek proliferációját (Boczán és mtsai,

2000). Ezután a sejteket 37 °C-os termosztátban, 5% CO₂ tartalom mellett tenyésztettük üveg fedőlemezen (Menzel-Glaser, Braunschweig, Németország), Petri-csészékben vagy 4-lyukú tenyésztőedényekben (Nunc, Kamstrup, Dánia). A 3. napon a médiumot Dulbecco által módosított tápoldatra (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM, Sigma) cseréltük le, amely alacsony, 2% FCS és 2% HS tartalmánál fogva a myoblastok fúzióját és differenciálódását segítette elő (Boczán és mtsai, 2000). A tápoldatokat kétnaponta cseréltük. A szeparált sejt kultúrákat a 2. naptól (a tenyészetben nagy mennyiségben levő vérsejtek lemosása után) naponta kezeltük a különböző anyagokkal.

C2C12 sejtek tenyésztése

Kísérleteink másik részében egér rhabdomyomából izolált C2C12 sejt vonalat használtunk. Ezen sejtek megtartották proliferációs és differenciálódási sajátosságait, így a tenyésztett primer vázizomsejtek kiváló modelljének tekinthetők. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú atmoszférában, DMEM (Sigma) tápoldatban tenyésztettük, amely 15% FCS-t (Invitrogen), 50 U/ml penicillint, 50 µg/ml streptomicint és 1,25 µg/ml fungizont (Biogal) tartalmazott. A sejtek passzálása mindig szubkonfluens állapotban történt.

Porcosodó high density (HD) sejt kultúrák tenyésztése

A porckultúrákat a Hamburger-Hamilton szerinti 22-24-es fejlettségi stádiumban lévő csirkeembriók (Ross és Hybro fajták) distális végtagtelepeiből izoláltuk. A porcosodó mezenchimális sejtekből a primer high density kultúrákat 15×10^6 sejt/ml sűrűségű sejtuszpenzióból 100 µl-es cseppek felhasználásával hoztuk létre. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú atmoszférában, Ham-F12 (Sigma) tápoldatban tenyésztettük, amely 10% FCS-t (Invitrogen), 50 U/ml penicillint, 50 µg/ml streptomicint és 1,25 µg/ml fungizont (Biogal) tartalmazott.

A sejtnövekedés és fúziós index vizsgálata humán vázizomsejteken

A humán sejt kultúrákat a 3. naptól kezeltük különböző koncentrációjú (10 ng/ml és 100 ng/ml) IGF-I-gyel (Sigma) és/vagy különböző inhibitorokkal, így a klasszikus cPKC izoenzimek gátlószerével, a Gö6976-tal (Calbiochem, San Diego, CA, USA); a klasszikus és novel (cPKC és nPKC) csoportba tartozó izoenzimek gátlószerével, a GF109203X-szel (Calbiochem); valamint a nPKC δ szelektív inhibitorával, a Rottlerinnel (Calbiochem). A kontroll csoportokat a vivőanyag dimetil-szulfoxiddal (DMSO, Sigma) kezeltük. A sejtnövekedés szabályozásában résztvevő lehetséges jelátviteli útvonalak vizsgálatához a Wortmannint (Calbiochem), mint a PI3-K inhibitorát, míg a MAPK útvonal gátlásához a PD098059 [2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one] (Calbiochem) anyagot alkalmaztuk. A szatellitasejtek proliferációját a morfológiai jegyek, valamint növekedési görbék (a sejtmagok naponkénti számolásával; 5 látótér/edény) segítségével határoztuk meg, fáziskontraszt mikroszkóp (Hund GmbH, Wetzlar) alkalmazásával (Boczán és mtsai, 2000). A fúziós indexet a következő módon határoztuk meg: a legalább 2 magvú, már fuzionált izomsejtekben található látóterenkénti összesített magszámot elosztottuk az adott látótérben levő összes (tehát a még nem fuzionált szatellitasejt magok és a többmagvú izomsejtek magjainak összege) magszámmal. Eredményeinket átlag \pm SEM formában adtuk meg.

A sejtproliferáció vizsgálata C2C12 myoblastokon

A proliferáció vizsgálatához bróm-deoxi-uridint (BrDU) felhasználó kolorimetriás assay-t végeztünk. A módszer lényege, hogy a timidin-analóg BrDU a proliferáló sejtek DNS-ébe épül be, melynek mértéke a timidin-analóg ellen termeltetett antitest Fab-fragmentjéhez kapcsolt peroxidáz enzim, valamint tetra-metil-benzidin szubsztrát alkalmazásával kolorimetriásan mérhető. A C2C12 sejteket 96-lyukú tenyésztőedényekben 5000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük, és az alkalmazott anyagok megfelelő koncentrációival kezeltük. Ezt

követően minden lyukba 100 µl 10%-os BrdU jelölő reagenst (10 µM BrdU foszfát pufferben, PBS: 115 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7.4; Sigma) adtunk és 3 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Ezután a sejteket fixáltuk, a DNS-üket 200 µl Fixdenat oldattal denaturáltuk, majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A következő lépésben 100 µl anti-BrdU-POD munkaoldatot (BrdU ellenes monoklonális egér-egér hibrid sejtekben termeltetett, peroxidázzal kapcsolt antitest) mértünk minden lyukba, és a sejteket 90 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a sejteket 200 µl/lyuk PBS-sel háromszor mostuk, a mosóoldat eltávolítása után 100 µl/lyuk szubsztrát oldattal (tetra-metil-benzidin) inkubáltuk őket 30 percen keresztül. A reakció leállításához 25 µl 1 M H₂SO₄-at alkalmaztunk, majd 450 nm-en mértük az abszorbanciát. Minden kezelést 3-5-szörös ismétléssel végeztünk, az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. Amikor a PKC overexpresszor sejtek növekedési tulajdonságaira voltunk kíváncsiak, a sejteket 1000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük, és a BrdU beépülést a megadott tenyésztési napokon határoztuk meg.

Kísérleteink másik részében a PKC overexpresszorok kettőződési idejének, valamint maximális sejtszámának megállapításához a sejteket (három párhuzamos kísérletet futtatva) 10⁴ sejt/lyuk denzitásban 12-lyukú edényekbe szélesztettük komplett DMEM-ben (a médiumot kétnaponta cseréltük). A sejteket ezután a bemutatandó tenyésztési napokon tripszin alkalmazásával összegyűjtöttük, és a sejtszámot hemocitóméter segítségével határoztuk meg. Az átlagos kettőződési idők vizsgálata során a számolás kezdő időpontjának a szélesztést követő 24. órát választottuk, hogy elkerüljük a kezdeti lemaradások okozta artefaktumokat (Ács és mtsai, 1997b). A kettőződési idők kiszámításához a következő egyenletet használtuk: $\tau = D/\log_2(N/N_0)$, ahol τ a kettőződési idő, D a tenyésztési napok száma, N és N₀ a sejtek száma a kísérletek végén és az elején.

A maximális sejtdenzitás megállapításához a sejteket 12-lyukú edényben növesztettük a konfluencia eléréséig, további három napig posztkonfluens állapotban tartottuk őket (napi oldatcserével), ezt követően a fenti módszer segítségével sejtszámolást hajtottunk végre.

A sejtprolifерáció vizsgálata porcosodó sejtenyészeten

A tenyésztéshez használt sejtszuszpenzió 15 μ l-es cseppjeit 96-lyukú tenyésztőedényekbe szélesztettük, és ugyanolyan kísérleti körülmények között tenyésztettük, mint a Petri-csészékben növekvő kultúrákat (lásd fent). A 3. tenyésztési napon 1 μ Ci/ml 3 H-timidint (törzsoldat: metil- 3 H-timidin, 37 MBq, 1 mCi/ml 185 GBq; Amersham, Little Chalfont, UK) adtuk minden egyes kultúra tápfolyadékához, majd 16 órán át inkubálást végeztünk. A médium eltávolítása után néhány órán át normál táptalajban tartottuk a kultúrákat, hogy az esetleg aspecifikusan bekötődő radioaktív anyag kimosódjon. Ezt követően fiziológias sóoldattal kétszer átmostuk a kultúrákat, majd 20 percig tartó, 5 % triklórecetsavas kezeléssel kicsaptuk a szolubilis fehérjét. CMF-PBS-sel történő öblítéseket követően a tenyészetek sejtjeit CMF-PBS-ben oldott 0,25 % tripszinnel (Sigma) emésztettük (37 °C, 10 perc), végül félautomata sejt-harvesterrel (Skatron, Lier, Norvégia) összegyűjtöttük. A sejteket szcintillációs filterpapírra (Skatron) szárítottuk rá, majd a szcintillációs folyadék hozzáadása után a radioaktivitást béta-számlálóval (Pharmacia, Uppsala, Svédország) mértük.

PKC vektorok

A PKC vektorokat a korábban leírtak szerint állítottuk elő (Ács és mtsai, 1997a, 1997b; Li és mtsai, 1999; Papp és mtsai, 2004), melynek során a PKC α , β , δ és ϵ ; a kináz negatív PKC δ (DN-PKC δ); valamint az üres vektor cDNS szekvenciáit egy metallothionein promotor-vezérelt eukarióta expressziós vektorba (MTH) klónozták (Oláh és mtsai, 1994). A

vektor szekvenciája a C-terminálison a PKC ϵ 12 aminosavból álló, specifikus szekvenciáját kódoló szakaszát (ϵ -tag) is tartalmazza, melynek fehérjeterméke fúziós proteinként minden egyes rekombináns (azaz a C2C12 sejtekben overexpresszált) PKC izoenzim végéhez hozzákapcsolódik. Amint azt korábban már ismertették (Ács és mtsai, 1997a, 1997b), ezen ϵ -tag szakasz sem az adott izoforma lokalizációjára, sem pedig transzlokációjára (azaz fiziológias működésére) nincs hatással.

Rekombináns PKC overexpresszált C2C12 sejtek készítése

A C2C12 sejteket 40 mm-es Petri-csészékbe (Techno Plastic Products AG, Genf, Svájc) szélesztettük, majd a megfelelő konfluencia (50-60 %) elérése után vagy az üres pEMTH vektorral (kontroll sejtek esetében), vagy a PKC α , β , δ , ϵ , illetve a DN-PKC δ cDNS-ét tartalmazó vektorok egyikével transzfektáltuk őket (Ács és mtsai, 1997a, 1997b; Papp és mtsai, 2004). A transzfekciót 2 μ g cDNS-t felhasználva, Superfect anionos detergenssel (Qiagen, Hilden, Németország) hajtottuk végre szérumentes DMEM oldatban, a gyártó által javasolt protokollt követve. A transzfektált sejteket ezután szérumtartalmú, 825 μ g/ml G418 antibiotikummal (geneticin, Invitrogen) kiegészített DMEM oldatban 12-18 napig szelektáltuk, majd egyedi kolóniákat (klónok) izoláltunk. A szelektálás alapjául az szolgál, hogy a pEMTH vektort stabilan overexpresszált sejtek geneticin rezisztenciával rendelkeznek, míg a vektort fel nem vevő sejtek a G418 tartalmú tápoldatban elpusztulnak. Ezen tulajdonságot használtuk ki a sejtek további tenyésztése során is, mikor a klónokat 550 μ g/ml G418-tartalmú DMEM oldatban tenyésztettük folyamatosan, majd Western blot és kináz-assay segítségével ellenőriztük a stabil transzfekció és overexpresszió hatékonyságát (lásd alább az **13. és 17. ábrák**on). Ennek során a rekombináns technikákkal overexpresszált izoformák azon tulajdonságát használtuk ki, hogy az összes rekombináns exogén forma (a pEMTH vektor szerkezete miatt) C-terminálisán a PKC ϵ 12 aminosavból álló, specifikus

szekvenciáját (ϵ -tag) is expresszálja. Ezen epitóp ellen termeltetett anti-PKC ϵ antitest (Sigma) képes mind az endogén PKC ϵ felismerésére (kb. 90 kDa-os sáv), mind pedig az exogén izoformák jelölésére (kb. 80 kDa-os sáv). Kísérleteinket transzfektált sejtek „pool”-jain hajtottuk végre, ugyanakkor eredményeinket minden izoforma esetében legalább 3 klón hasonló vizsgálatával ellenőriztük.

Antitestek

A PKC izoenzimek meghatározásánál alkalmazott antitesteket, melyek igazoltan specifikusan reagálnak a humán PKC izoformákkal (Boczán és mtsai, 2000, 2001), nyúlban termeltették. Az anti-PKC α , γ , η , ϵ és ζ a Sigma, míg az anti-PKC δ , θ és μ a Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA) terméke. Az általunk vizsgált differenciálódási marker dezmin kifejeződésének vizsgálatához, illetve expressziójában esetlegesen bekövetkező változások kimutatására egérben termeltetett dezmin ellenes (DAKO, A/S, Glostrup, Dánia) antitestet használtunk. Kísérleteinkben a jelátviteli folyamatok vizsgálatára alkalmazott MAPK Erk-1/2 nyúlban termeltetett poliklonális, a foszfo-ERK-1/2 (pErk-1/2) egérben termeltetett monoklonális, valamint az immunprecipitáció során felhasznált foszfo-Tirozin (pTyr) egérben termeltetett monoklonális antitest volt (mind Santa Cruz).

Western (immuno)blot

A tenyésztett sejteket hideg CMF PBS-ben mostuk, lízis-pufferben (5 mM EGTA, 20 mM Tris-Cl, 20 μ M leupeptin, 1 mM 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid, pH 7,4; Sigma) homogenizáltuk, végül ultrahangos szonikálással a sejteket feltártuk (Lázár és mtsai, 2003). Az így elkészített minták proteintartalmának meghatározása BCA protein assay-vel (Pierce, Rockford, IL, USA) történt. Ezután a minták proteintartalmát 2 mg/ml-re állítottuk be, majd az azonos proteintartalmú mintákat SDS mintapufferben (10% glicerin, 2% SDS, 0,062 M

Tris, 20 mM ditiotreitól, 0,002% brómfenolkék és 5% β -merkaptoetanol; Sigma) 10 percig főztük. Az így elkészített mintákat SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) 100 V konstans feszültségen választottuk el. A gélelektroforézishez 7,5%-os gél készítettünk, amelyekre 20 μ g/vályú proteint vittünk fel. Ezután a gélről a fehérjéket 100 V konstans feszültségen nitrocellulóz membránra (Bio-Rad, Bécs, Ausztria) transzferáltuk. Ezt követően a membrán szabad kötőhelyeit 5% tejet tartalmazó PBS-sel 20 percig blokkoltuk, majd a megfelelő elsődleges antitesttel inkubáltuk. Az elsődleges antitestek hígítása 5% tejet tartalmazó PBS-ben történt, majd a membránokat egy éjszakán keresztül 4 °C-on tartottuk. Az inkubációt követően a membránokat 30 percig PBST-ben (0,1% Tween-20 PBS-ben, Sigma) mostuk, és megfelelő torma-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (1:1000 hígítás 5% tejet tartalmazó PBS-ben) inkubáltuk, vagy ABC kitet alkalmaztunk (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 1:1000 hígításban. Az immunjelek rögzítése minden esetben kemilumineszcens (ECL) kit (Pierce, Rockford, IL, USA), a detektálás pedig fényérzékeny film (AGFA, Brüsszel, Belgium) vagy Fujifilm LAS 3000-es darkbox (Fujifilm, Tokió, Japán) segítségével valósult meg. Az expresszió kvantitatív meghatározását denzitométer, valamint megfelelő szoftver (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Inc. Georgia, USA) segítségével hajtottuk végre. Annak megállapítására, hogy a minták felvitele egyformán történt-e, a nitrocellulóz membránokat 65 °C-on 1 órán át inkubáltuk 200 ml 50 mM Tris-HCl pufferben (pH 7.5) (2% SDS és 1% β -mercaptoethanol). A membránokat ezután egérben termeltetett cytochrome-C (Cyt-c) ellenes antitesttel (1:100 PBS tejben) (Santa Cruz) festettük meg, majd az előzőekhez hasonlóan elemeztük az intenzitásokat.

A rekombináns PKC izoenzimek aktivitásának meghatározása (kináz assay)

A transzfektált C2C12 sejtek PKC aktivitásának megállapítása a korábban ismertetett módon történt (Ács és mtsai, 1997a; 1997b; Li és mtsai, 1999). Ennek során a sejteket a fent leírt lízis-pufferben homogenizáltuk, majd a sejt-lizátumok kináz-aktivitását hiszton III (H-III), vagy pulyka gyomrából izolált (Hathway és Haerberle, 1983) 20 kDa nagyságú simaizom miozin könnyű-lánc 20 (MLC20) szubsztrátok segítségével vizsgáltuk. Az assay-hez használt oldat 20 mM Tris-HCl-ot (pH 7,5), 20 mM MgCl₂-ot, 1 mM CaCl₂-ot, 25 μM [γ -³²P]-ATP-t (600-1000 cpm/pmol) és 0,2 mg/ml H-III vagy MLC20 szubsztrátot tartalmazott. A reakciót [γ -³²P]-ATP (Izinta Ltd., Budapest, Magyarország) hozzáadásával indítottuk, majd 30 perc inkubáció következett. Ezt követően a mintákat P81 foszfocellulóz papírra cseppentettük, előbb háromszor 500 ml 0.5%-os foszforsavban, végül acetonban mostuk. A ³²P fehérjékbe történő beépülését a megszártított P81 papíron szcintillátor segítségével detektáltuk. A meghatározásokat minden esetben háromszoros ismétléssel végeztük el.

PKC enzimaktivitás mérése porckultúrákban

A PKC-enzimaktivitásokat porcsejteken 1, 2, 3, 4 és 6 napos tenyészetek homogenizátumaiban vizsgáltuk a fent leírt módszer segítségével. A PKC μ enzimaktivitás-mérése a fentieként annyiban tért el, hogy ebben az esetben a hiszton III szubsztrát helyett a PKC μ specifikus szubsztrátjának tekinthető syntide-2-be (Sigma) történő ³²P beépülését mértük 3 mM rezveratrol (Sigma) jelenlétében, illetve ennek hiányában. Az assay-hez használt oldat 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,2 mM ditiotritol, 4,2 μg/ml gordox, 4,2 μg/ml leupeptin, 0,4 mM fenil-metil-szulfonil, 2,0 mM benzamidin, 4,2 μg/ml tripszininhibitor, 135 μg/ml foszfatidil-szerin, 5,4 μg/ml forbol-mirisztát-13-acetát, 0,67 mg/ml syntide-2, 0,12 mM ATP, 12 mM Mg-acetát (mind Sigma), valamint 1x10⁶ cpm aktivitású [γ -³²P]-ATP-t tartalmazott.

Immunprecipitáció

A sejteket többször mostuk hideg CMF PBS-sel, majd 1 ml RIPA-pufferben (50 mM Tris-HCl, 1% NP-40, 0,25% Na-deoxycholate, 1 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1µg/ml Aprotinin, 1µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA; mind Sigma) összegyűjtöttük. Ezt követően jégen ultrahangos sejteltávolítást végeztünk, majd a sejtszuszpenziót 4 °C-on 15 percig kevertettük, majd a mintákat 15 percig centrifugáltuk 15000 g fordulaton. A felülúszót új centrifugacsőbe helyeztük, és a sejtizátumhoz előbb 100 µl A/G agarózt (Santa Cruz), majd az immunprecipitációhoz anti-PKCδ antitestet (5 µl, Santa Cruz) adtunk. A sejtizátum – antitest keveréket 1 éjszakán keresztül 4 °C-on kevertettük, majd újabb centrifugálást követően (14000 g, 5 perc) a felülúszó eldobása után a pelletet 3-szor mostuk 800 µl hideg RIPA-pufferrel. A pelletet lízis-pufferben felszedtük, majd a fehérjék protein koncentrációját BCA protein assay-vel (Pierce) meghatároztuk. Western blothoz elsődleges antitestként pTyr antitestet alkalmaztunk (Sigma).

Immuncitokémia és konfokális mikroszkópia

A PKC izoenzimek IGF-I hatására bekövetkező esetleges szubcelluláris lokalizáció változásait immunfestést követő konfokális mikroszkóp technikával vizsgáltuk (Boczán és mtsai, 2001). A sejtenyészeteket többszöri CMF PBS-sel történő mosás után 5 percig 4 °C-os acetonnal fixáltuk, majd 30 percre 1% BSA és 0,6% Triton X-100 (mindkettő a Sigmától) tartalmú blokkoló oldatba helyeztük. A sejteket ezután 2 órán keresztül az adott PKC elleni, nyúlban termeltetett antitesttel (hígítás: 1:50 blokkoló oldatban) inkubáltuk. Ezt követően másodlagos antitestként kecskében termeltetett fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) konjugált nyúl elleni antitesttel történő inkubáció következett (1 óra, hígítás: 1:300 PBS-ben, Vector, Burlingame, CA). Végezetül a mintákat PBS-sel történő mosás után DAPI-t tartalmazó fedőanyaggal (Vector) fedtük, majd a sejtekről Zeiss Laser Scanning konfokális

mikroszkóppal (Oberkochen, Németország) felvételeket készítettünk. A negatív kontrollok primer antitestek felhasználása nélkül készültek, ahol magfestésen kívül más festődést nem tapasztaltunk.

A porcsejtek metakromáziás festése és fénymikroszkópos vizsgálata

A tenyésztéshez használt sejtszuszpenzió 30 µl-es cseppjeit 24-lyukú tenyésztőedényekbe üveg fedőlemezekre (Menzel–Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, Németország) cseppentettük. A rezveratrollal kezelt és kezeletlen (kontroll) HD-kultúrákat a tenyésztés befejezését jelentő 6. napon – CMF PBS-sel történő mosás után – 40% formaldehid és abszolút alkohol 4:1 arányú keverékével 30 percen át fixáltuk. A kultúrákat dimetil-metilénkék (DMMK, Sigma) 3% ecetsavban oldott 0,1%-os oldatával 5 percig festettük, majd 3 %-os ecetsavval mostuk és gumiarábikummal lefedtük (Módis, 1991). Az alacsony pH-n történő DMMK-festést követően a porcmatrix magas proteoglikán tartalmánál fogva erős, vörös metakromatikus színben látszik, míg az ortokromatikus kék festődés elhanyagolható ezen körülmények között.

A tumorgenezis vizsgálata SCID egerekben

A különböző PKC izoformákat overexpresszáló és a kontroll C2C12 sejteket a korábban említett körülmények között tenyésztettük, a 80%-os konfluencia elérése után tripszinnel összegyűjtöttük, és CMF PBS-sel kétszer átmostuk. Ezt követően a sejteket újraszuszpendáltuk $1-2 \times 10^6$ élő sejt/200 µl PBS denzitásban. A sejtszuszpenziót ezután SCID egerekbe intradermálisan injektáltuk, majd az egereket 30 napig megfigyelés alatt tartottuk. Az állatokat végül eutanizáltuk és vizsgáltuk a kialakult tumorok átlagos háromdimenziós méreteit, valamint hisztológiai jellegzetességeit (minden csoportban 3-5 állattal) (Papp és mtsai, 2004).

Hisztológia és immunohisztokémia

A kialakult tumorok hisztológiai paramétereit formalin-fixált, paraffinba ágyazott hematoxilin-eozin (HE)-festett metszeteken határoztuk meg (Papp és mtsai, 2004). A

sejtosztódások átlagos számának megállapításához fénymikroszkóp segítségével tíz különböző, nagy nagyítású látótérben megszámoltuk a mitózis látható jeleit mutató sejtmagvakat és az így kapott eredményeket a tumorok minden csoportja esetében átlagoltuk. A proliferáló sejtek számának meghatározásához a metszeteken a proliferációs (nukleáris) marker Ki-67 (Rose és mtsai, 1994) elleni, streptavidin-biotin-komplex (SABC) alapú immunhisztokémiai eljárást alkalmaztuk (DAKO, Hamburg, Németország). Első lépésben 3%-os, 100% metanolban oldott H₂O₂ segítségével (mindkettő Sigma) blokkoltuk az endogén peroxidáz-aktivitást. Ezután a nem specifikus kötőhelyeket PBS-ben (pH 7,5) oldott 1%-os BSA-val (Sigma) fedtük le. A Ki-67 ellenes monoklonális, egérben termeltetett elsődleges antitestet PBS-ben, 1:50 hígításban alkalmaztuk. Ezután a metszeteket nedveskamrában, biotinilált egér-ellenes másodlagos antitest (1:100 PBS-ben; DAKO) felhasználásával inkubáltuk, amit a peroxidáz-konjugált streptavidin (1:600 PBS-ben; DAKO) és kromogénként VIP SK-4600 (Vector) alkalmazása követett. Végezetül a szövettani mintákon enyhe metilénzöld (DAKO) ellenfestést alkalmaztunk és Aquatex-szel (Merck, Bécs, Ausztria) fedtük őket. A proliferáló (Ki-67 pozitív) sejtek átlagos számának meghatározásához fénymikroszkóp alatt megszámoltuk a tíz különböző, nagy nagyítású látótérre eső Ki-67 pozitív sejteket, és a kapott (átlagolt) értékeket a látóterekben meghatározott teljes sejtszámra normalizáltuk.

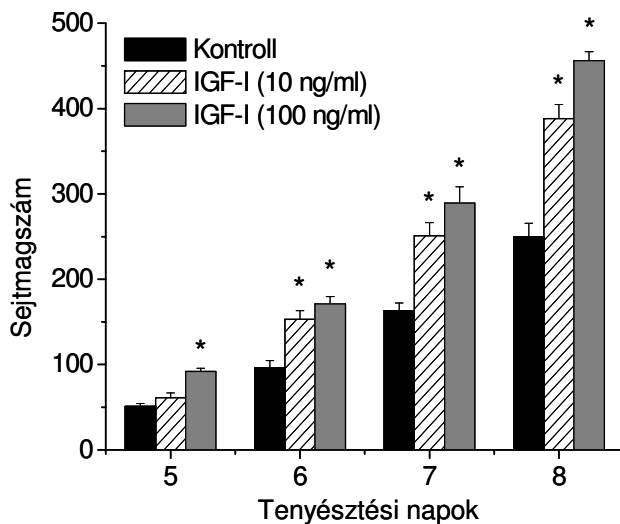
Statisztikai elemzések

Mérési eredményeinket átlag \pm SEM formában adtuk meg. Az adatok statisztikai kiértékelésére és összehasonlítására 5%-os szignifikancia szinttel dolgozva a Student-féle *t*-tesztet alkalmaztuk.

EREDMÉNYEK

Az IGF-I fokozza a proliferációt, fúziót és az izomspecifikus differenciálódási marker dezmin kifejeződését humán vázizomsejtekben

Kísérleteink első részében IGF-I hatását vizsgáltuk humán tenyésztett vázizomsejtek proliferációjára, fúziójára és differenciálódására.



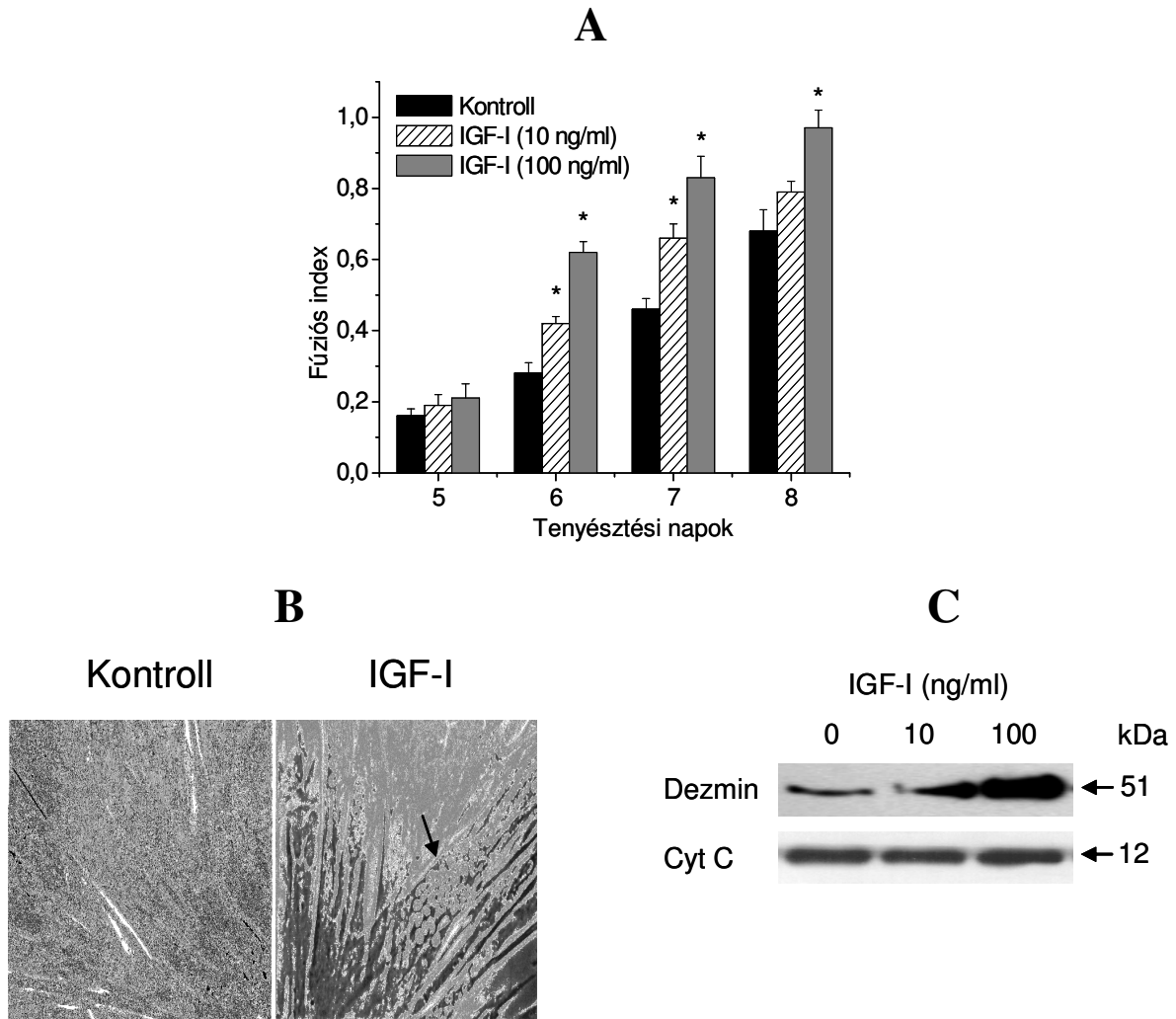
2. ábra Az IGF-I hatása a sejtproliferációra humán tenyésztett vázizomsejteken

A sejteket a 3. tenyésztési naptól kezdve kezeltük az IGF-I különböző koncentrációival (10 ng/ml vagy 100 ng/ml) illetve a vivőanyag DMSO-val (kontroll). A sejtmagszámot naponta határoztuk meg az "Anyagok és módszerek" részben leírtaknak megfelelően. A kapott értékeket átlag \pm SEM formában tüntettük fel és csillaggal jelöltük a kontrolltól való szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$).

A sejtmagszám változásának nyomonkövetése során kiderült, hogy az IGF-I már az 5. naptól kezdve (két nappal a kezelések után) – de még inkább a 6-8. napokon – dózis- és időfüggően fokozta az egy látóterre eső sejtmagszámot (**2. ábra**), azaz az *in vitro* izomregeneráció korai lépésének tekinthető sejtproliferációt.

A humán vázizomsejtek esetében ugyanakkor a sejtek proliferációjával párhuzamosan elindul a differenciálódási program is, mely során sokmagvú myotube-ok jönnek létre és megemelkedik az izomspecifikus differenciálódási markerek (pl. dezmin) expressziója (Grounds, 1991; Bornemann és Schmalbruch, 1992; Boczán és mtsai, 2000, 2001). Ezen eseményeket vizsgálva kimutattuk, hogy az IGF-I az 5. nap környékén meginduló fúziót is dózisfüggően fokozta (**3/A és B ábra**). Ezzel párhuzamosan Western blot technika alkalmazásával bebizonyosodott, hogy a növekedési faktor jelentősen megnövelte az izomspecifikus differenciálódási marker dezmin kifejeződését is (**3/C ábra**). Mindezen

adataink arra utaltak, hogy az IGF-I dózisfüggően fokozta mind a korai (proliferáció), mind a késői (fúzió és dezmin expresszió) regenerációs eseményeket humán tenyésztett vázizomsejt kultúrákban.

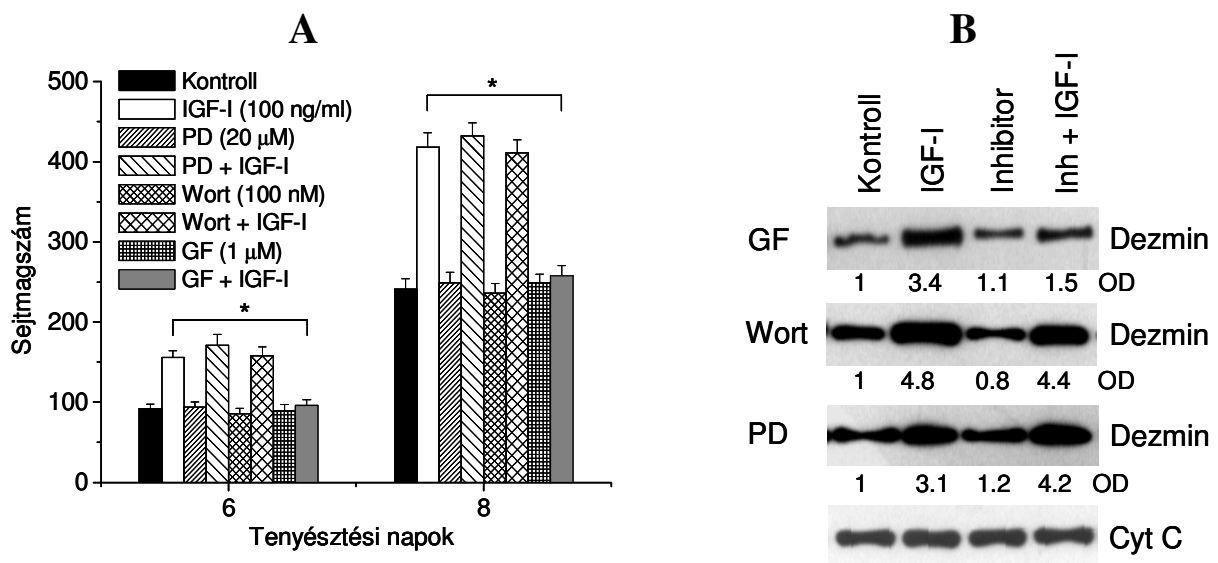


3. ábra Az IGF-I hatása a fúzióra és az izomspecifikus differenciálódási marker dezmin kifejeződésére humán vázizomsejteken

A) A sejteket a 3. tenyésztési naptól kezdve kezeltük az IGF-I különböző koncentrációival vagy a vivőanyag DMSO-val (kontroll). A fúziós indexet naponta meghatároztuk az "Anyagok és módszerek" részben leírtaknak megfelelően. A kapott értékeket \pm SEM formában tüntettük fel és csillaggal jelöltük a kontrollhoz képest szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$). **B)** Kontroll és IGF-I kezelt (100 ng/ml) vázizomsejtekről a 8. tenyésztési napon fénymikroszkóppal készített felvételek láthatók. Amint az ábra mutatja, az IGF-I fokozta a vázizomsejtek fúzióját, növelve ezáltal a sokmagvú myotube-ok számát (nyíl). **C)** A sejteket a 3. tenyésztési naptól a 14. napig kezeltük az IGF-I különböző koncentrációival. Ezt követően a sejteket összegyűjtöttük, majd azonos proteintartalmú mintákat felhasználva Western blotot készítettünk, mely során a dezmin kimutatásához egérben termeltetett anti-dezmin monoklonális antitest alkalmaztunk. Ezt követően – az azonos proteintartalom ellenőrzéséhez – a membránokat egérben termeltetett anti-cytochrome C antitesttel (Cyt C) újrafestettük.

Primer humán vázizomsejteken az IGF-I hatását az nPKC δ közvetíti, ugyanakkor a MAPK és PI3-K útvonal nem vesz részt a celluláris hatás kifejlődésében

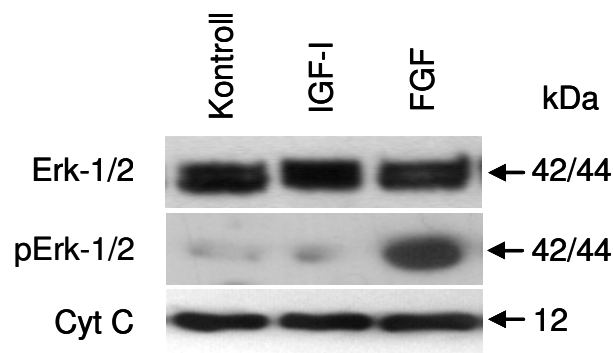
Számos (fentebb részletezett) irodalmi adat utal arra, hogy az IGF-I celluláris hatásának kifejlődésében (erősen sejttípusfüggő módon) számos jelátviteli útvonal, így a MAPK, PI3-K és/vagy a PKC rendszerek játszhatnak szerepet (Milasincic és mtsai, 1996; Palmer és mtsai, 1997; Alessi, 1997; Tsakiridis és mtsai, 2001; Haq és mtsai, 2003; Foulstone és mtsai, 2004; Tiffin és mtsai, 2004). Annak kiderítésére, hogy humán vázizomsejtek esetében mely jelátviteli útvonal(ak) közvetítheti(k) az IGF-I hatásait, a sejteket különböző inhibitorokkal kezeltük: a MAPK Erk-1/2 útvonalat gátló PD098059 és U0126 anyagokkal; PI3-K útvonal inhibitorával, a wortmanninnal; valamint a PKC rendszer általános gátlószerével, a GF109203X anyaggal (Toullec és mtsai, 1991; Milasincic és mtsai, 1996; Foulstone és mtsai, 2004).



4. ábra A PKC, a MAPK és PI3-K útvonal gátlásának hatása az IGF-I mitogén hatásaira primer humán vázizomsejt kultúrákon

A) A sejteket a 3. tenyésztési naptól naponta kezeltük 100 ng/ml IGF-I-gyel; különböző inhibitorokkal, így 20 μ M PD098059-cel (PD), 100 nM wortmanninnal (Wort) vagy 1 μ M GF109203X anyaggal (GF); illetve az inhibitorok és IGF-I kombinációjával, majd naponta meghatároztuk a sejtmagok számát. A kapott értékeket átlag \pm SEM formában tüntettük fel, a csillagok a szignifikáns különbségeket jelölik ($p < 0,05$). **B)** A sejteket naponta kezeltük a fenti kombinációkkal, majd a 14. tenyésztési napon learattuk őket és azonos protein tartalmú mintákkal Western blotot készítettünk dezmin ellenes antitest felhasználásával. A különböző mintákban a dezmin mennyiségét denzitométer segítségével határoztuk meg (optikai denzitás, OD). Az egyes csoportok optikai denzitását a kontroll csoport értékeit 1-nek megállapítva adtuk meg (OD 1). Az azonos mennyiségű minta felhasználását cytochrome C (Cyt C) festéssel igazoltuk.

A **4/A és B ábrán** látható, hogy a MAPK inhibitor PD098059 (20 μ M) és az U0126 (5 μ M, ezen utóbbi ábrán nem mutatva), valamint a PI3-K inhibitor wortmannin (100 nM) nem befolyásolja az IGF-I által kifejtett proliferációt és differenciálódást fokozó hatást. Ezzel ellentétben a PKC rendszer általános inhibitora, az 1 μ M GF109203X (mely önmagában nem volt hatással a sejtek növekedésére és a dezmin kifejeződésére) jelentősen csökkentette a sejtproliferációt és a differenciálódási marker expresszióját.



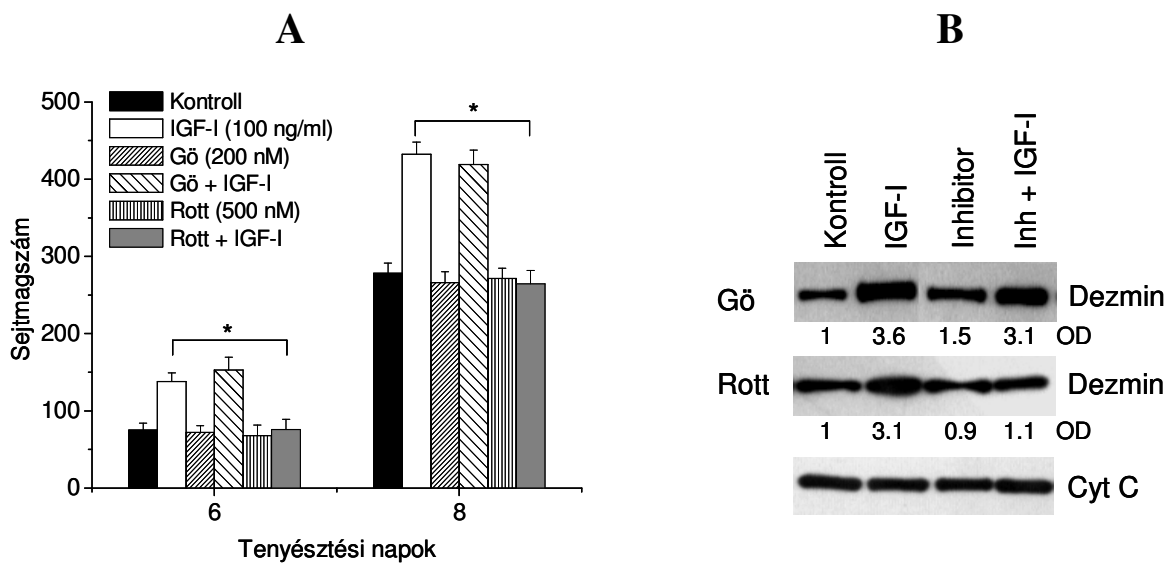
5. ábra Az IGF-I hatása a MAPK Erk-1/2 foszforilációs állapotára humán vázizomsejteken

A 14 napos sejt kultúrákat 30 percig kezeltük 100 ng/ml IGF-I-gyel vagy 10 ng/ml FGF-fel. A sejteket ezt követően learattuk, majd Western blotot készítettünk. Az immunfestéshez MAPK Erk-1/2-ellenes antitestet, illetve az Erk-1/2 foszforilált formáját (pErk-1/2) felismerő antitestet alkalmaztunk. Az azonos mennyiségű minta felhasználását cytochrome C (Cyt C) festéssel igazoltuk.

A MAPK útvonal esetleges részvételét (illetve annak hiányát) tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy az IGF-I nem változtatta meg a MAPK Erk-1/2 foszforiláltsági állapotát (mint a potenciális aktiváció jelét), ellentétben a pozitív kontrollként alkalmazott fibroblaszt növekedési faktor (FGF) (Li és mtsai, 1992; Milasincic és mtsai, 1996; Kontaridis és mtsai, 2002) hatásával (**5. ábra**).

Mindezen eredményeink azt sugallták, hogy humán primer vázizomsejtekben nem a MAPK Erk-1/2 és PI3-K útvonalak vesznek részt az IGF-I celluláris hatásának kifejlődésében, hanem a PKC rendszer tagjai. Laboratóriumunk korábbi kísérletei során kimutattuk (melyet jelen kísérleteink is megerősítettek, lásd **7. ábra**), hogy humán tenyésztett vázizomsejtekben 6 PKC izoenzim fordul elő (Boczán és mtsai, 2000 és 2001; Bíró és mtsai,

2004): a kalcium-függő „klasszikus” cPKC α és γ , a kalcium-független „novel” típusú nPKC δ , η és θ , valamint az „atípusos” aPKC ζ . Mivel fent bemutatott kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az általános PKC inhibitor GF109203X (amely a cPKC és nPKC izoenzimek általános gátlószere) megakadályozta az IGF-I mitogén hatásainak kifejlődését, ezért valószínűvé vált, hogy egy vagy több PKC izoenzim központi szerepet játszhat az IGF-I hatásainak közvetítésében.

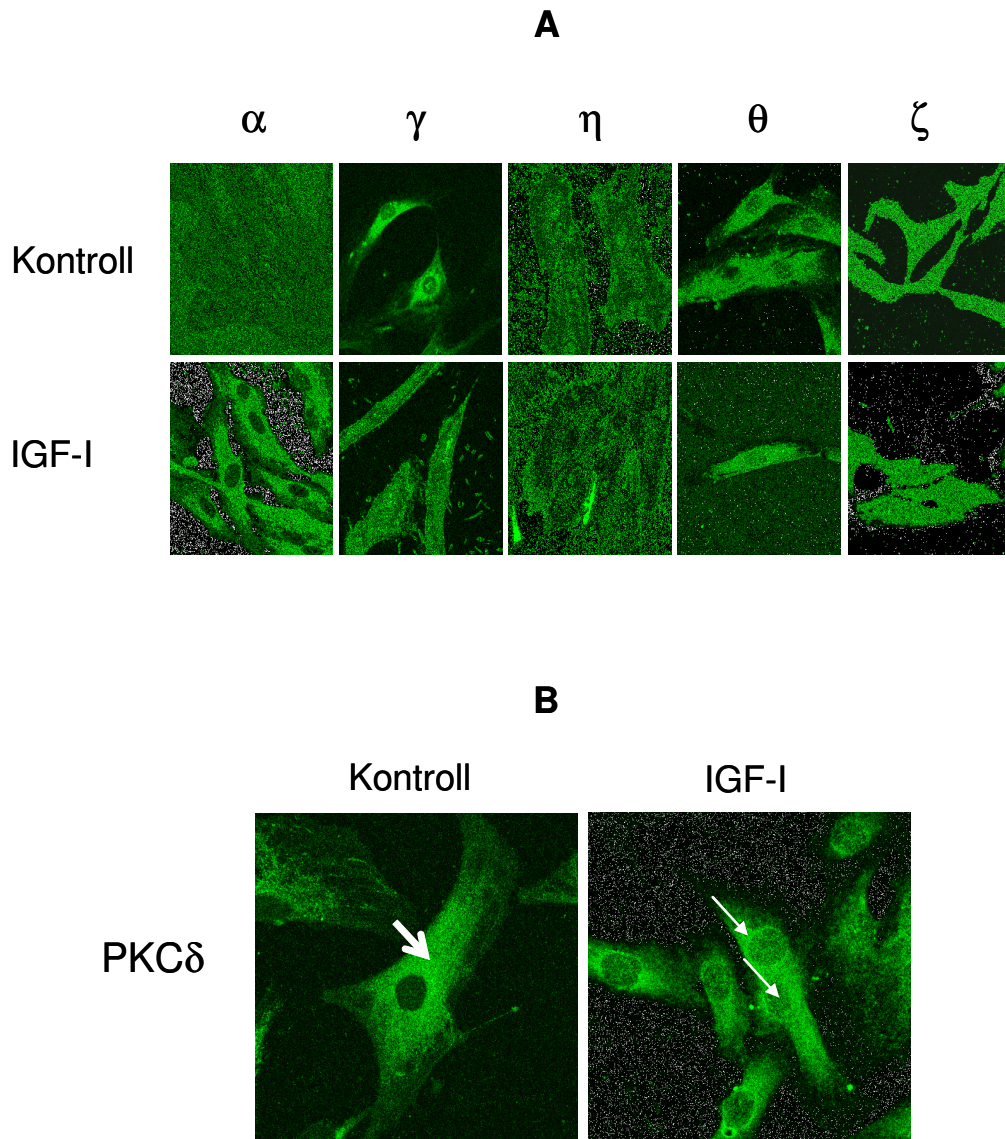


6. ábra Különböző PKC inhibitorok hatása humán vázizomsejtek proliferációjára és differenciálódására

A) A sejteket naponta kezeltük 100 ng/ml IGF-I-gyel; különböző inhibitorokkal, így 200 nM Gö6976-tal (Gö) vagy 500 nM Rottlerinnel (Rott); illetve az inhibitorok és IGF-I kombinációjával. Ezt követően a sejtmagok számát naponta megszámláltuk. A kapott értékeket átlag \pm SEM formában tüntettük fel, a csillagok a szignifikáns különbségeket jelölik ($p < 0,05$). **B)** A sejteket 14. tenyésztési napig kezeltük a különböző kombinációkkal, majd Western blotot készítettünk desmin ellenes antitest felhasználásával. A különböző mintákban a desmin mennyiségét denzitóméter segítségével határoztuk meg (optikai denzitás, OD). Az egyes csoportok optikai denzitását a kontroll csoport értékeit 1-nek megállapítva adtuk meg (OD 1). Az azonos mennyiségű minta felhasználását cytochrome C (Cyt C) festéssel igazoltuk.

Ezért vizsgálataink következő lépésében a cPKC izoenzimek (esetünkben cPKC α és γ) szelektív inhibitorát, a Gö6976-t alkalmaztuk (Martiny-Baron és mtsai, 1993). Ezen gátlószert használva nem találtunk szignifikáns változást a sejtek növekedésében és differenciálódásában (azaz az IGF-I 200 nM Gö6976 jelenlétében is fokozta a sejtproliferációt és differenciálódást, **6/A és B ábra**), mely arra utal, a cPKC α és γ izoenzimek feltehetően nem vesznek részt az IGF-I hatásának kifejlődésében. Kimutattuk ugyanakkor, hogy az

nPKC δ specifikus inhibitora, a Rottlerin (Gschwendt és mtsai, 1999) már igen alacsony (500 nM) koncentrációban (mely dózis önmagában nem módosította a sejtek növekedését és differenciálódását) teljes mértékben felfüggesztette az IGF-I hatását (6/A és B ábra), hasonlóan a GF109203X fent bemutatott hatásához. Ezen eredményeink azt sugallták, hogy az IGF-I hatásait primer humán vázizomsejteken az nPKC δ -n keresztül fejt(het) ki.



7. ábra Az IGF-I hatása a PKC izoenzimek szubcelluláris lokalizációjára primer humán vázizomsejteken

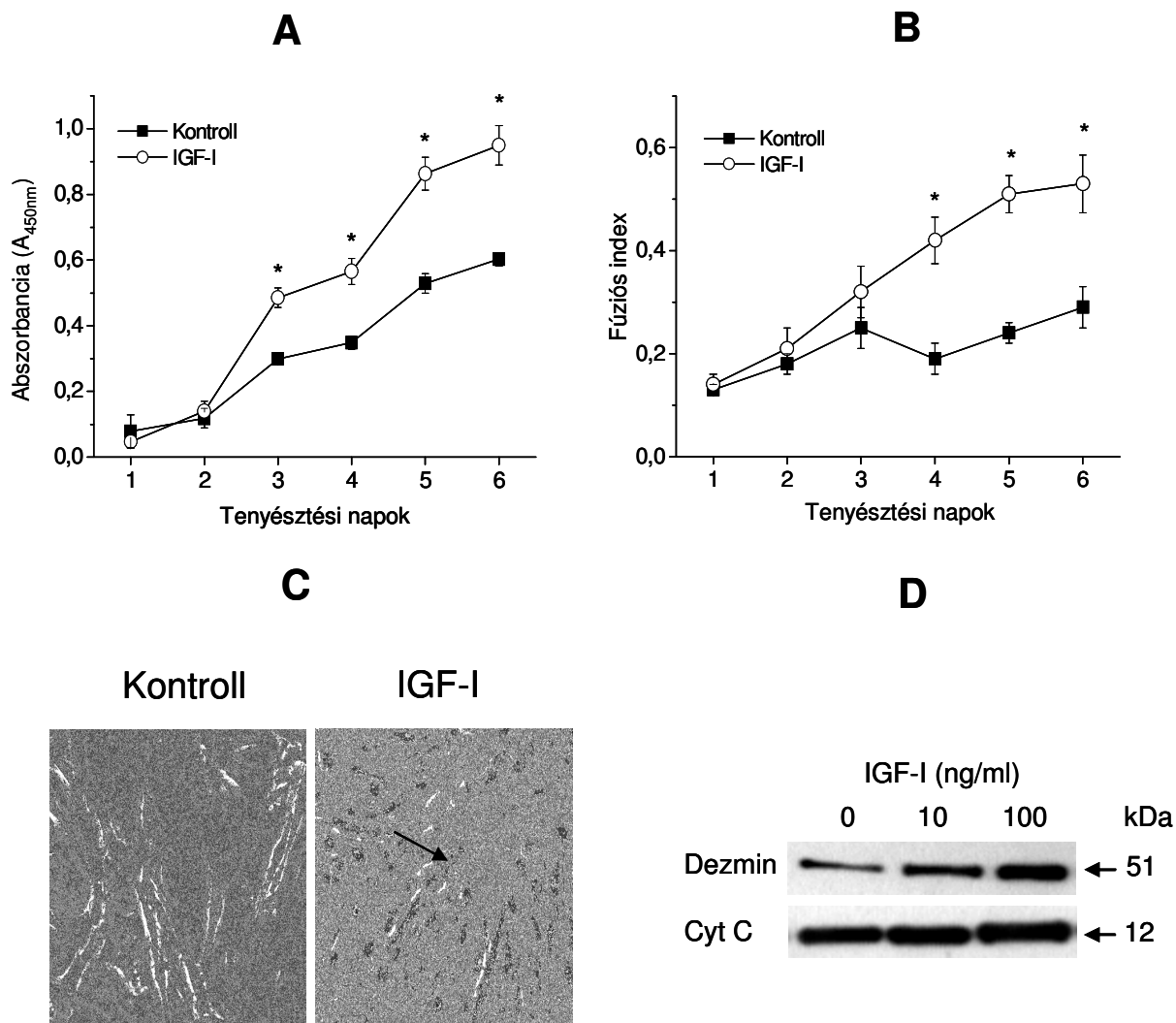
A sejteket a 7. tenyésztési napon 30 percig kezeltük 100 ng/ml IGF-I-gyel (IGF-I) vagy vivőanyag DMSO-val (Kontroll), majd a különböző PKC izoenzimek kimutatására nyúlban termeltetett PKC-ellenes elsődleges és FITC-konjugált kecskében termeltetett nyúl-ellenes másodlagos antitesteket felhasználva immuncitokémiai festést végeztünk. Ezt követően a sejtekről konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk a z-sík mentén („z-stack mode”). A képek a fedőlemeztől számított második rétegen készültek. Eredeti nagyítás: 630 x.

A) A PKC α , γ , η , θ és ζ szubcelluláris lokalizációja nem változott meg IGF-I kezelés hatására. **B)** Az nPKC δ transzlokációja. A kontroll sejtekben az nPKC δ a citoplazmában lokalizálódott (vastag nyíl), míg IGF-I kezelés hatására az izoforma magba és a magmembránba helyeződött át (vékony nyilak).

Az irodalomban általánosan elfogadott, hogy a PKC izoenzimek aktivációjuk során más intracelluláris (általában membrán) kompartmentbe transzlokálódnak (Nishizuka, 1988 és 1992; Jaken, 1996; Boczán és mtsai, 2001). Ennek ismeretében a következő lépésben megvizsgáltuk, hogy az IGF-I hatására mely PKC izoenzim(ek) szubcelluláris lokalizációja változik meg. A sejteket 30 percig kezeltük 100 ng/ml IGF-I-gyel, majd immunfestést követően konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk. A **7/A ábrán** jól látható, hogy IGF-I kezelés hatására az izoenzimek többségének sejten belüli lokalizációja nem változott: a cPKC α továbbra is a citoplazmában és a maghártyához közel; a cPKC γ a citoplazmában és intranukleárisan; az nPKC η a citoplazmában és a felszíni membrán körül; az nPKC θ a citoplazmában; míg az aPKC ζ a citoplazmában és a magban helyezkedett el. Ezzel ellentétben jelentős változás következett be az nPKC δ szubcelluláris lokalizációjában; IGF-I kezelés hatására az izoforma a citoplazmából a magmembránba és magba transzlokálódott (**7/B ábra**), mely eredmény szintén az nPKC δ központi szerepét valószínűsíti az IGF-I által kifejtett hatások közvetítésében.

C2C12 myoblastokon az nPKC δ mellett a MAPK útvonal is szerepet játszik az IGF-I celluláris hatásainak közvetítésében

A következő lépésekben a fenti kísérleteket egérezetű C2C12 myoblastokon is megismételtük, mely sejtvonal számos tulajdonságát tekintve (proliferáció, differenciálódás) a humán tenyésztett vázizomsejtek jó modelljeként alkalmazható (Ostrovsky és mtsai, 2002; Koleva és mtsai, 2005). A sejtvonal alkalmazásának ugyanakkor igen jelentős előnye, hogy lehetővé teszi további biokémiai és molekuláris biológiai technikák és vizsgálatok végrehajtását, melyek a nem passzálható és meglehetősen limitált sejtszámot biztosító primer humán kultúrák esetében nem voltak kivitelezhetőek.

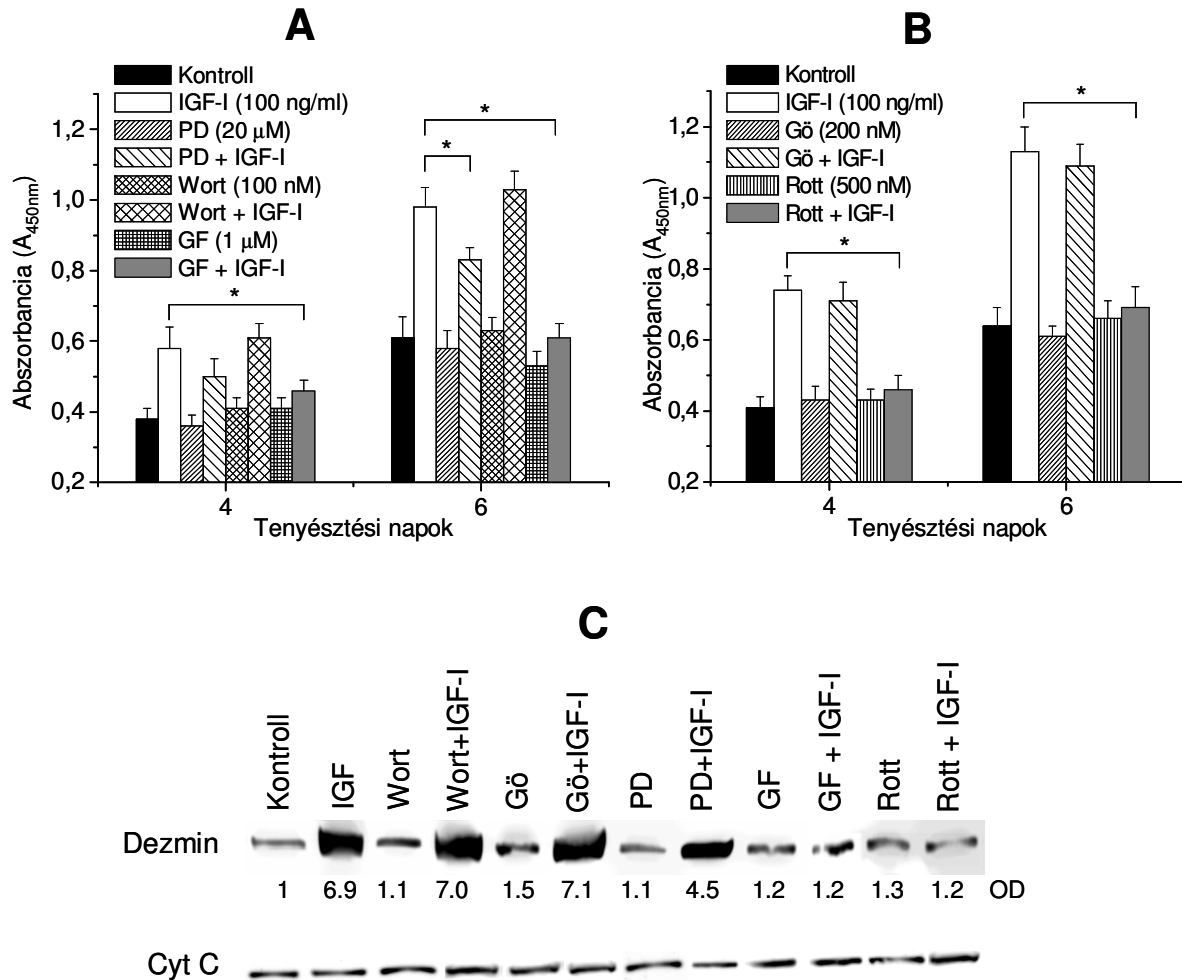


8. ábra Az IGF-I hatása a proliferációra, fúzióra, differenciálódásra valamint a dezmin kifejeződésére C2C12 myoblast kultúrákon

A C2C12 sejteket 96-lyukú vagy 12-lyukú tenyésztőedényekben növeltük, majd az első naptól kezdve 100 ng/ml IGF-I-gyel vagy DMSO-val (kontroll) kezeltük. A sejtproliferációt naponta BrdU assay-vel (**A**), míg a fúziót a sejtmagok naponkénti számolásával követtük nyomon (fúziós index) (**B**). Méréseinket négy párhuzamos pontban végeztük, a kapott értékeket átlag \pm SEM formában tüntettük fel és csillaggal jelöltük a szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$). **C**) Kontroll és IGF-I kezelt (100 ng/ml) vázizomsejtekről az 5. tenyésztési napon fénymikroszkóppal készített felvételek láthatók. Amint az ábra mutatja, az IGF-I fokozta a vázizomsejtek fúzióját, növelve ezáltal a sokmagvú myotube-ok számát (nyíl). **D**) A sejteket a 1. tenyésztési naptól a 5. napig kezeltük az IGF-I különböző koncentrációival. Ezt követően a sejteket összegyűjtöttük, majd azonos proteintartalmú mintákat felhasználva Western blotot készítettünk, mely során a dezmin kimutatásához egérben termeltetett anti-dezmin monoklonális antitestet alkalmaztunk. Ezt követően – az azonos proteintartalom ellenőrzéséhez – a membránokat egérben termeltetett anti-cytochrome C antitesttel (Cyt C) újrafestettük.

BrdU proliferációs assay segítségével kimutattuk, hogy az IGF-I – hasonlóan a humán vázizomsejtekhez – C2C12 sejteken is fokozta a sejtek növekedését (**8/A ábra**), valamint a szubkonfluens kultúrákban nagyon ritkán látható fúziós aktivitást (azaz sokmagvú myotube-ok kialakulását) (**8/B és C ábra**). Ezzel párhuzamosan az IGF-I jelentősen megnövelte az

izomspecifikus differenciálódási marker dezmin expresszióját is (8/D ábra), mely kontroll (nem kezelt) sejtekben csak a konfluencia elérése után kezdett emelkedni (ábrán nem mutatva).



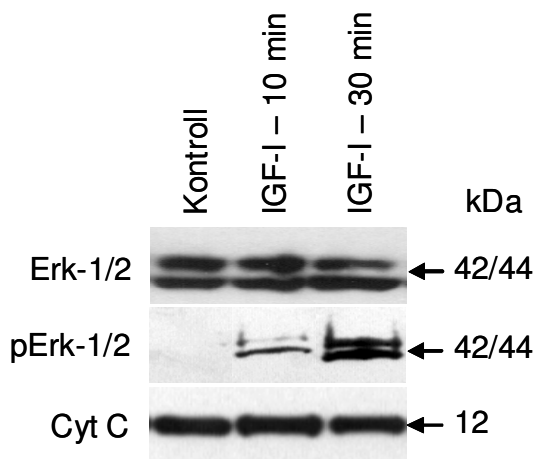
9. ábra Különböző PKC, MAPK és PI3-K inhibitorok hatása az IGF-I hatására C2C12 vázizomsejteken

A-B) C2C12 sejteket naponta kezeltük 100 ng/ml IGF-I-gyel; különböző gátlószerekkel, így **A**: 20 μM PD098059-cel (PD), 100 nM wortmanninnal (Wort) vagy 1 μM GF109203X anyaggal, valamint **B**: 200 nM Gö6976-tal (Gö) vagy 500 nM Rottlerinnel (Rott); illetve az inhibitorok és IGF-I kombinációjával. Ezt követően a sejtproliferációt BrdU assay segítségével határoztuk meg. Méréseinket négy párhuzamos pontban végeztük, a kapott értékeket átlag ± SEM formában tüntettük fel és csillaggal jelöltük a szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$). **C)** A sejteket 14. tenyésztési napig kezeltük a különböző kombinációkkal, majd Western blotot készítettünk dezmin ellenes antitest felhasználásával. A különböző mintákban a dezmin mennyiségét denzitóméter segítségével határoztuk meg (optikai denzitás, OD). Az egyes csoportok optikai denzitását a kontroll csoport értékeit 1-nek megállapítva adtuk meg (OD 1). Az azonos mennyiségű minta felhasználását cytochrome C (Cyt C) festéssel igazoltuk.

Ezt követően különböző inhibitorok hatását vizsgáltuk C2C12 myoblastokon.

Megállapítottuk, hogy – hasonlóan a humán izomsejteken mértékhez – az IGF-I proliferációt és differenciálódást fokozó hatását 1 μM GF109203X (a PKC rendszer általános inhibitora)

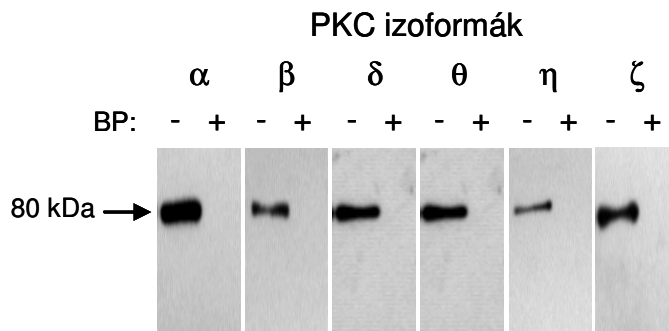
teljes mértékben felfüggesztette, míg 100 nM wortmannin (a PI3-K útvonal gátlószere) nem volt hatással a fenti folyamatokra (**9/A és C ábra**). A primer humán vázizomsejteken tapasztaltakkal ellentétben ugyanakkor bebizonyosodott, hogy a MAPK Erk-1/2 inhibitor PD098059 (20 μ M) (mely önmagában nem befolyásolta a sejtek bazális, IGF-I független növekedését) szignifikáns módon, de nem teljes mértékben (30-40%), kivédte az IGF-I hatását (**9/A és C ábra**). Ezen utóbbi eredményünkkel jó összhangban megállapítottuk továbbá, hogy – ugyancsak ellentétben a primer humán vázizomsejteken tapasztaltakkal – az IGF-I fokozta a MAPK Erk-1/2 aktivációját jelző foszforilációt (**10. ábra**). Ezen eredményeink azt sugallták, hogy C2C12 sejteken az IGF-I hatásának kifejlődésében a PKC rendszer mellett a MAPK jelátviteli útvonalnak is szerepe lehet.



10. ábra Az IGF-I hatása a MAPK Erk-1/2 foszforilációjára
A C2C12 sejteket 10 vagy 30 percig kezeltük 100 ng/ml IGF-I-gyel, majd Western blot segítségével meghatároztuk a MAPK Erk-1/2, illetve foszforilált/aktivált formájának (pErk-1/2) expresszióját. Az azonos mennyiségű minta felhasználását cytochrome C (Cyt C) festéssel igazoltuk.

A két rendszer pontos szerepének tisztázásához ezt követően azt elemeztük, hogy az IGF-I által kifejtett hatások közvetítésében mely PKC izoenzim(ek) játszhat(nak) szerepet. Mivel a C2C12 sejtek PKC izoenzimmészletének leírása az irodalomban nem volt egyértelmű és teljeskörű, ezért első lépésként megvizsgáltuk, hogy milyen izoenzimek vannak jelen ezen sejtekben. Western blot technikával (illetve RT-PCR és immuncitokémiai módszerekkel, ezen utóbbiak ábrán nem mutatva) kimutattuk, hogy a C2C12 myoblastokban 6 PKC izoforma expresszálódik: a cPKC α és β , az nPKC δ , η és θ , valamint az aPKC ζ (**11. ábra**).

Bebizonyosodott ugyanakkor az is, hogy a sejtekben nem fejeződik ki a cPKC γ , az nPKC ϵ , az aPKC ι/λ valamint a PKC μ (ábrán nem mutatva).

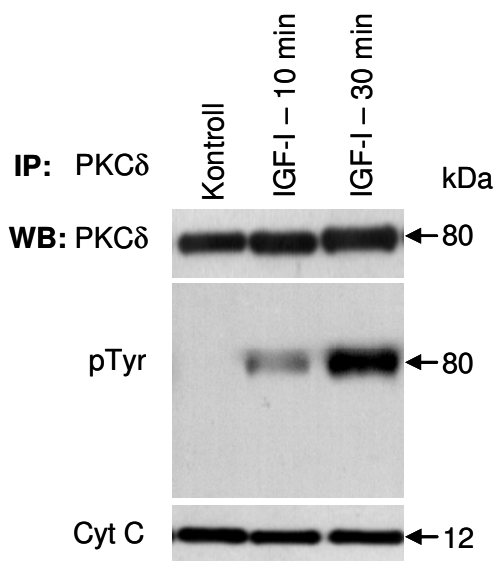


11. ábra A C2C12 sejtek PKC mintázata

A C2C12 sejteket 6 napig tenyésztettük, majd specifikus PKC-ellenes antitestek felhasználásával – blokkoló peptid (BP) jelenlétében (+) vagy annak használata nélkül (-) – Western blotot készítettünk.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy hogyan változnak meg az IGF-I celluláris hatásai különböző PKC inhibitorok jelenlétében. Amint a **9/B** és **C ábrán** látható, az nPKC δ szelektív gátlószere, 500 nM Rottlerin – a humán vázizomsejtekhez hasonlóan – teljes mértékben felfüggesztette az IGF-I mitogén hatását (anélkül, hogy önmagában gátolta volna a sejtek növekedését), míg 200 nM Gö6976, a cPKC izoenzimek (jelen esetben a cPKC α és β) inhibitora nem befolyásolta a növekedési faktor hatását.

Ezek az adatok azt a feltételezésünket erősítették meg, hogy az nPKC δ központi szerepet játszhat az IGF-I által kiváltott sejtfolyamatok szabályozásában C2C12 myoblastokon is, mely hipotézisünket további, többlépcsős biokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel is meg kívántuk erősíteni. Először azt vizsgáltuk meg, hogy az IGF-I milyen hatással van az nPKC δ tirozin-foszforilációjára, mely jelenség az aktiváció általánosan elfogadott jele (Ács és mtsai, 1997b; Blass és mtsai, 2002). A vizsgálat során a sejteket IGF-I-gyel kezeltük, majd az nPKC δ immunprecipitációját követően foszfortirozin-specifikus antitestet felhasználva immunfestést végeztünk. A **12. ábrán** látható, hogy a növekedési faktor jelentős mértékben megnövelte az nPKC δ tirozin-foszforilációjának mértékét (ezen hatás nem volt megfigyelhető a többi PKC izoforma esetén, ábrán nem mutatva).

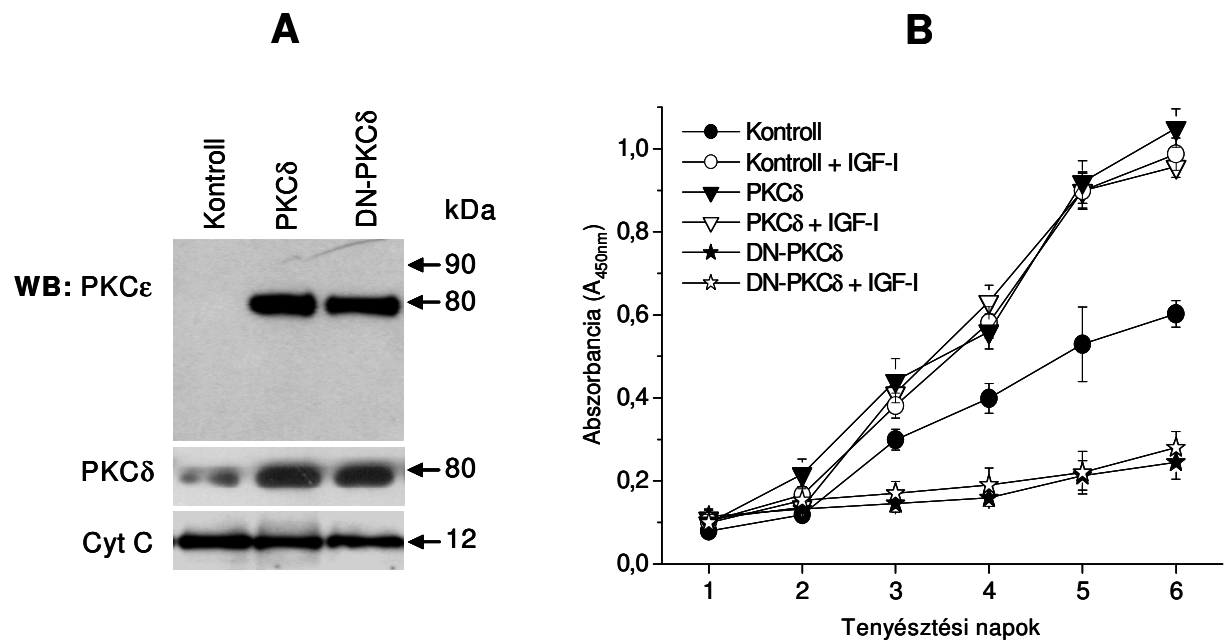


12. ábra Az IGF-I hatása az nPKC δ tirozin foszforilációjára C2C12 myoblast kultúrákon

A C2C12 sejteket 10 vagy 30 percig kezeltük 100 ng/ml IGF-I-gyel, majd a minták PKC δ ellenes antitesttel történő immunprecipitációját követően (IP) Western blot (WB) elkészítése után foszfortirozin ellenes (pTyr) antitesttel immunfestést végeztünk az "Anyagok és módszerek"-ben leírtaknak megfelelően. A minták azonos proteintartalmát cytochrome C (Cyt C) festéssel ellenőriztük.

Ezt követően – kihasználva a C2C12 sejtvonalon azon tulajdonságát, hogy a sejtek folyamatosan fenntarthatók és passzálhatók – olyan C2C12 kultúrákat hoztunk létre, melyek stabilan overexpresszálják a konstitutíven aktív rekombináns nPKC δ izoenzimet, illetve annak kináz (domináns) negatív mutáns (DN-PKC δ) formáját (a kontroll sejteket az üres pEMTH vektorral transzfektáltuk). A létrehozott „pool” sejt kultúrákban és több szelektált klónban (ábrán nem mutatva) Western blottal ellenőriztük a rekombináns enzimek kifejeződését. Ennek során először olyan specifikus nPKC ϵ -ellenes antitestet használtunk, mely egyrészt felismeri a sejtek által kifejezett rekombináns nPKC δ és DN-PKC δ izofomák ϵ -tag szekvenciáját, másrészt a sejtekben (elméletileg) megtalálható endogén nPKC ϵ -t (mint azt fentebb bemutattuk, a C2C12 sejtekben nem található meg az endogén nPKC ϵ). A **13/A ábrán** jól látható, hogy a transzfektált sejtekben egyedi, az nPKC ϵ -ra specifikus jelet tapasztaltunk a 80 kDa-os sávban (rekombináns izoformák), míg a 90 kDa-os sávban nem volt detektálható az endogén nPKC ϵ -ra jellemző immunjel. Az nPKC δ ellen termeltetett antitest felhasználásával kimutattuk továbbá, hogy a rekombináns izoformák kifejeződése 3-7-szer magasabb volt, mint a kontroll (üres vektorral transzfektált) sejtek endogén nPKC δ szintje (**13/A ábra**).

A stabil overexpresszor sejtek létrehozása és ellenőrzése után BrdU assay alkalmazásával összehasonlítottuk a kontroll és overexpresszor C2C12 sejtek növekedését. Amint a **13/B ábrán** látható, az nPKC δ -t kifejező sejtek proliferációs rátája lényegesen fokozódott a kontroll C2C12 sejtek növekedéséhez képest. Kimutattuk azt is, hogy az nPKC δ overexpresszor sejtek proliferációja teljes mértékben megegyezett az IGF-I-gyel kezelt kontroll C2C12 sejtek növekedésével. Bebizonyosodott továbbá, hogy IGF-I alkalmazásával az nPKC δ overexpresszorok jelentős mértékben megnövekedett sejtproliferációja tovább már nem volt fokozható, azaz a konstitutíven aktív nPKC δ kifejeződése mintegy „utánozta” az IGF-I mitogén hatását.



13. ábra A konstitutíven aktív és kináz-negatív mutáns nPKC δ overexpressziójának hatása C2C12 sejtek kontroll és IGF-I indukált növekedésére

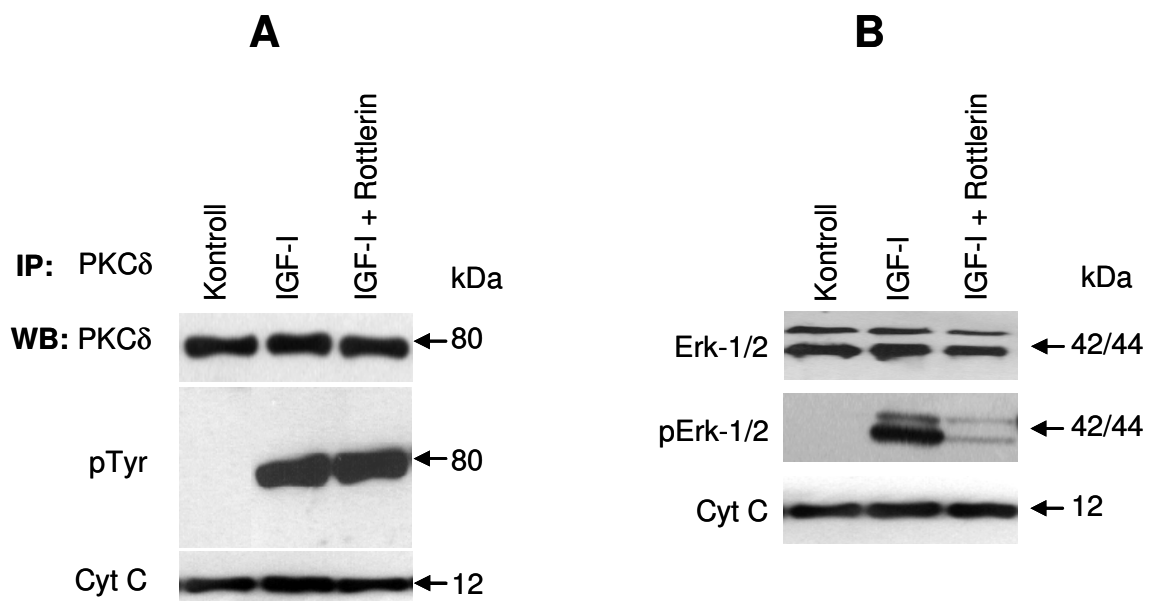
A) Az overexpresszió hatékonyságának ellenőrzése. Az aktív nPKC δ -t, a kináz-negatív mutánst (DN-nPKC δ), illetve az üres vektort (kontroll) kifejező C2C12 sejteket a 6. tenyésztési napon learattuk, majd Western blotot készítettünk egyrészt a rekombináns izoformák ϵ -tag-jét jelölő nPKC ϵ -ellenes, illetve nPKC δ -ellenes antitestek felhasználásával. A minták proteintartalmát cytochrome C (Cyt C) festéssel ellenőriztük. **B)** Az overexpresszor sejteket 1000 sejt/lyuk denzitásban 96-lyukú tenyésztőedénybe szélesztettük, majd naponta vívőanyaggal, illetve 100 ng/ml IGF-I-gyel kezeltük. A sejtproliferációt naponta BrdU assay-vel ellenőriztük. A pontok négy párhuzamos mérés átlag \pm SEM értékét tüntetik fel.

A DN-nPKC δ overexpressziója is jelentős változást okozott a sejtek növekedési ütemében, ugyanis a mutáns izoforma jelenléte drámaian lecsökkentette a sejtek

proliferációját a kontroll myoblastok növekedéséhez képest (**13/B ábra**). Mivel ezen sejtek növekedése IGF-I jelenlétében sem fokozódott, eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy az IGF-I celluláris hatásainak kifejlődéséhez C2C12 izomsejtekben (is) szükséges az nPKC δ aktív jelenléte.

C2C12 myoblastokon az IGF-I celluláris hatásának megjelenésében az nPKC δ a MAPK útvonal „upstream” regulátoraként viselkedik

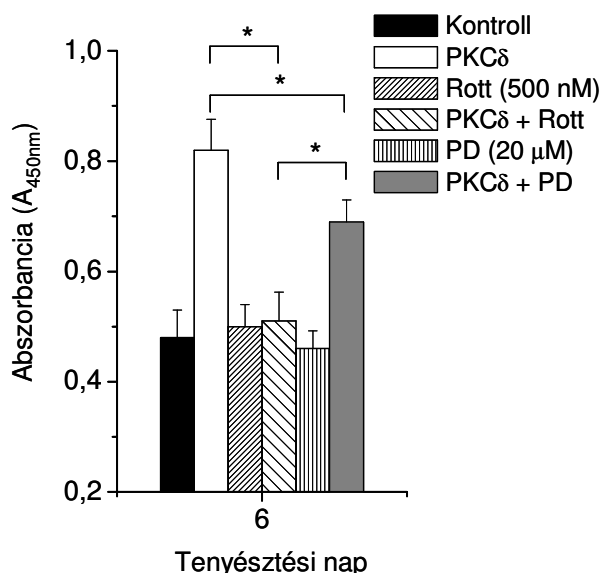
Azon fent bemutatott eredményeink, hogy C2C12 sejteken (1) az nPKC δ az IGF-I-kapcsolt jelátvitel központi molekulája; (2) a Rottlerin (az nPKC δ specifikus gátlószere) teljes mértékben felfüggesztette, ugyanakkor a PD098059 (a MAPK útvonal gátlószere) csak részben gátolta meg az IGF-I proliferációt fokozó hatását; azt sugallták, hogy az nPKC δ és a MAPK által befolyásolt jelátviteli útvonalak között esetleges kapcsolat található.



14. ábra A Rottlerin hatása az nPKC δ és a MAPK ERK-1/2 foszforilációjára

A) A C2C12 sejteket 30 percig kezeltük vívőanyaggal (kontroll), 100 ng/ml IGF-I-gyel, illetve IGF-I és 500 nM Rottlerin kombinációjával. A sejtek összegyűjtését követően nPKC δ -ellenes antitestet használva immunprecipitációt végeztünk (IP), majd az ezt követő Western blot során foszfortirozin (pTyr) ellenes (az nPKC δ tirozin-foszforilációjának vizsgálatához), illetve nPKC δ -ellenes antitesttel (az immunprecipitáció hatékonyságának ellenőrzéséhez) immunfestést végeztünk. **B)** A hasonlóan kezelt C2C12 sejtek összegyűjtését követően Western blotot készítettünk, melynek során meghatároztuk a MAPK Erk-1/2, illetve foszforilált formájának (pErk-1/2) expresszióját. A minták proteintartalmát mindkét esetben cytochrome C (Cyt C) festéssel ellenőriztük.

Ezt a hipotézist kívántuk alátámasztani azzal a kísérlettel, mely során Rottlerin jelenlétében vizsgáltuk az IGF-I hatását az nPKC δ tirozin-foszforilációjára és a MAPK Erk-1/2 foszforilációjára. Ahogyan várható volt, 500 nM Rottlerin jelenléte nem módosította az IGF-I azon hatását, melynek során a növekedési faktor fokozta az nPKC δ tirozin-foszforilációját (**14/A ábra**). Nagy jelentősége volt ugyanakkor azon megfigyelésünknek, miszerint a specifikus nPKC δ inhibitor jelentős mértékben csökkentette az IGF-I Erk-1/2 foszforilációt növelő hatását (**14/B ábra**). Mindezen adatok arra utaltak, hogy az IGF-I által stimulált MAPK Erk-1/2 aktiváció (és foszforiláció) nPKC δ -függő folyamat.



15. ábra A különböző inhibitorok hatása az nPKC δ overexpresszor C2C12 myoblastok proliferációjára

A nPKC δ vagy üres vektort (kontroll) stabilan overexpresszáló sejteket 1000 sejt/lyuk denzitásban 96-lyukú tenyésztőedényekbe szélesztettük, majd naponta kezeltük vívívőanyaggal, 500 nM Rottlerinrel (Rott), illetve 20 μ M PD098059-cel (PD). A sejtproliferációt BrdU assay segítségével naponta nyomon követtük (az ábrán csak a 6. napot tüntettük fel). A pontok négy párhuzamos mérés átlag \pm SEM értékét tüntetik fel és csillagokkal jelöltük a szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$).

Végezetül további két inhibitor hatását vizsgáltuk a konstitutíven aktív nPKC δ -t kifejező C2C12 myoblastok proliferációjára. Amint a **15. ábrán** látható, az nPKC δ overexpresszor sejtek jelentősen fokozódott proliferációja részlegesen (mintegy 35-40%-kal), de statisztikailag szignifikáns mértékben, gátolható volt 20 μ M PD098059 alkalmazásával. Az PD098059 ezen hatása nagyon hasonlított azon fent bemutatott eredményre (**9/A ábra**), melynek során kontroll C2C12 myoblastokon a gátlószer ilyen mértékben (azaz részlegesen) függesztette fel az IGF-I proliferációt és differenciálódást növelő hatását. Ezen túlmenően,

ahogy várható volt, 500 nM Rottlerin jelentős mértékben lecsökkentette az nPKC δ overexpresszor sejtek (fokozott) növekedését; azaz ezen sejtek proliferációjának mértéke a kontroll C2C12 sejtek szintjére tért vissza. Ezen adataink megerősítették azon feltevésünket, hogy C2C12 myoblastokon az nPKC δ és a MAPK Erk-1/2 szignalizációs útvonalak kapcsolatban vannak. Eredményeink emellett rámutatnak azon új felfedezésre is, miszerint C2C12 myoblastokon az IGF-I hatásának kifejlődésében az nPKC δ a MAPK útvonal „upstream” regulátoraként viselkedik (azaz megelőző aktivációja szükséges a MAPK rendszer aktivációjához).

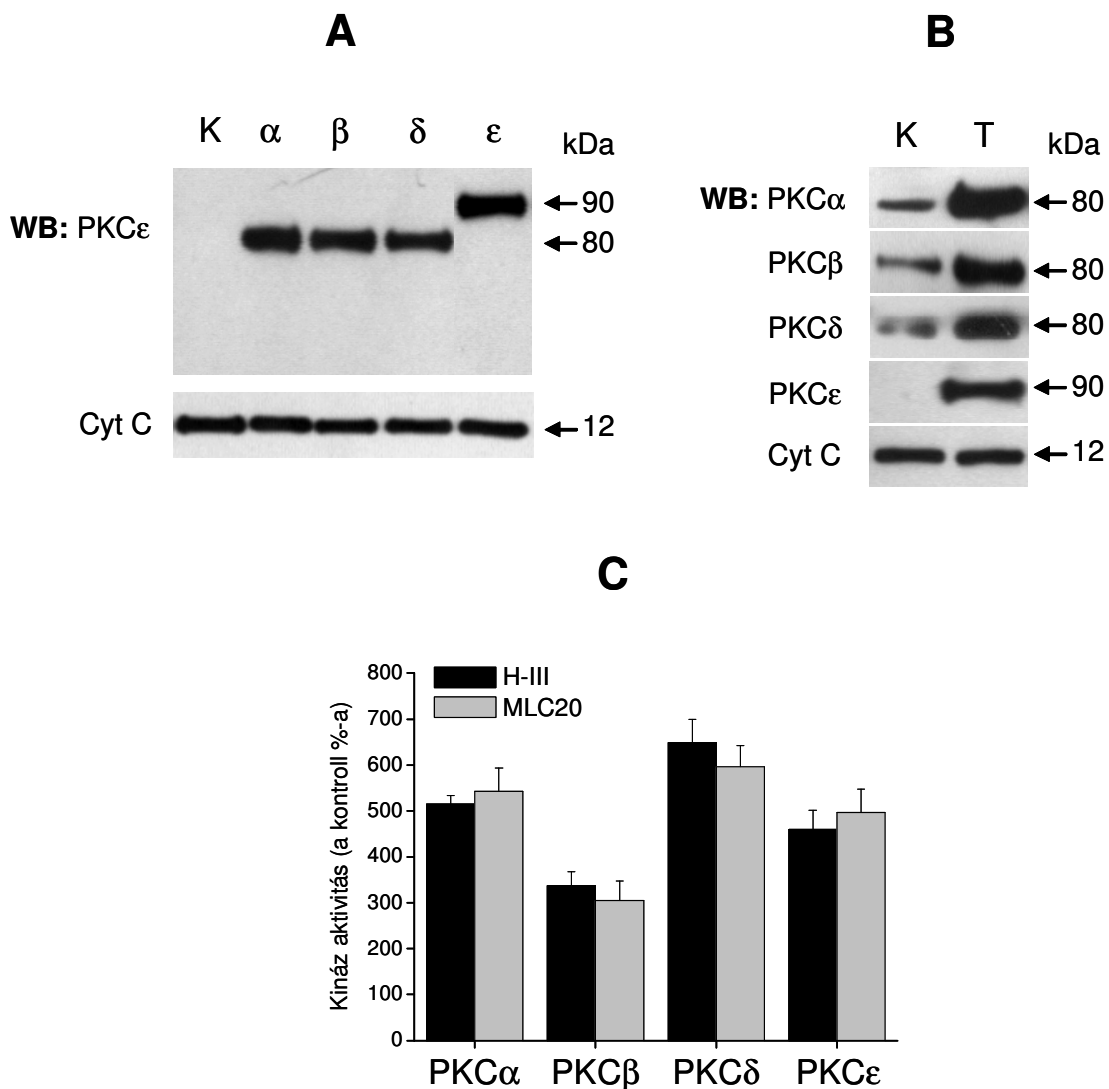
Számos cPKC és nPKC izoforma stabil overexpressziója C2C12 myoblastokban

Az nPKC δ , valamint az enzim kináz-negatív mutánsának overexpressziója során kapott eredményeink rámutattak arra, hogy a PKC család enzimeinek endogén aktivitása szerepet játszhat a C2C12 izomsejtek proliferációs és differenciálódási folyamatainak szabályozásában. Ezért következő kísérletsorozatunkban számos egyéb PKC izoenzim (cPKC α és β , valamint nPKC ϵ) rekombináns stabil overexpresszióját is végrehajtottuk, majd vizsgáltuk az overexpresszor sejtek *in vitro* és *in vivo* növekedésében megfigyelhető esetleges módosulásokat.

A stabil transzfekció elkészítése után első feladatunk (ez esetben is) a rekombináns overexpresszió hatékonyságának ellenőrzése volt (az nPKC δ esetében fent bemutatottakkal megegyező módon, lásd **13/A ábra**). Specifikus nPKC ϵ -ellenes antitestet felhasználva Western blot segítségével kimutattuk, hogy sikerrel fejeztettük ki a cPKC α és β , valamint nPKC ϵ és δ izoformákat a sejtekben (**16/A ábra**; egyedi kb. 80 kDa sáv a cPKC α és β , valamint az nPKC δ esetében; egyedi kb. 90 kDa immunjel az nPKC ϵ esetében). A különböző rekombináns, overexpresszált PKC izoenzimeket kimutató, izoforma-specifikus antitestek

használatával emellett azt tapasztaltuk, hogy az overexpresszált PKC izoenzimek szintje többszöröse volt, mint a megfelelő endogén PKC izoformák kifejeződése (**16/B ábra**).

Végezetül, hogy meggyőződhessünk arról, hogy az overexpresszált izoformák funkcionálisan is aktívak, megmértük a sejtizátumok kináz (PKC) aktivitását is. Amint az a **16/C ábrán** látható, a rekombináns PKC izoformákat expresszáló sejtek magasabb PKC aktivitási értékeket mutattak a kontroll (üres vektorral transzfektált) C2C12 sejtekhez képest mindkét kináz-szubsztrát esetében.



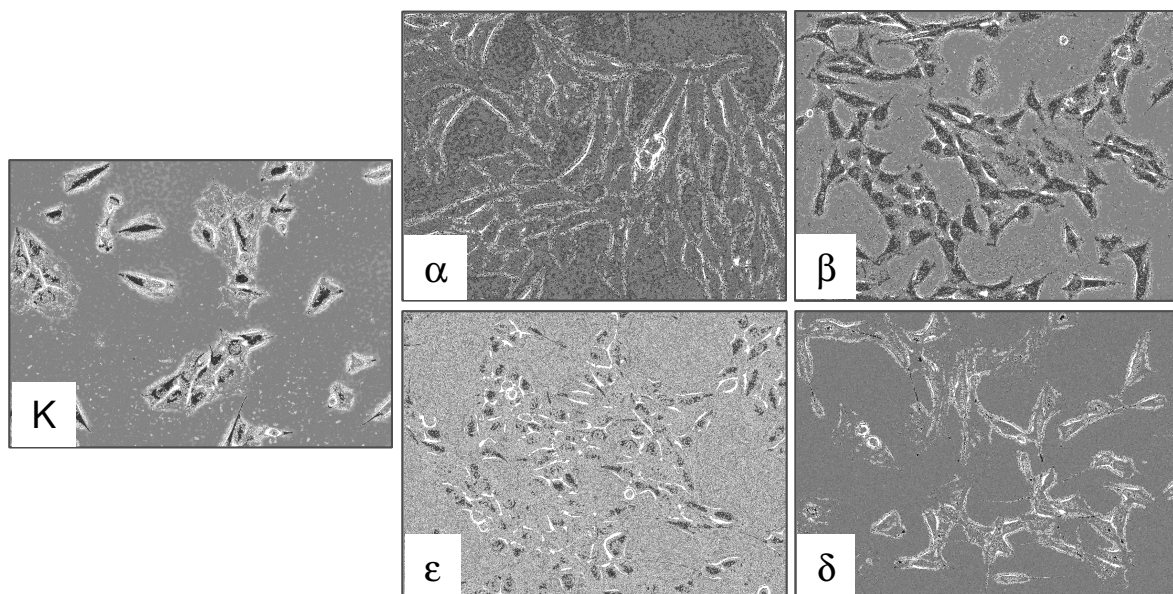
16. ábra A PKC overexpresszió hatékonyságának ellenőrzése C2C12 myoblastokon

A) A különböző PKC izoformákkal vagy üres vektorral (kontroll, K) stabilan transzfektált C2C12 sejteket összegyűjtöttük, majd azonos proteintartalmú mintákat felhasználva Western blotot (WB) készítettünk a rekombináns fehérjékben megtalálható ε-tag felismerő PKCε-ellenes antitesttel. **B)** Az overexpresszió mértékének meghatározásához a kontroll (K) és transzfektált (T) sejteken szintén Western blotot hajtottunk végre, de ez esetben a transzfektált izoformára specifikus anti-PKC antitestek felhasználásával. A minták proteintartalmát mindkét esetben cytochrome C (Cyt C) festéssel ellenőriztük. **C)** A transzfektált és a kontroll (üres vektort tartalmazó, K) sejtek kináz aktivitásának meghatározásakor a ³²P beépülését mértük hiszton III (H-

III) és miozin könnyű-lánc 20 (MLC20) szubsztátok felhasználásával. A pontok három párhuzamosan vizsgált minta átlag \pm SEM értékeit reprezentálják, a kontrollt 100%-nak véve alapul.

A különböző PKC izoformák overexpressziója eltérően módosítja C2C12 sejtek morfológiáját

A PKC izoformák overexpressziója eltérően befolyásolta a C2C12 myoblastok morfológiáját (**17. ábra**). Amint a felvételeken jól látható, a kontroll (üres vektorral transzfektált) C2C12 sejtek jellegzetes, fibroblasztszerű („háromszög-alak”) morfológiáját jelentéktelen mértékben változtatta meg az nPKC ϵ transzfekciója. Ezzel ellentétben a cPKC α overexpresszor sejtek (és kisebb mértékben a cPKC β sejteknél is) megnyúlt sejttesttel voltak jellemezhetőek. A sejtalak megváltozásán kívül, különösen a cPKC α -t kifejező sejtek esetében, a myoblastok intenzív fúzióját is megfigyeltük a szubkonfluens tenyészetekben (ez a jelenség kontroll sejtek esetén csak nagyon ritkán volt látható). Az nPKC δ overexpressziója ettől eltérő fenotípus megjelenését eredményezte, hiszen ezen sejtek hosszú, pseudopódium-szerű nyúlványokat és vékony, orsószerű sejttestet mutattak.

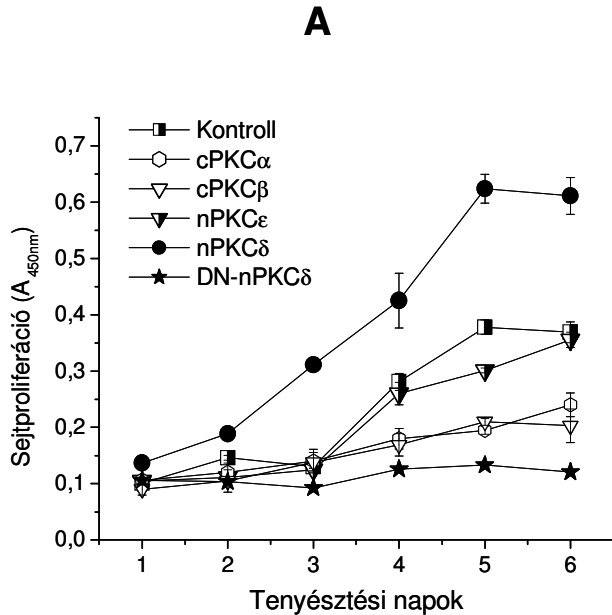


17. ábra A PKC izoformák overexpressziójának hatása C2C12 sejtek morfológiájára

A különböző PKC izoenzimeket vagy üres vektort (kontroll, K) stabilan overexpresszáló sejtekről fázis kontraszt fénymikroszkóppal felvételeket készítettünk (200x-os nagyítás).

A különböző PKC izoformák overexpressziója eltérő mértékben befolyásolja a sejtek proliferációját és a differenciálódási marker dezmin expresszióját C2C12 myoblastokon

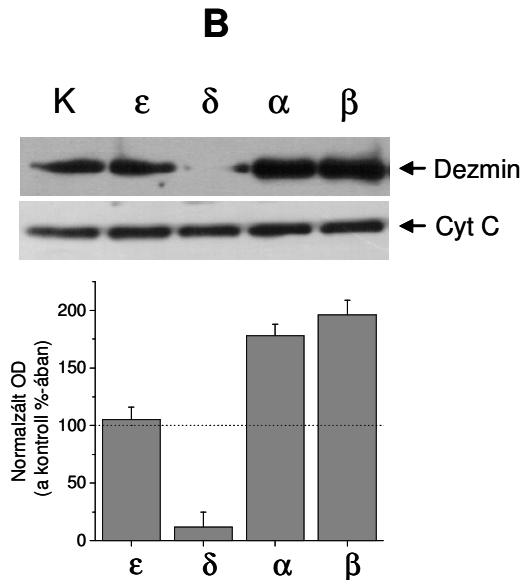
Ezt követően a különböző PKC izoenzimeket overexpresszáló C2C12 myoblastok *in vitro* proliferációját és differenciálódását vizsgáltuk.



18. ábra A PKC overexpresszió hatása a proliferációra és a differenciálódásra C2C12 myoblastokon

A) A kontroll és PKC overexpresszor C2C12 sejteket 1000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük, majd naponta BrdU assayt készítettünk az "Anyagok és módszerek" részben leírtak szerint. A pontok négy párhuzamosan vizsgált minta átlag \pm SEM értékeit reprezentálják minden PKC izoenzim esetén.

B) Az egyes izoenzimekkel stabilan transzfektált és üres vektort tartalmazó (K) C2C12 sejteken Western blotot készítettünk. A kísérlethez egérben termeltetett elsődleges dezmin-ellenes antitesteket használtunk. Az ábra felső része 3 hasonló eredményt szolgáltatató kísérlet egyikét mutatja. Az egyes PKC izoenzimekkel overexpresszált sejtek dezmin expresszióját kvantitatív denzitometriával (optikai denzitás, OD) határoztuk meg (alsó rész). Ennek során a dezmin immunjelét denzitometráltuk, majd ezen értéket a kontroll (üres vektorral transzfektált) sejtekből származó minta jelintenzitására (mint 100 %-ra, pöttyözött vonal) normalizáltuk. Az ábrán 3 független kísérlet eredményei láthatók átlag \pm SEM formában.



BrdU proliferációs assay (**18/A ábra**) segítségével kimutattuk, hogy a különféle PKC izoenzimek overexpressziója eltérő módon változtatta meg a sejtek növekedését. A cPKC α és β izoenzimek overexpressziója jelentősen lecsökkentette a C2C12 myoblastok proliferációját,

míg az nPKC ϵ jelenléte nem okozott szignifikáns változást a sejtek növekedésében. Ezzel ellentétben az nPKC δ overexpressziója (mint azt korábban a **13/B ábrán** is bemutattuk) drámaian fokozta a sejtek proliferációját a kontroll (üres vektorral transzfektált) sejtekhez viszonyítva.

A különböző overexpresszor sejtek proliferációját az átlagos kettőződési idők és a kultúrák szaturációs denzitásának nyomonkövetésével is vizsgáltuk (**1. táblázat**). Jó összhangban a BrdU assay-vel végzett kísérleteink eredményével, a cPKC α és β overexpresszor sejtek kettőződési ideje megnyúlt, míg a szaturációs denzitásuk csökkent. Ezzel ellentétben az nPKC δ overexpresszor sejtek esetében a szaturációs denzitás jelentősen megnőtt és a kettőződési idő erőteljesen megrövidült (az nPKC ϵ izoformát tartalmazó sejtek növekedése, ez esetben is, a kontroll C2C12 sejtekhez hasonló jellegzetességeket mutatott).

1. táblázat Az egyes PKC izoformákat overexpresszáló C2C12 sejtek *in vitro* és *in vivo* növekedésének vizsgálata

Izoforma	A növekedés <i>in vitro</i> vizsgálata		A tumorgenézis <i>in vivo</i> vizsgálata		
	Kettőződési idő (óra)	Szaturációs denzitás (10^5 sejt/cm ²)	Átlagos tumorméret (mm)	Osztódó sejtek száma	Ki67+ sejtek aránya
Kontroll	29.4 ± 3.6	1.2 ± 0.1	6x6x3.5	2 ± 0.3	18.2 ± 3.8
cPKCα	33.5 ± 3.8	1.1 ± 0.3	5x5x3	1.8 ± 0.3	15.2 ± 2.9
cPKCβ	31.8 ± 4.9	1.1 ± 0.1	4.5x5x3.5	1.5 ± 0.5	13.8 ± 4.6
nPKCϵ	28.5 ± 4.3	1.3 ± 0.2	6x5x3	2.2 ± 0.8	20.5 ± 5.9
*nPKCδ	11.6 ± 3.8	3.6 ± 0.5	23x18x11	25 ± 1.5	88.5 ± 6.2
*DN-nPKCδ	73.6 ± 5.9	Nem mérhető	Nem indukált tumorokat		

A különböző paraméterek vizsgálata az "Anyagok és módszerek"-részben leírtak alapján történt. Az adatok több kísérlet átlag ± SEM értékeit reprezentálják, kivéve az átlagos tumorméret esetét, ahol csoportonként három-négy tumor átlagolt háromdimenziós méretét tüntettük fel. Az nPKC δ és a DN-nPKC δ esetében kapott eredményeink (*-gal jelölve) a kontrollhoz viszonyítva szignifikáns különbséget mutattak ($p < 0,05$).

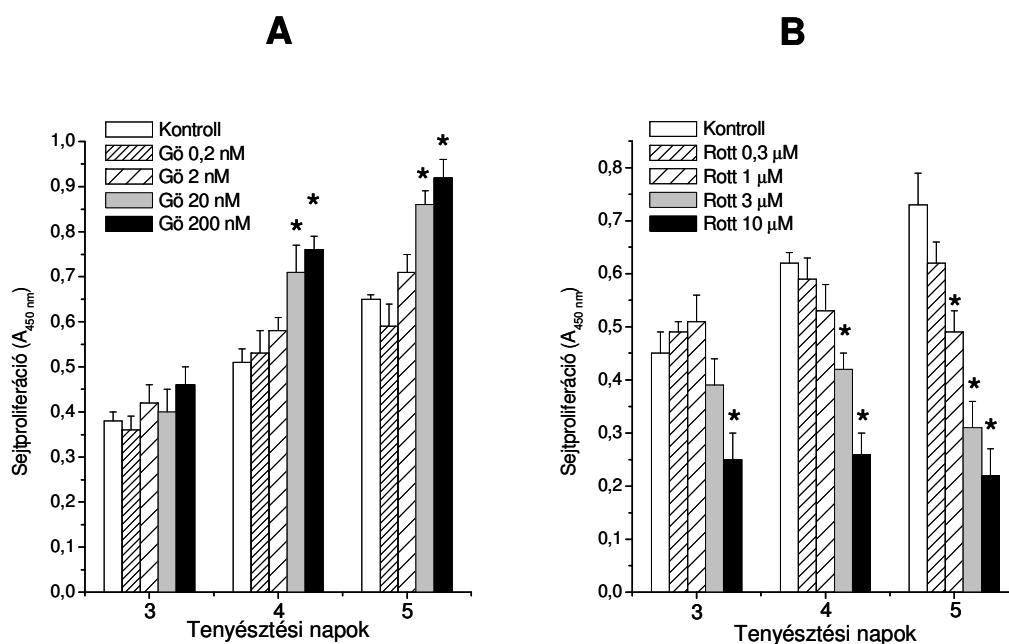
Ezt követően a különböző PKC izoformák overexpressziójának hatását vizsgáltuk meg a sejtek *in vitro* differenciálódásra, azaz az izomspecifikus differenciálódási marker dezmin expressziójára. A különböző sejt kultúrákat azonos (mintegy 80-85%-os) konfluenciánál arattuk, majd azonos proteintartalmú mintákat felhasználva Western blotot készítettünk

dezmin-ellenes antitest felhasználásával. Amint a **18/B ábrán** látható, a hipoproliferatív cPKC α és β overexpresszor sejtekben a differenciálódási marker dezmin szintje jelentősen fokozódott, míg ezzel ellentétben, a hiperproliferatív nPKC δ overexpresszor myoblastok dezmin expressziója jelentősen lecsökkent a kontroll C2C12 sejtekben mértékhez képest (az nPKC ϵ paraméterei ismételtelen nem változtak a kontrollhoz képest).

A különböző PKC inhibitorok eltérően befolyásolják, míg az nPKC δ kináz-negatív mutánsa (DN-PKC δ) gátolja a C2C12 myoblastok proliferációját

A **18. ábrán** (valamint, az nPKC δ -t és ezen izoforma kináz-negatív mutánsát tekintve, a **13/B ábrán**) bemutatott eredményeink azt sugallták, hogy C2C12 myoblastokon (1) a cPKC α és β izoenzimek gátolják a proliferációt és fokozzák a differenciálódást; (2) ezzel ellentétben, az nPKC δ igen erősen fokozza a sejtproliferációt és gátolja a differenciálódást; (3) az nPKC ϵ nem játszik jelentős szerepet ezen folyamatok szabályozásában. Ezen hipotézis további bizonyítására különböző PKC inhibitorok hatását vizsgáltuk meg kontroll C2C12 myoblastok proliferációjára. Ezen kívül tovább elemeztük a DN-nPKC δ -t hordozó C2C12 myoblastok növekedési sajátosságait.

Amint a **19/A ábrán** látható, a cPKC izoformák (C2C12 sejtek esetében cPKC α és β) gátlószere, a Gö6976 dóziszfüggő módon fokozta a sejtek proliferációját. Ezzel ellentétben, az nPKC δ gátlószere, a Rottlerin dóziszfüggően gátolta a sejtek növekedését (**19/B ábra**). Ezen túlmenően, a DN-nPKC δ overexpressziója drámai módon elnyújtotta a sejtek kettőződési idejét (olyannyira, hogy a DN-nPKC δ -t hordozó myoblast tenyészetek soha nem érték el a teljes konfluenciát, így ezen kultúrák szaturációs denzitása sem volt mérhető) (**1. táblázat**). Mindezen adatok, tovább erősítették azon feltevésünket, hogy a cPKC α és β negatív, míg az nPKC δ pozitív szerepet tölt be C2C12 myoblastok proliferációjának szabályozásában.



19. ábra Különböző PKC inhibitorok hatása C2C12 myoblastok sejtproliferációjára

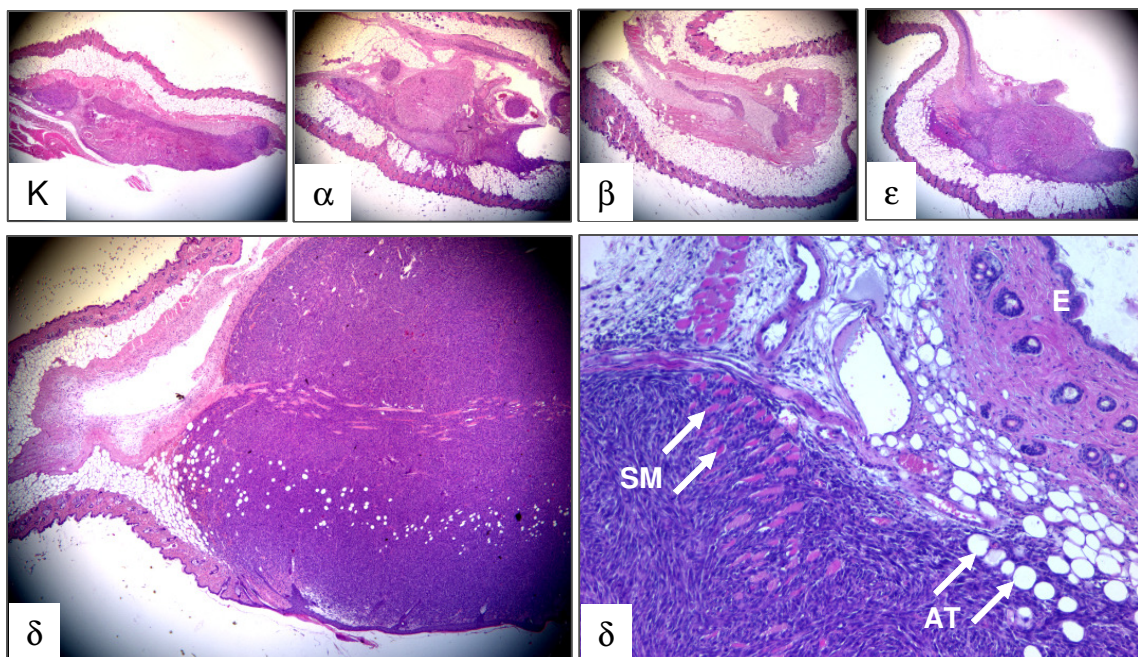
A C2C12 sejteket 5000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük 96-lyukú tenyésztőedénybe, majd különböző koncentrációjú **A**) cPKC gátlószer Gö6976-tal vagy **B**) nPKCδ gátlószer Rottlerinnel kezeltük a sejteket, végül naponta BrdU assay-t végeztünk. Az ábrán 4 független kísérlet eredményei láthatók átlag ± SEM formában. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelölik ($p < 0,05$).

A PKC izoenzimek overexpressziója különböző tumorokat indukál SCID egerekben

Végezetül megvizsgáltuk a különböző PKC izoformákat (valamint a mutáns DN-nPKCδ-t), illetve az üres vektort overexpresszáló C2C12 sejtek tumorindukáló képességét és *in vivo* növekedését is. A különböző C2C12 sejtek szuszpenzióját ($1-2 \times 10^6$ élő sejt/200 μl) SCID egerekbe injektáltuk (minden csoportban három-négy egér), majd harminc nap elteltével meghatároztuk a kialakult tumorok jellemzőit.

A HE festett metszeteken jól látható, hogy kontroll (üres vektorral transzfektált) C2C12 sejtek kis méretű, a széleken expanszív növekedésű, centrálisan a rhabdoid differenciálódás jeleit mutató tumort hoztak létre (**20. ábra**). A cPKCα, β vagy nPKCε izoformákat overexpresszáló sejtek injektálása, a kontrollhoz képest, általában hasonló szövettani jellegzetességgel bíró daganatok kialakulását eredményezte. Azaz, az így kifejlődött tumorok megtartották expanszív (nem infiltratív, benignus) növekedésüket, míg

szövettanuk a perifériás proliferáció és a centrális rhabdoid differenciálódás jegyeit mutatták. Ezen túlmenően csak kis változásokat tapasztaltunk a tumorok (kontrollhoz viszonyított) átlagos méretében, az osztódó sejtek számában, valamint a Ki67+ (azaz proliferáló) sejtek százalékos arányában (talán egyedüli különbségként az volt elmondható, hogy cPKC α és β overexpresszor sejtek által indukált tumorokban ezen értékek alacsonyabbnak adódtak) (**1. táblázat**).



20. ábra A PKC izoformák overexpressziójának hatása a tumorigenezisre SCID egerekben

A különböző PKC izoformákat stabilan expresszáló C2C12 sejteket, valamint a kontroll (K) sejteket $1-2 \times 10^6$ élő sejt/200 μ l denzitásban SCID egerekbe intradermálisan injektáltuk. 30 nap elteltével az állatokat eutanizáltuk, a kialakult tumorokat kimetszettük, formalinban fixáltuk, majd a paraffinba ágyazott metszeteket hematoxilín-eozinnal festettük meg. Eredeti nagyítás 20x, míg a jobb alsó kép esetében 100x. A jobb alsó képen: az nPKC δ overexpresszor sejtek agresszív növekedésű malignus tumort indukáltak, mely infiltrálta és szétroncsolta a szubkután zsírszövetet (AT) és a vázizmot (SM). E: epidermisz.

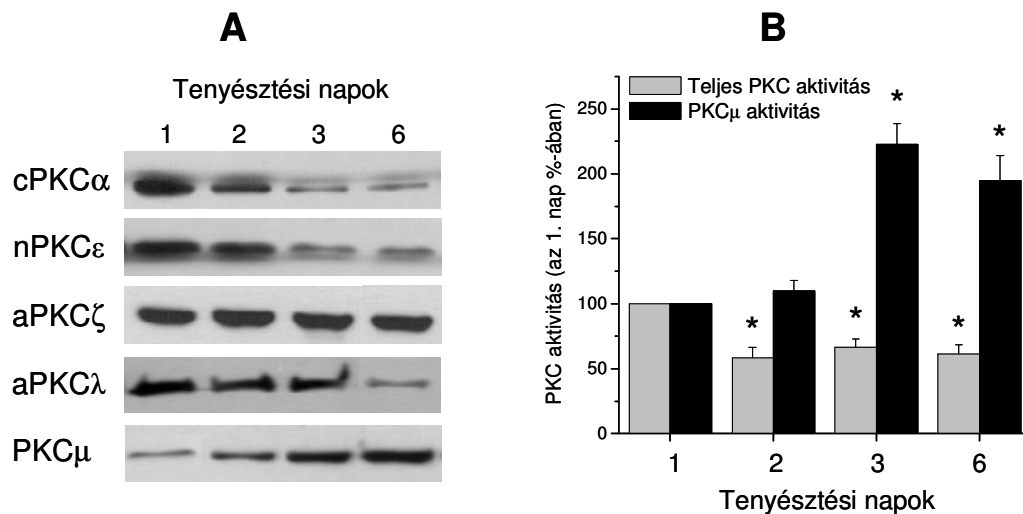
A fentiekől teljesen eltérő eredményeket kaptunk ugyanakkor az nPKC δ esetében. Ezen izoformát kifejező sejtek extrém nagy méretű, gyakran kifeléyesedő és vérző, valamint (számos esetben) a kísérleti állat (a vizsgálati perióduson belüli) jelentős súlyvesztését és halálát eredményező tumorok kifejlődését eredményezték (**20. ábra, 1. táblázat**). Szövettanilag ezen tumorok igen magas sejtosztódási rátával (megemelkedett a mitózisok és a

Ki67+ sejtek száma), a rhabdoid differenciálódás teljes hiányával, valamint infiltratív (azaz malignus) növekedési tulajdonságokkal voltak jellemzhetők, mely a kísérleti állat szubkután szöveteinek feldarabolódásához és roncsolódásához vezetett. Mindezek alapján az nPKC δ overexpresszor C2C12 myoblastok által indukált tumorok malignus rhabdomyosarcomáknak voltak diagnosztizálhatók.

Fontos megfigyelésnek adódott végezetül, hogy a DN-nPKC δ overexpresszor C2C12 myoblastok SCID egerekbe történő intradermális injektálása nem okozott tumorokat a kísérleti állatokban. A fentiek figyelembevételével ez tovább erősíti azon feltevésünket, hogy az nPKC δ központi szerepet játszik a C2C12 vázizomsejtek *in vivo* proliferációjának, valamint malignus transzformációjának serkentésében és kialakításában.

A PKC izoenzimek expressziója és aktivitása változik a porcdifferenciálódás során – A PKC μ szerepe

Fent bemutatott, különféle harántcsíktolt izomsejteken elvégzett kísérleteinkkel párhuzamosan megkezdtük csirkeembriók distális végtagtelepeiből indított HD porcsejt-tenyészetek PKC rendszerének tanulmányozását. Ennek során először meghatároztuk a sejtek PKC izoenzimprofilját. Amint a **21/A ábrán** látható, Western blot technika alkalmazásával bebizonyosodott, hogy a sejtek 5 PKC izoformát (cPKC α ; nPKC ϵ ; aPKC λ és ζ ; PKC μ) expresszálnak; a cPKC β és γ , valamint a nPKC η , δ és θ jelenlétét ugyanakkor nem tudtuk kimutatni (ábrával nem mutatva). Fontos megfigyelésünk volt továbbá (**21/A ábra**), hogy az *in vitro* porcdifferenciáció során a jelenlévő PKC izoformák szintje eltérő módon változott. Azaz, a cPKC α , nPKC ϵ és aPKC λ izoenzimek expressziója fokozatosan csökkent, míg a PKC μ kifejeződése folyamatosan nőtt a tenyésztés előrehaladtával (az aPKC ζ izoenzim mennyisége közel állandó maradt).

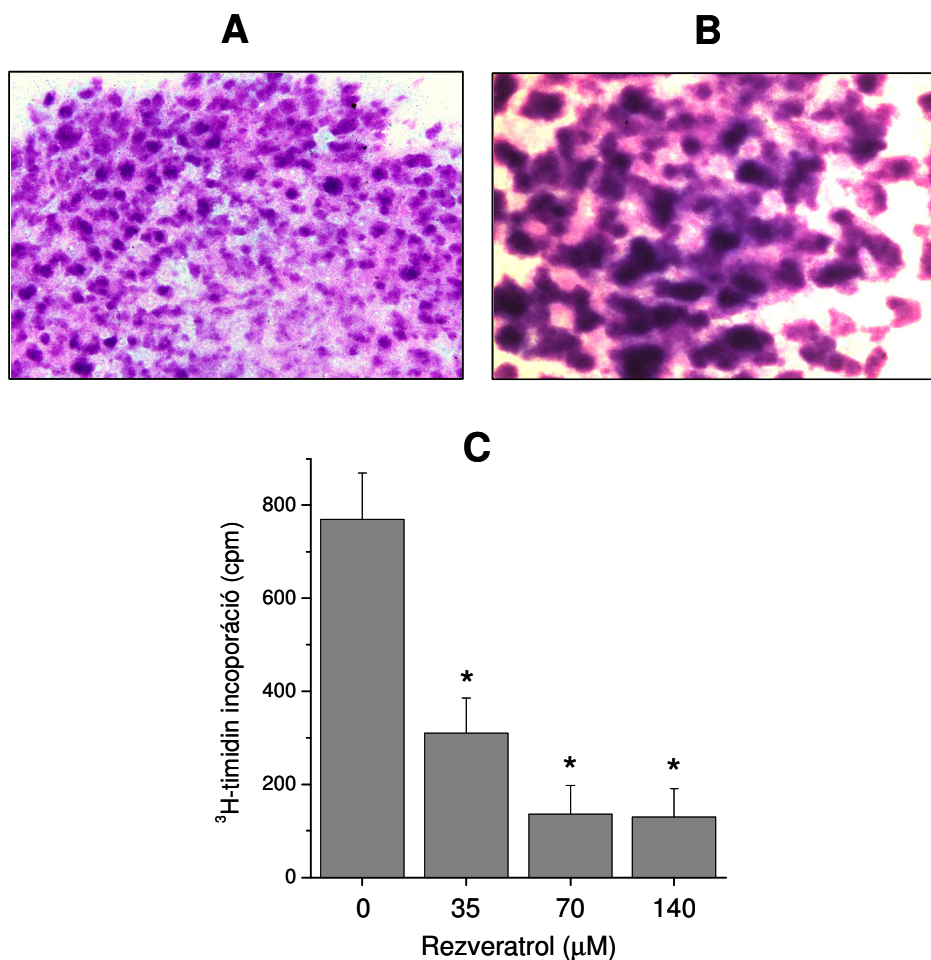


21. ábra A PKC izoenzimek kifejeződésének és aktivitásának vizsgálata a porcdifferenciálódás során

A) A különböző tenyésztési napokon összegyűjtött porcsejteket homogenizáltuk, majd azonos proteintartalmú mintákat felhasználva Western blotot készítettünk, specifikus PKC-ellenes antitestek felhasználásával. **B)** A sejtek homogenizátumaiból emellett meghatároztuk a teljes, valamint a PKC μ -specifikus enzimaktivitást is. Az ábra három (egyenként három párhuzamos mintán elvégzett) kísérlet átlag \pm SEM értékeit mutatja. A * szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket reprezentál az 1. napon kapott eredményekhez (mint 100%-hoz) képest.

Ezt követően a PKC rendszer aktivitásának változását elemeztük a tenyésztés során, különös tekintettel az általunk vizsgált sejtek közül csak a kondrocitákban kifejeződő PKC μ aktivitására. Megállapítottuk (**21/B ábra**), hogy – jó összhangban a Western blot alkalmazásával kapott eredményeinkkel – a teljes (azaz az összes jelenlévő izoformát magában foglaló) PKC enzimaktivitás (már a 2. napon) kis mértékben, de szignifikáns módon csökkent a tenyésztés előrehaladtával. Ezzel ellentétben kimutattuk, hogy a PKC μ izoforma-specifikus aktivitása (a 3. és 6. tenyésztési napokon legkifejezettebben) erőteljesen fokozódott a differenciált kultúrákban. Mindezen immunoblot és kináz-assay adataink arra utaltak, hogy a cPKC α és nPKC ϵ izoformák a porcdifferenciáció korai, míg a PKC μ a folyamat késői fázisában bírhat szabályozó szereppel.

Ezen utóbbi feltevésünket vizsgálva további kísérleteinkben a PKC μ gátlószereinek, a rezveratrolnak (O'Brian és mtsai, 2001) a hatását elemeztük a porcképződésre és a sejtproliferációra. Amint a **22/A és B ábrán** látható, a rezveratrol jelentősen megváltoztatta a metakromáziával megfestett kultúrák morfológiai jellegzetességeit: a PKC μ gátlószere hatására csökkent ugyan a differenciálódó területek összesített mérete (azaz az anyag gátolta a porcdifferenciációt), de a szer határása nagyobb porccsomók alakultak ki.



22. ábra A PKC μ gátlásának hatása a metakromáziával kimutatható porcképződésre és a sejtproliferációra. Kontroll (A), valamint 70 μ M rezveratrollal (B) kezelt sejteken (kezelés a 2. és 3. napon, 4-4 órán keresztül) a 6. tenyésztési napon metakromáziás festéssel vizsgáltuk a porcképződést. Nagyítás: 40x. C) A sejteket a rezveratrol az ábrán bemutatott koncentrációival kezeltük sejteken (kezelés a 2. és 3. napon, 4-4 órán keresztül), majd a 6. tenyésztési napon ³H-timidin beépülésével vizsgáltuk a sejtproliferációban bekövetkező változásokat. Az ábra három (egyenként három párhuzamos mintán elvégzett) kísérlet átlag \pm SEM értékeit mutatja. A * szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket reprezentál az 1. napon kapott eredményekhez (mint 100%-hoz) képest.

Ezzel jól illeszkedő eredményt szolgáltatottak proliferációs kísérleteink. Megállapítottuk ugyanis (**22/C ábra**), hogy a rezveratrol dózisfüggően csökkentette a porcosodó kultúrák növekedési ütemét. Mindezen adataink tovább erősítették azon feltevésünket, hogy a PKC μ központi szerepet játszik a porcosodó mezenchimális sejt kultúrák proliferációjának és differenciálódásának pozitív szabályozásában.

MEGBESZÉLÉS

Az nPKC δ központi és kizárólagos szereppel bír az IGF-I in vitro mitogén hatásának kifejlődésében humán vázizomsejteken

Kísérleteink első lépésében humán vázizomsejteken vizsgáltuk az IGF-I hatását a sejtek *in vitro* proliferációjára és differenciálódására, valamint elemeztük különféle jelátviteli útvonalak részvételét a növekedési hormon által közvetített sejt folyamatok szabályozásában. Jó összhangban korábban közölt adatokkal (Foulstone és mtsai, 2004; Jacquemin és mtsai, 2004) megállapítottuk, hogy az IGF-I dóziszfüggő módon fokozta a humán vázizomsejtek proliferációját, fúzióját valamint a differenciálódási marker expresszióját (**2. és 3. ábra**). Az irodalomban ugyanakkor elsőként számoltunk be arról, hogy ezen sejteken az IGF-I celluláris hatásainak kifejlődésében az nPKC δ központi és kizárólagos szereppel bír (azaz további jelátviteli mechanizmusok, így más jelenlévő PKC izoenzimek, a MAPK rendszer, valamint PI3-K útvonal nem vesz részt a folyamatban). Ezen megállapításunkat a következő bizonyítékokkal támaszthatjuk alá: (1) az IGF-I sejtnövekedést és differenciálódást fokozó hatását teljes mértékben felfüggesztette az nPKC δ specifikus inhibitora, a Rottlerin (**6. ábra**), ugyanakkor más inhibitorok, így a klasszikus cPKC α és a γ izoenzimek (**6. ábra**), a MAPK, illetve a PI3-K útvonalak gátlószere (**4. ábra**) nem befolyásolta azt; (2) az IGF-I nem aktiválta a MAPK Erk-1/2-t (**5. ábra**); (3) az IGF-I kizárólag az nPKC δ izoenzimet transzlokálta (**7. ábra**), amely az izoenzim aktivációjának általánosan elfogadott jele (Nishizuka, 1992; Jaken, 1996).

Tudomásunk szerint korábban egyedül Foulstone és mtsai (2004) vizsgálták humán vázizomsejt kultúrákon az IGF-I celluláris hatásmechanizmusát és a hozzá kapcsolódó jelátviteli útvonalakat. Velünk ellentétben ők azonban azt találták, hogy a MAPK és a PI3-K útvonal együttesen vesznek részt az IGF-I hatásának kifejlődésében. Mivel vizsgálataik során

ők (1) nem szeparált (azaz nem fibroblaszt-mentesített), 2-6 alkalommal passzált humán myoblast kultúrákat használtak, melyeket zselatin rétegen tenyésztettek, ellentétben az általunk alkalmazott „szigorúan” fibroblaszt-mentes primer szatellitasejt-tenyészetekkel; (2) Foulstone és mtsai a sejteket alacsony szérumtartalmú („differenciáltató”) médiumban tenyésztették, amelyben az IGF-I nem volt képes a myotube-ok kialakulásának serkentésére (ellentétben a mi adatainkkal, ahol az IGF-I elősegítette a fúziót, lásd **3. ábra**); (3) ők egyáltalán nem vizsgálták a PKC izoenzimek lehetséges szerepét; így (véleményünk szerint) az általuk leírt és a jelen disszertációban bemutatott adatok közötti különbség elsősorban a két alkalmazott technika, valamint tenyésztési körülmények különbözőségéből adódhat.

C2C12 myoblastokon az IGF-I hatásainak kifejlődésében az nPKC δ mellett a MAPK útvonal nPKC δ függő részvétele is szükséges

C2C12 myoblastokon az IGF-I celluláris hatásmechanizmusának megismerését célzó vizsgálataink ugyanakkor hasonló, de korántsem azonos eredményekre vezettek. Kimutattuk, hogy (1) az IGF-I által jelentősen és dóziszfüggően megnövelt sejtproliferációt és differenciálódást (**8. ábra**) teljes mértékben felfüggesztette az nPKC δ szelektív inhibitora, ugyanakkor a cPKC izoenzimek, illetve a PI3-K útvonalak gátlószerei nem befolyásolták a hatást (**9. ábra**); (2) az IGF-I fokozta az nPKC δ szelektív tirozin-foszforilációját (**12. ábra**), mely az izoenzim aktivációjának jele (Nishizuka, 1992; Jaken, 1996; Blass és mtsai, 2002) ; (3) az nPKC δ konstitutíve aktív formájának rekombináns overexpressziója jelentős mértékben megnövelte a sejtproliferációs rátát, valamint mintegy „utánozta” az IGF-I proliferációt fokozó hatását (**13. ábra**); (4) az nPKC δ domináns (kináz) negatív formájának (DN-nPKC δ) rekombináns overexpressziója meggátolta a C2C12 sejtek proliferációját és teljes mértékben megakadályozta az IGF-I által kiváltott celluláris hatások kifejlődését (**13. ábra**). Ezen eredmények egyértelműen megerősítették és alátámasztották azon feltevésünket, hogy –

hasonlóan a humán vázizomsejteken fent bemutatott tapasztalatainkhoz – az nPKC δ központi szerepet játszik az IGF-I-specifikus válaszok kialakulásában C2C12 myoblastokon is.

Ezen túlmenően ugyanakkor (jó összhangban a Milasincic és mtsai által korábban leírtakkal, 1996) azt is megállapítottuk, hogy C2C12 izomsejteken a MAPK útvonal is szerepet játszik az IGF-I hatásainak közvetítésében. Vizsgálataink során ugyanis bebizonyosodott, hogy a MAPK útvonal specifikus inhibitora részlegesen (de statisztikailag szignifikáns módon) meggátolta az IGF-I proliferációt és differenciálódást fokozó hatásait (**9. ábra**), valamint, hogy az IGF-I fokozta a MAPK Erk-1/2 aktivitásfüggő foszforilációját is (**10. ábra**). Érdekes volt megfigyelnünk továbbá, hogy (1) az nPKC δ szelektív gátlása teljes mértékben, míg a MAPK Erk-1/2 inhibitor csak részben függesztette fel az IGF-I mitogén hatásait (**9. ábra**); (2) az nPKC δ inhibitor Rottlerin hatékonyan gátolta az IGF-I által kiváltott MAPK Erk-1/2 foszforilációt (**14. ábra**); (3) a konstitutíven aktív nPKC δ izoformát overexpresszáló C2C12 myoblastok jelentősen felgyorsult növekedési ütemét a MAPK inhibitor PD098059 részlegesen (de statisztikailag szignifikáns módon) lecsökkentette (**15. ábra**). Mindezen utóbbi adataink arra utalnak, hogy C2C12 myoblastokon a MAPK rendszer részvételéhez (az IGF-I celluláris hatásainak kialakulásában) elengedhetetlenül szükséges az nPKC δ előzetes, IGF-I-függő aktivációja; azaz ezen izoforma működése a MAPK Erk-1/2 útvonal „upstream” szabályozó mechanizmusaként értelmezhető.

Az nPKC δ izoenzimről (hasonlóan más PKC izoformákhoz) számos esetben bebizonyosodott, hogy központi szereppel bír a különféle növekedési faktorok specifikus tirozin-kináz receptorai által beindított intracelluláris jelátviteli folyamatokban, valamint azok szabályozásában. Keratinocyták vizsgálata során például kimutatták, hogy az nPKC δ kétirányú kapcsolatban áll az epidermális növekedési faktor által beindított jelátviteli útvonalakkal (Denning és mtsai, 2000), valamint, hogy – hasonlóan a patkány vázizomsejt kultúráknál tapasztaltakhoz (Braiman és mtsai, 2001b) – résztvesz az inzulin proliferatív

hatásának közvetítésében (Shen és mtsai, 2001). Igen jelentős felfedezés volt annak leírása is, miszerint az izoenzim központi szerepet játszik az IGF-I által kiváltott sejtválaszok (pl. migráció, sejtranszformáció) szabályozásában fibroblastokon és kolonális epitheliális sejteken (Li és mtsai, 1992; Andre és mtsai, 1999). Úgy tűnik tehát, hogy – hasonlóan más sejteken tapasztaltakhoz – az nPKC δ humán és egér vázizomsejteken is központi szereppel bír az IGF-I hatásainak kialakulásában és szabályozásában.

A különböző PKC izoenzimek specifikus, differenciált és gyakran ellentétes szerepet töltenek be C2C12 myoblastok sejtfolymatainak szabályozásában

Kísérleteink második részében (az nPKC δ -n kívül) számos egyéb PKC izoforma szerepét vizsgáltuk C2C12 myoblastok sejtfolymatainak szabályozásában. Az irodalomban elsőként számoltunk be arról, hogy bizonyos cPKC (α és β) és nPKC (δ és ϵ) izoenzimek specifikus, differenciált, ugyanakkor gyakran egymással ellentétes szabályozó funkciókkal jellemezhetők a C2C12 vázizomsejtek *in vitro* proliferációs és differenciálódási, valamint *in vivo* tumorgenetikus mechanizmusaiban. Molekuláris biológiai technikákat (rekombináns overexpresszió) alkalmazva, valamint a PKC izoenzimek aktivitásának farmakológiai módosítása (gátlószerek alkalmazása) révén megállapítottuk, hogy a „klasszikus” cPKC α és β izoformák a sejtprolifерáció negatív regulátoraiként funkcionálnak, ugyanakkor aktivitásuk fokozza ezen sejtek differenciálódását (**18. és 19. ábra**). Érdekes módon Capiati és mtsai (1999, 2000) madár myoblast kultúrákon végzett kísérletei során azt tapasztalták, hogy a cPKC α – ellentétben a fent bemutatott eredményeinkkel – ezen sejttypusban a sejtprolifерáció fokozásában játszik központi szerepet. Fontos megemlítenünk továbbá, hogy humán vázizomsejt kultúrákon végzett korábbi vizsgálataink azt állapították meg, hogy a cPKC α (feltehetően) nem vesz részt a proliferáció szabályozásában, hiszen a növekedést gátló PKC aktivátor forbol-észterek nem változtatták meg ezen izoenzim szubcelluláris lokalizációját

(azaz aktivitását). Mindezen adatok azt sugallják, hogy (hasonlóan az IGF-I celluláris hatásmechanizmusának vizsgálata során tapasztaltakhoz) a cPKC α proliferáció szabályozásában betöltött szerepe erősen fajfüggő jellegzetességeket mutat.

Az nPKC ϵ izoformát korábban számos sejttípus esetében a sejtproliferáció egyik kulcsfontosságú stimulátor molekulájaként jellemezték (Mischak és mtsai, 1993; Goodnight és mtsai, 1994; Way és mtsai, 2000; Gutcher és mtsai, 2003). Keratinocytákban, fibroblasztokban, valamint gliasejteken bebizonyosodott, hogy az nPKC ϵ stabil overexpressziója fokozta az *in vivo* és *in vitro* sejtproliferációt, míg az izoforma down-regulációja (azaz kifejeződésének és/vagy aktivitásának csökkenése) a proliferáció gátlását és a differenciálódás indukcióját idézte elő (Mischak és mtsai, 1993; Goodnight és mtsai, 1994; Brodie és mtsai, 1998; Papp és mtsai, 2004). A disszertációban bemutatott kísérleteink során ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy C2C12 myoblastok esetében ezen izoenzim nem játszik szerepet a proliferáció, a differenciálódás vagy a tumorgenezis szabályozásában (**18. és 20. ábr, 1. táblázat**). Mivel – hasonlóan másokhoz (Meacci és mtsai, 1999) – kimutattuk, hogy az nPKC ϵ nem fejeződik ki C2C12 izomsejtekben, a konstitutíven aktív rekombináns izoenzim overexpressziójának „hatástalansága” valószínűleg az nPKC ϵ -hoz kapcsolt specifikus enzim –szubsztrát rendszer hiányára vezethető vissza.

Az nPKC δ drámai módon fokozza C2C12 vázizomsejtek in vitro proliferációját, valamint malignus transzformációt indukál in vivo

Kísérleteink során a legfigyelemreméltóbb adatokat az nPKC δ izoenzim vizsgálata során kaptuk. Mint korábban említettük, számos közlemény számolt be arról, hogy az izoenzim (hasonlóan más PKC enzimekhez) jelentős mértékben vesz részt a proliferáció és differenciálódás szabályozásában (Mischak és mtsai, 1993; Goodnight és mtsai, 1994; Brodie és mtsai, 1998; Way és mtsai, 2000; Gutcher és mtsai, 2003). A legtöbb esetben ugyanakkor –

így például humán keratinocytákon (Li és mtsai, 1999; Papp és mtsai, 2004;) és fibroblasztokon (Ács és mtsai, 1997a, 1997b) – az derült ki, hogy az nPKC δ a sejtek differenciálódását és az apoptózis folyamatát serkenti, míg a proliferáció szabályozásában gátló szereppel bír. A mai napig csupán egyes emlőcarcinoma sejtek esetében mutatták ki, hogy az izoforma (mintegy „túlélő” faktorként funkcionálva) fokozza a sejtek növekedését (McCracken és mtsai, 2003).

A disszertációban bemutatott kutatásaink során ugyanakkor bebizonyosodott, hogy (1) a konstitutíven aktív nPKC δ stabil overexpressziója fokozta, míg a kináz inaktív DN-nPKC δ mutáns jelenléte gátolta a C2C12 myoblastok *in vitro* proliferációját (**13. és 18. ábra, 1. táblázat**); (2) az nPKC δ overexpressziója csökkentette az izomspecifikus differenciálódási marker dezmin expresszióját (**18. ábra**); (3) az nPKC δ aktivitásának szelektív gátlása Rottlerinnel dóziszfüggően meggátolta a kontroll C2C12 sejtek növekedését (**19. ábra**); (4) az nPKC δ overexpresszor sejtek immunhiányos egerekbe történő intradermális injektálása nagy méretű, malignusan transzformált rhabdomyosarcomák kialakulását eredményezte (szemben a kontroll sejtek által létrehozott kis méretű, jóindulatú tumorokkal) (**20. ábra és 1. táblázat**); (5) a DN-nPKC δ overexpresszor myoblastok egyáltalán nem indukáltak tumorokat SCID egerekben (**1. táblázat**). Mindezen eredményeink – kiegészülve azon (korábban részletezett) adatainkkal, hogy az nPKC δ központi szerepet tölt be az IGF-I celluláris hatásainak kialakításában mind humán, mind C2C12 izomsejteken – arra engednek következtetni, hogy sikerrel azonosítottuk az nPKC δ egy új funkcióját, mint a harántcsíkolt izom *in vitro* és *in vivo* proliferációjának egyik meghatározó jelentőségű, stimuláló molekuláját.

A C2C12 myoblastok vizsgálata során kapott adataink és a laboratóriumunk korábbi kutatási eredményeinek összehasonlítása egy további érdekes jelenségre mutatott rá. Humán epidermális keratinocytákon (ahol a disszertációban bemutatott kombinált molekuláris biológiai és farmakológiai technikákkal megegyező megközelítést alkalmaztunk) azt

tapasztaltuk, hogy a cPKC α és az nPKC δ overexpressziója fokozta a sejtek differenciálódását, ugyanakkor gátolta azok proliferációját és a tumorgenezist. Ezzel ellentétben, a cPKC β és az nPKC ϵ aktivitása fokozta mind az *in vivo*, mind az *in vitro* sejtnövekedést és gátolta a differenciálódás folyamatát (Papp és mtsai, 2004). A C2C12 vázizomsejteken a legtöbb esetben ezzel ellentétes jelenségeket tapasztaltunk; azaz a cPKC β gátolta a sejtek növekedését, az nPKC ϵ jelentéktelen szerepet játszott a proliferáció szabályozásában, az nPKC δ viszont jelentős mértékben fokozta a sejtproliferációt és a daganatok kialakulását/transzformációját. Ha figyelembe vesszük továbbá, hogy keratinocytákon még a hyperproliferatív átalakulást eredményező cPKC β és/vagy nPKC ϵ overexpressziója sem járt együtt a sejtek malignus transzformációjával (szemben az nPKC δ hatásával C2C12 myoblastokon), adataink alapján kimondható, hogy a PKC izoenzimek nemcsak izoforma-specifikus módon szabályozzák a sejtek növekedését és differenciálódását, de hatásuk igen kifejezett sejttípus-függéssel is jellemezhető.

A PKC μ központi szerepet játszik a porc differenciálódás folyamatainak serkentésében

Kísérleteink során megkezdtük egy másik sejttípus, a porcosodó mezenchimális sejtkultúrák PKC izoenzimekészletének vizsgálatát is. Kimutattuk, hogy – hasonlóan laboratóriumunk korábbi, humán vázizomsejteken és keratinocytákon leírt adataihoz (Boczán és mtsai, 2000; Papp és mtsai, 2003) – a differenciálódó kondrociták jellegzetes izoformamintázata, valamint a PKC aktivitás jelentősen változott a tenyésztési idő függvényében (**21. ábra**). Megállapítottuk, hogy a legtöbb izoenzim (cPKC α , nPKC ϵ , aPKC λ) szintje csökkent a differenciálódás előrehaladtával, mely arra utalhat, hogy ezen molekulák a folyamat korai fázisában játszhatnak szerepet. Az aPKC ζ szintje változatlan, de magas szintű maradt a tenyésztés során, mely az izoforma esszenciális biológiai folyamatokat szabályozó funkciójára utalhat.

Ezzel ellentétes jelenséget figyeltünk meg a kísérleteink során csak a porcsejtekben kimutatott PKC μ vizsgálata során. Bebizonyosodott, hogy a sejtekben kimutatott PKC izoformák közül egyedül a PKC μ szintje és (főként) aktivitása növekedett a differenciálódás során (**21. ábra**); azaz a cPKC α , nPKC ϵ és aPKC λ aktivitása mintegy „felcserélődött” a PKC μ aktivitására a folyamat késői fázisaiban. Mivel funkcionális kísérleteink során az is bebizonyosodott, hogy a PKC μ gátlása igen jelentősen csökkentette a sejtek proliferációját és a metakromáziás festéssel kimutatható porcképződést (**22. ábra**), eredményeink a PKC μ központi szerepét valószínűsítik a porcdifferenciáció (késői folyamatainak) pozitív szabályozásában.

A PKC μ izoforma sejtproliferációt és differenciálódást szabályozó szerepéről más sejteken is hasonló eredményekről számoltak be. Bebizonyosodott, hogy pl. egér keratinocytákban és humán bőrben a PKC μ expressziójának szintje jól korrelál a sejtek osztódási állapotával (Rennecke és mtsai, 1999; Ristich és mtsai, 2006): proliferáló sejtekben magas, a differenciálódó, nem osztódó sejtekben alacsony koncentrációban fordult elő. Felvetődött emellett, hogy keratinocytákon és osteoid sejteken a PKC μ fontos szerepet játszik a MAPK útvonal aktiválásában is (Rennecke és mtsai, 1999; Lemonnier és mtsai, 2004.), mely tovább erősíti az izoforma fent bemutatott szabályozó szerepének fontosságát.

A kísérletes eredmények (potenciális) hasznosítása

A disszertációban bemutatott eredményeink – az egyértelmű alapkutatásban való felhasználáson túl – számos, az alkalmazott kutatásban, a kísérletes fejlesztésben, valamint (remélhetően) a klinikai gyakorlatban is relevanciával bíró további hasznosítás lehetőségét vetik fel. Az utóbbi évek során számos klinikai kutatás eredménye látott napvilágot, melyek a PKC izoformák aktivitásának megváltoztatása (antiszensz technológiák, PKC inhibitorok) révén próbálják a daganatok fokozott növekedését gátolni (Carter, 2000; Hofmann, 2001).

Ezen kutatások még pontosabb tervezéséhez, kivitelezéséhez, valamint az alkalmazott potenciális gyógyszerhatóanyagok biológiai hatáselemzéséhez nyújtanak további segítséget azon eredményeink, miszerint a PKC izoenzimek specifikus módon képesek a sejtproliferáció *in vitro* és *in vivo* szabályozására. Kísérletes adataink azt sugallják, hogy pl. a harántcsíkolt izom daganatos megbetegedéseiben hatékony beavatkozás lehet a myoblastokban hiperproliferatív átalakulást eredményező, illetve az IGF-I mitogén hatását közvetítő nPKC δ aktivitásának csökkentése szelektív inhibitorok, valamint az enzim kifejeződését csökkentő célzott technikák alkalmazásával. Másik, az előzőeket akár kiegészítő terápiás alternatívaként olyan szerek alkalmazása is sikerrel kecsegtethet, melyek a sejtproliferációt gátló (és a differenciálódást elősegítő) cPKC α és β izoenzimek aktivitásának fokozásán keresztül fejtik ki hatásukat. Végezetül, degeneratív porcmebetegekben egy potenciális terápiás alternatíva lehet (a kondrogenézis folyamatainak serkentésére) a PKC μ aktivitásának szelektív fokozása.

Eredményeink ugyanakkor a PKC izoformákra ható szerek alkalmazásának egy potenciális veszélyére is felhívják a figyelmet. Mint korábban részleteztük, egy adott PKC izoforma proliferációt szabályozó szerepe jelentősen függ az őt expresszáló sejt típusától. Az nPKC δ -t példaként véve, ezen izoformát szinte minden eddig vizsgált sejtben (bizonyos emlődaganat sejtvonalakat kivéve) a proliferáció negatív regulátoraként írták le (Watanabe és mtsai, 1992; Mischak és mtsai, 1993; Lu és mtsai, 1997; McCracken és mtsai, 2003). Ezzel szöges ellentétben kísérleteink során bebizonyosodott, hogy az izoforma a vázizomsejtekben nem a differenciálódást, hanem a proliferációt serkenti, ráadásul konstitutív jelenléte malignus transzformációhoz vezet. Így tehát ha egy adott szer alkalmazásával szisztémásan fokozzuk például az nPKC δ aktivitását (pl. bőrdaganatok kezelésének céljából), akkor fennáll a veszélye, hogy a célzott daganat proliferációjának visszaszorítása mellett egy másik

sejttípusban (pl. vázizom), ugyanazon PKC izoformán hatva akár daganatos transzformációt is előidézhethetünk.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során vázizom- és porcsejteken vizsgáltuk a protein kináz C (PKC) izoenzimes családot, valamint egyéb jelátviteli rendszerek szerepét az *in vitro* és *in vivo* proliferáció és differenciálódás szabályozásában. Megállapítottuk, hogy humán vázizomsejteken az izomregeneráció folyamatának egyik központi molekulája, az IGF-I mitogén (azaz növekedést és differenciálódást fokozó) hatásának kifejlődésében az nPKC δ izoenzim kizárólagos szereppel bír. Egér C2C12 myoblastokon ugyanakkor kimutattuk, hogy az nPKC δ -specifikus aktivitás központi szerepe mellett a MAPK útvonal is részvesz az IGF-I hatásainak kialakításában. Bebizonyosodott az is, hogy C2C12 myoblastokon az nPKC δ a MAPK útvonal „upstream” regulátoraként viselkedik; azaz megelőző aktivációja szükséges a MAPK rendszer aktivitásának fokozódásához. C2C12 izomsejteken emellett megállapítottuk, hogy a különböző PKC izoformák stabil rekombináns overexpressziója eltérő módon befolyásolta a sejtek funkcionális és morfológiai sajátosságait. Kimutattuk, hogy a cPKC α és β jelenléte lecsökkentette a sejtek növekedési ütemét, míg az nPKC ϵ overexpressziója nem befolyásolta azt. Ezzel ellentétben az nPKC δ konstitutív overexpressziója drámai módon megnövelte a sejtek *in vitro* proliferációját, lecsökkentette a differenciálódási marker dezmin kifejeződését, valamint *in vivo* igen nagyméretű, malignusan transzformált daganatok kialakulását indukálta immunhiányos egerekben. Végezetül megállapítottuk, hogy csirkeembriók porcosodó végtagtelepeiből izolált mezenchimális sejttenyészetekben az egyedi tulajdonságokkal bíró PKC μ meghatározó szereppel bír a porcdifferenciálódás (késői) folyamatainak szabályozásában. Mindezen adataink egyes PKC izoformák specifikus, ugyanakkor egymással gyakran ellentétes szerepére utalnak vázizom- és porcsejtek növekedésének és differenciálódásának szabályozásában.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ács P., Bögi K., Marquez A.M., Lorenzo P.S., Bíró T., Szállási Z., Blumberg P.M. (1997a): The catalytic domain of protein kinase C chimeras modulates the affinity and targeting of phorbol ester-induced translocation. *J. Biol. Chem.* 272:22148-22153.
- Ács P., Wang Q.J., Bögi K., Marquez A.M., Lorenzo P.S., Bíró T., Szállási Z., Mushinski J.F., Blumberg P.M. (1997b): Both the catalytic and regulatory domains of protein kinase C chimeras modulate the proliferative properties of NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 272:28793-28799.
- Adams G.R. (2002): Autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation. *J. Appl. Physiol.* 93:1159-1167.
- Ahrens P.B., Solursh M., Reiter R.S. (1977): Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev. Biol.* 60:69-82.
- Alessi D.R. (1997): The protein kinase C inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1 β and p70 S6 kinase. *FEBS Letters* 402:121-123.
- Allen R.E., Boxhorn L.A. (1989): Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor 1, and fibroblast growth factor. *J. Cell Physiol.* 138:311-315.
- Anastasi S., Giordano S., Sthandier O., Gambarotta G., Maione R., Comoglio P., Amati P. (1997): A natural hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in myoblast cells and the effect of the constitutive Met kinase activation on myogenic differentiation. *J. Cell Biol.* 137:1057-1068.
- Andre F., Rigot V., Remacle-Bonnet M., Luis J., Pommier G., Marvaldi J. (1999): Protein kinases C-gamma and -delta are involved in insulin-like growth factor I-induced migration of colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 116:64-77.
- Armand O., Boutineau A.M., Mauger A., Pautou M.P., and Kieny M. (1983): Origin of satellite cells in avian skeletal muscles. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 72:163-181.
- Barton-Davis E.R., Shoturma D.I., Musaro A., Rosenthal N., Sweeney H.L. (1998): Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function. *Proc Natl Acad Sci* 95:15603-15611.
- Becker K.P. and Hannun Y.A. (2005): Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:1448-1461.
- Biddulph D.M., Dozier M.M., Capehart A.A. (2000): Inhibition of prostaglandin synthesis reduces cyclic AMP levels and inhibits chondrogenesis in cultured chick limb mesenchyme. *Methods Cell. Sci.* 22:9-16.
- Bíró T., Czifra G., Bodó E., Lázár J., Papp H., Kovács I., Juhász I., Kovács L. (2004): Cell and isoform specific roles of protein kinase C isoenzymes in regulating in vitro and in vivoproliferation of keratinocytes and skeletal muscle cells. *J. Invest. Dermatol.* 122:A21.
- Bischoff R. (1990): Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. *Development* 109:943-952.
- Bischoff R. (1994): The satellite cell and muscle regeneration. in "Myogenesis" Eds.: Engel,

A.G., Franszini-Armstrong, C., Vol. 2:97-118.

Blass M., Kronfeld I., Kazimirsky G., Blumberg P.M., Brodie C. (2002): Tyrosine phosphorylation of protein kinase Cdelta is essential for its apoptotic effect in response to etoposide. *Mol. Cell. Biol.* 22:182-195.

Boczán J., Boros S., Mechler F., Kovács L., Bíró T. (2000): Differential expressions of protein kinase C isozymes during proliferation and differentiation of human skeletal muscle cells in vitro. *Acta Neuropathol.* 99:96-104.

Boczán J., Bíró T., Czifra G., Lázár J., Papp H., Bárdos H., Ádány R., Mechler F., Kovács L. (2001): Phorbol ester treatment inhibits proliferation and differentiation of cultured human skeletal muscle satellite cells by differentially acting on protein kinase C isoforms. *Acta Neuropathol.* 102:55-62.

Bornemann A., Schmalbruch H. (1992): Desmin and vimentin in regenerating muscles. *Muscle Nerve* 15:14-20.

Braiman L., Alt A., Kuroki T., Ohba M., Bak A., Tennenbaum T. (1999): Protein kinase Cdelta mediates insulin-induced glucose transport in primary cultures of rat skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.* 13:2002-2012.

Braiman L., Alt A., Kuroki T., Ohba M., Bak A., Tennenbaum T., Shampson S.R. (2001a): Activation of protein kinase C zeta induces serine phosphorylation of VAMP2 in the GLUT4 compartment and increases glucose transport in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 21:7852-7861.

Braiman L., Alt A., Kuroki T., Ohba M., Bak A., Tennenbaum T., Sampson S.R. (2001b): Insulin induces specific interaction between insulin receptor and protein kinase C delta in primary cultured skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.* 15:565-574.

Braun T., Arnold H.H. (1996): Myf-5 and myoD genes are activated in distinct esenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages. *EMBO J.* 15:310-318

Brodie C., Kuperstein I., Ács P., Blumberg P.M. (1998): Differential role of specific PKC isoforms in the proliferation of glial cells and the expression of the astrocytic markers GFAP and glutamine synthetase. *Mol. Brain Res.* 56:108-117.

Butler A.A., Yakar S., Gewolb I.H., Karas M., Okubo Y., LeRoith D. (1998): Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 121:19-26.

Cancedda R., Castagnola P., Cancedda F.D., Dozin B., Quarto R. (2000): Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 44:707-714.

Cantini M., Massimino M.L., Bruson A., Catani C., Dalla Libera L., Carraro U. (1994): Macrophages regulate proliferation and differentiation of satellite cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202:1688-1696.

Capiati D.A., Limbozzi F., Tellez-Inon M.T. and Boland R.L. (1999): Evidence on the participation of protein kinase C alpha in the proliferation of cultured myoblasts. *J. Cell. Biochem.* 74:292-300.

Capiati D.A., Vazquez G., Tellez Inon M.T., Boland R.L. (2000): Antisense oligonucleotides targeted against protein kinase c alpha inhibit proliferation of cultured avian myoblasts. *Cell. Prolif.* 33:307-315.

Carter C.A. (2000): Protein kinase C as a drug target: implications for drug or diet prevention and treatment of cancer. *Curr. Drug Targets* 1:163-183.

- Chalfant C.E., Ciaraldi T.P., Watson J.E., Nikoulina S., Henry R.R., Cooper D.R. (2000): Protein kinase C θ expression is increased upon differentiation of human skeletal muscle cells: dysregulation in type 2 diabetic patients and a possible role for protein kinase C θ in insulin-stimulated glycogen synthase activity. *Endocrinology* 141:2773-2778.
- Chambers R.L., McDermott J.C. (1996): Molecular basis of skeletal muscle regeneration. *Can. J. Appl. Physiol.* 21:155-184.
- Chang S.H., Oh Ch.D., Yang M.S., Kang S.S., Lee Y.S., Sonn J.K., Chun J.S. (1998): Protein kinase C regulates chondrogenesis of mesenchymes via mitogen-activated protein kinase signalling. *J. Biol. Chem.* 273:19213-19219.
- Cho-Chung Y.S., Nesterova M., Becker K.G., Srivastava R., Park Y.G., Lee Y.N., Cho Y.S., Kim M.K., Neary C., Cheadle C. (2002): Dissecting the circuitry of protein kinase A and cAMP signaling in cancer genesis: antisense, microarray, gene overexpression, and transcription factor decoy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 968:22-36.
- Cossu G., Zani B., Colette M., Bouche M., Pacifici M., Molinaro M. (1980): In vitro differentiation of satellite cells isolated from normal and dystrophic mammalian muscles. A comparison with embryonic myogenic cells. *Cell Differ.* 9:357-368.
- de Crombrughe B., Lefebvre V., Behringer R.R., Bi W., Murakami S., Huang W. (2000): Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 19:389-394.
- Decker LV (2003): *Protein Kinase C*. Oxford Press, New York
- Denning M.F., Dlugosz A.A., Cheng C., Dempsey P.J., Coffey R.J., Threadgill D.W., Magnuson T., Yuspa S.H. (2000): Cross-talk between epidermal growth factor receptor and protein kinase C during calcium-induced differentiation of keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 9:192-199.
- Dessau W., von der Mark H., von der Mark K., Fischer S. (1980): Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 57:51-60.
- Disatnik M.H., Rando T.A. (1999): Integrin-mediated muscle cell spreading. The role of protein kinase C in outside-in and inside-out signaling and evidence of integrin cross-talk. *J. Biol. Chem.* 274:32486-32492.
- Dupont J., LeRoith D. (2001): Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Horm. Res.* 55:22-26.
- Dupont-Versteegden E.E., Murphy R.J., Houle J.D., Gurley C.M., Peterson C.A. (2000): Mechanisms leading to restoration of muscle size with exercise and transplantation after spinal cord injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279:1677-84.
- Edwall D., Schalling M., Jennische E., Norstedt G. (1989): Induction of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid during regeneration of rat skeletal muscle. *Endocrinology* 124:820-825.
- Ehrhardt J. and Morgan J. (2005): Regenerative capacity of skeletal muscle. *Curr. Opin. Neurol.* 18:548-553.
- Farzaneh F., Entwistle A., Zalin R.J. (1989): Protein kinase C mediates the hormonally regulated plasma membrane fusion of avian embryonic skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 181:298-304.
- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. (1998): Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*

- 279:1528-30. Florini J.R., Magri K.A. (1989): Effects of growth factors on myogenic differentiation. *Am. J. Physiol.* 256:707-711.
- Fisher P.B., Miranda A.F., Mufson R.A., Weinstein L.S., Fujiki H., Sugimura T., Weinstein I.B. (1982): Effects of teleocidin and the phorbol ester tumor promoters on cell transformation, differentiation, and phospholipid metabolism. *Cancer Res.* 42:2829-2835.
- Fisher P.B., Miranda A.F., Babiss L.E., Pestka S., Weinstein I.B. (1983): Opposing effects of interferon produced in bacteria and of tumor promoters on myogenesis in human myoblast cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:2961-2965.
- Foulstone E.J., Huser C., Crown A.L., Holly J.M.P., Stewart C.E.H. (2004): Differential signalling mechanisms predisposing primary human skeletal muscle cells to altered proliferation and differentiation: roles of IGF-I and TNF α . *Exp. Cell. Res.* 294:223-235.
- Furling D., Marette A., Puymirat J. (1999): Insulin-like growth factor I circumvents defective insulin action in human myotonic dystrophy skeletal muscle cells. *Endocrinology* 140:4244-4250.
- Glass D.J. (2003): Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell Biol.* 5:87-90.
- Goodnight J.A., Mischak H., Mushinski J.F. (1994): Selective involvement of protein kinase C isozymes in differentiation and neoplastic transformation. *Adv. Cancer Res.* 64:159-209.
- Grounds M.D. (1991): Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Path. Res. Pract.* 187:1-22.
- Gschwendt M. (1999): Protein kinase C delta. *Eur. J. Biochem.* 259:555-564.
- Gutcher I., Webb P. R., Anderson N. G. (2003): The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:1061-1070.
- Haq S., Kilter H., Michael A., Tao J., O'Leary E., Sun X.M., Walters B., Bhattacharya K., Chen X., Cui L., Andreucci M., Rosenzweig A., Guerrero J.L., Patten R., Liao R., Molkentin J., Picard M., Bonventre J.V., Force T. (2003): Deletion of cytosolic phospholipase A2 promotes striated muscle growth. *Nat. Med.* 9:944-951.
- Haugk K.L., Wilson H.M., Swisshelm K., Quinn L.S. (2000): Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-related protein-1: an autocrine/paracrine factor that inhibits skeletal myoblast differentiation but permits proliferation in response to IGF. *Endocrinology* 141:100-110.
- Hathaway D. R. and Haeberle, J. R. (1983): Selective purification of the 20 kDa light chain of smooth muscle myosin. *Anal. Biochem.* 135:37-43.
- Healy C., Uwanogho D., Sharpe P.T. (1999): Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev. Dyn.* 215:69-78.
- Heinegard D. and Oldberg A. (1989): Structure and biology of cartilage and bone noncollagenous macromolecules. *Faseb. J.* 3:2042-2051.
- Henriksen E.J., Ritter L.S. (1993): Effect of insulin-like factors on glucose transport activity in unweighted rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 75:820-824.
- Hofmann J. (2001): Modulation of protein kinase C in antitumor treatment. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 142:1-96.
- Husmann I., Soulet L., Gautron J., Martelly I., Barritault D. (1996): Growth factors in skeletal muscle regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7:249-258.

- Hyatt J.P., Roy R.R., Baldwin K.M., Edgerton V.R. (2003): Nerve activity-independent regulation of skeletal muscle atrophy: role of MyoD and myogenin in satellite cells and myonuclei. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285:1161-73.
- Jacquemin V., Furling D., Bigot A., Butler-Brown G.S., Mouly V. (2004): IGF-1 induces human myotube hypertrophy by increasing cell recruitment. *Exp. Cell Res.* 299:148-158.
- Jaken S. (1996): Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8:118-173.
- Jennische E., Hansson H.A. (1987): Regenerating skeletal muscle cells express insulin-like growth factor I. *Acta Physiol Scand.* 130:327-332.
- Jennische E., Skottner A., Hansson H.A. (1987): Satellite cells express the trophic factor IGF-I in regenerating skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 129:9-15.
- Jesse T.L., LaChance R., Iademarco M.F., Dean D.C. (1998): Interferon regulatory factor-2 is a transcriptional activator in muscle where it regulates expression of vascular cell adhesion molecule-1. *J. Cell Biol.* 140:1265-1276.
- Jones S.W., Hill R.J., Krasney P.A., O'Conner B., Peirce N., Greenhaff P.L. (2004): Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J.* 18:1025-1027.
- Kelley R.O. and Fallon J.F. (1978): Identification and distribution of gap junctions in the mesoderm of developing chick limb bud. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 46:99-110.
- Koleva M., Kappler R., Vogler M., Herwig A., Fulda S., Hahn H. (2005): Pleiotropic effects of sonic hedgehog on muscle satellite cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:1863-1870.
- Kontaridis M.I., Liu X., Zhang L., Bennett A.M. (2002): Role of SHP-2 in fibroblast growth factor receptor-mediated suppression of myogenesis in C2C12 myoblasts. *Mol Cell Biol.* 22:3875-3891.
- Kramer I.M., in: Foreman J.C., Johansen T (Eds.) (1996): Textbook of receptor pharmacology, CRC Press 255-274.
- Kulyk W.M., Rodgers B.J., Greer K., Kosher R.A. (1989): Promotion of embryonic chick limb bud cartilage differentiation by transforming growth factor- β . *Dev. Biol.* 135:424-430.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lagord C., Carpentier G., Moraczewski J., Pons G., Climent F., Martelly I. (1993): Satellite cell myogenesis is highly stimulated by the kinase inhibitor iso-H7: comparison with HA1004 and staurosporine effects. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 191:928-936.
- Lázár J., Szabó T., Kovács L., Blumberg P. M., Bíró T. (2003): Distinct features of recombinant vanilloid receptor-1 expressed in various expression systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:2228-2240.
- Lee Y.S. and Chuong C.M. (1997): Activation of protein kinase A is a pivotal step involved in both BMP2- and cyclic AMP-induced chondrogenesis. *J. Cell. Physiol.* 170:153-65.
- Lefebvre V. and de Crombrughe B. (1998): Toward understanding Sox9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biol.* 16:529-540.
- Leitges M., Plomann M., Standaert M. L., Bandyopadhyay G., Sajan M. P., Kanoh Y. (2002): Knockout of PKC alpha enhances insulin signaling through PI3K. *Mol. Endocrinol.* 16:847-858.

- Lemonnier J., Ghayor C., Guicheux J., Caverzasio J. (2004): Protein kinase C-independent activation of protein kinase D is involved in BMP-2-induced activation of stress mitogen-activated protein kinases JNK and p38 and osteoblastic cell differentiation. *J Biol Chem.* 279:259-264.
- Leonard C., Fuld H.M., Frenz D.A., Downie S.A., Massague J., Newman S.A. (1991): Role of transforming growth factor β in chondrogenic pattern formation in the embryonic chick limb. *Dev. Biol.* 145:99-109.
- Li L., Lorenzo P.S., Bögi K., Blumberg P.M., Yuspa S.H. (1999): Protein kinase Cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol. Cell. Biol.* 19:8547-8558.
- Li L., Zhou J., James G., Heller-Harrison R., Czech M.P., Olson E.N. (1992): FGF inactivates myogenic helix-loop-helix proteins through phosphorylation of a conserved protein kinase C site in their DNA-binding domains. *Cell* 71:1181-1194.
- Li W., Jiang Y.X., Zhang J., Soon L., Flechner L., Kapoor V., Pierce J.H., Wang L.H. (1998): Protein kinase C-delta is an important signaling molecule in insulin-like growth factor I receptor-mediated cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* 18:5888-5898.
- Liu L.N., Dias P., Houghton P.J. (1998): Mutation of Thr115 in MyoD positively regulates function in murine fibroblasts and human rhabdomyosarcoma cells. *Cell. Growth. Diff.* 9:699-711.
- Lu Z., Hornia A., Jiang Y.W., Zang Q., Ohno S., Foster D.A. (1997): Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. *Mol. Cell. Biol.* 17:3418-3428.
- Gschwendt M., Muller H.J., Kielbassa K., Zang R., Kittstein W., Rincke G., Marks F. (1994): Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199:93-98.
- Marinissen M.J., Capiati D., de Boland A.R. (1998): 1,25(OH)₂-vitamin D₃ affects the subcellular distribution of protein kinase C isoenzymes in muscle cells. *Cell Signal.* 10:91-100.
- Martiny-Baron G., Kazanietz M.G., Mischak H., Blumberg P.M., Kochs G., Hug H., Marme D., Schachtele C. (1993): Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J. Biol. Chem.* 268:9194-9197.
- Massheimer V., de Boland A.R. (1992): Modulation of 1,25-dihydroxivitamin D₃-dependent Ca²⁺ uptake in skeletal muscle by protein kinase C. *Biochem. J.* 281:349-352.
- McCracken M.A., Miraglia L.J., McKay R.A., Strobl J.S. (2003): Protein kinase C delta is a prosurvival factor in human breast tumor cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 2:273-281.
- Meacci E., Vasta V., Donati C., Farnararo M., Bruni P. (1999): Receptor-mediated activation of phospholipase D by sphingosine 1-phosphate in skeletal muscle C2C12 cells. A role for protein kinase C. *FEBS Lett.* 457:184-188.
- Mermelstein C. dos S., Costa M.L., Chagas Filho C., Moura Neto V. (1996): Intermediate filament proteins in TPA-treated skeletal muscle cells in culture. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 17:199-206.
- Milasincic D.J., Calera M.R., Farmer S.R., Pilch P.F. (1996): Stimulation of C2C12 myoblast growth by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor 1 can occur via mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Mol. Cell. Biol.* 16:5964-5973.

- Miles K., Wagner M. (2000): Overexpression of nPKC theta is permissive for myogenic differentiation. *J. Cell. Biochem.* 79:71-79
- Mischak H., Goodnight J.A., Kolch W., Martiny-Baron G.M., Schaechtle C., Kazanietz M.G. (1993): Overexpression of protein kinase C- δ and - ϵ in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.* 268:6090-6096.
- Módis L. (1991): Organization of the Extracellular Matrix. A Polarization Microscopic Approach. CRC, Boca Raton.
- Murray N. R., Baumgardner G. P., Burns D. J., Fields A. P. (1993): Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. Evidence that beta II protein kinase C is required for proliferation. *J. Biol. Chem.* 268:15847-15853.
- Nishizuka Y. (1992): Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614.
- Nishizuka Y. (1988): The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature* 334:661-665.
- O'Brian C.A., Ward N.E., Stewart J.R., Chu F. (2001): Prospects for targeting protein kinase C isozymes in the therapy of drug-resistant cancer-an evolving story. *Cancer Metastasis Rev.* 20:95-100.
- Oberlender S.A. and Tuan R.S. (1994): Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development* 120:177-187.
- Oláh Z., Lehel C., Jakab G., Anderson W.B. (1994): A cloning and epsilon-epitope-tagging insert for the expression of polymerase chain reaction-generated cDNA fragments in *Escherichia coli* and mammalian cells. *Anal. Biochem.* 221:94-102.
- Ostrovsky O., Bengal E., Aronheim A. (2002): Induction of terminal differentiation by the c-Jun dimerization protein JDP2 in C2 myoblasts and rhabdomyosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* 277:40043-40054.
- Palmer R.M., Thompson M.G., Knott R.M., Campbell G.P., Thom A., Morrison K.S. (1997): Insulin and insulin-like growth factor-I responsiveness and signalling mechanisms in C2C12 satellite cells: effect of differentiation and fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1355:167-176.
- Papp H., Czifra G., Lazar J., Gonczi M., Csernoch L., Kovacs L., Biro T. (2003): Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol.* 12:811-824.
- Papp H., Czifra G., Bodó E., Lázár J., Kovács I., Aleksza M., Juhász I., Ács P., Sipka S., Kovács L., Blumberg P.M., Bíró T. (2004): Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:1095-1105.
- Perrini S., Henriksson J., Zierath J. R., Widegren U. (2004): Exercise-induced protein kinase C isoform-specific activation in human skeletal muscle. *Diabetes* 53:21-24.
- Pizette S. and Niswander L. (2000): BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev. Biol.* 219:237-249.
- Rabinovsky E.D., Gelir E., Gelir S., Lui H., Kattash M., DeMayo F.J., Shenaq S.M., Schwartz R.J. (2003): Targeted expression of IGF-1 transgene to skeletal muscle accelerates muscle and motor neuron regeneration. *FASEB J.* 17:53-55.

- Reardon K.A., Davis J., Kapsa R.M., Choong P., Byrne E. (2001): Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* 24:893-899.
- Rennecke J., Rehberger P.A., Furstenberger G., Johannes F.J., Stohr M., Marks F., Richter K.H. (1999): Protein kinase C μ expression correlates with enhanced keratinocyte proliferation in normal and neoplastic mouse epidermis and in cell culture. *Int. J. Cancer* 80:98–103.
- Ristich V.L., Bowman P.H., Dodd M.E., Bollag W.B. (2006): Protein kinase D distribution in normal human epidermis, basal cell carcinoma and psoriasis. *Br J Dermatol.* 154:586-93.
- Rhodes S.J., Konieczny S.F. (1989): Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* 3:2050-2061.
- Rose D.S.C., Maddox P.H., Brown D.C. (1994): Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J. Clin. Pathol.* 47:1010-1014.
- Rosenzweig T., Braiman L., Bak A., Alt A., Kuroki T., Sampson S. R. (2002): Differential effects of tumor necrosis factor-alpha on protein kinase C isoforms alpha and delta mediate inhibition of insulin receptor signaling. *Diabetes* 51:1921-1930.
- Sabourin L.A., Rudnicki M.A. (2000): The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet.* 57:16-25.
- Sabourin L.A., Girgis-Gabardo A., Seale P., Asakura A., Rudnicki M.A. (1999): Reduced differentiation potential of primary MyoD $^{-/-}$ myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J Cell Biol.* 144:631-643.
- Sandell L.J. and Adler P. (1999): Developmental patterns of cartilage. *Front Biosci.* 4:731-742.
- San Antonio J.D. and Tuan R.S. (1986): Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: stimulation by cations. *Dev. Biol.* 115:313-324.
- Schultz E., Lipton B.H. (1982): Skeletal muscle satellite cells: Changes in proliferation potential as a function of age. *Mech. Ageing Dev.* 20:377-383.
- Schultz E., McCormick K.M. (1994): Skeletal muscle satellite cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 123:213-257.
- Serra C., Federici M., Buongiorno A., Senni M.I., Morelli S., Segratella E. (2003): Transgenic mice with dominant negative PKC-theta in skeletal muscle: a new model of insulin resistance and obesity. *J. Cell Physiol.* 196:89-97.
- Shen S., Alt A., Wertheimer E., Gartsbein M., Kuroki T., Ohba M., Braiman L., Sampson S.R., Tennenbaum T. (2001): PKCdelta activation: a divergence point in the signaling of insulin and IGF-1-induced proliferation of skin keratinocytes. *Diabetes* 50:255-264.
- Song A., Wang Q., Goebel M.G., Harrington M.A. (1998): Phosphorylation of nuclear MyoD is required for its rapid degradation. *Mol. Cell. Biol.* 18:4994-4999.
- Sonn J.K. and Solursh M. (1993): Activity of protein kinase C during the differentiation of chick limb bud mesenchymal cells. *Differentiation* 53:155-162.
- Tanti J.F., Rochet N., Gremeaux T., Van Obberghen E., Le Marchand-Brustel Y. (1989): Insulin stimulated glucose transport in muscle. Evidence for a protein-kinase-C-dependent component which is unaltered in insulin-resistant mice. *Biochem. J.* 258:141-146.

- Tavella S., Bellese G., Castagnola P., Martin I., Piccini D., Doliana R., Colombatti A., Cancedda R., Tacchetti C. (1997): Regulated expression of fibronectin, laminin and related integrin receptors during the early chondrocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 110:2261-2270.
- Tidball J.G. (2005): Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. *J. Appl. Physiol.* 98:1900-1908.
- Tiffin N., Adi S., Stokoe D., Wu N.Y., Rosenthal S.M. (2004): Akt phosphorylation is not sufficient for insulin-like growth factor-stimulated myogenin expression but must be accompanied by down-regulation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase phosphorylation. *Endocrinology* 145:4991-4996.
- Toole B.P. (1972): Hyaluronate turnover during chondrogenesis in the developing chick limb and axial skeleton. *Dev. Biol.* 29:321-329.
- Toullec D., Pianetti P., Coste H., Bellevergue P., Grand-Perret T., Ajakane M., Baudet V.B., Boissin P., Boursier E., Loriolle F., Duhamel L., Charon D., Kirilovsky J. (1991): The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266:15771-15781.
- Tsakiridis T., Tsiani E., Lekas P., Bergman A., Cherepanov V., Whiteside C., Downey G.P. (2001): Insulin, insulin-like growth factor-I, and platelet-derived growth factor activate extracellular signal-regulated kinase by distinct pathways in muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288:205-211.
- van der Ven P.F.M., Schaart G., Jap P.H.K., Sengers R.C.A., Stadhouders A.M., Ramaekers F.C.S. (1992): Differentiation of human skeletal muscle cells in culture: maturation as indicated by titin and desmin striation. *Cell Tissue Res.* 270:189-198.
- Vlachopapadopoulou E., Zachwieja J.J., Gertner J.M., Manzione D., Bier D.M., Matthews D.E., Slonim E. (1995): Metabolic and clinical response to recombinant human insulin-like growth factor I in myotonic dystrophy--a clinical research center study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:3715-3723.
- Wagers A.J. and Conboy I.M. (2005): Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell* 122:659-667.
- Watanabe T., Ono Y., Taniyama Y., Hazama K., Igarashi K., Ogita K., Kikkawa U., Nishizuka Y. (1992): Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:10159-10163.
- Way K.J., Chou E., King G.L. (2000): Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol. Sci.* 21:181-187.
- Widelitz R.B., Jiang T.X., Murray B.A., Chuong C.M. (1993): Adhesion molecules in skeletogenesis: II. neural adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis. *J. Cell. Physiol.* 156:399-411.
- Wright W.E., Sasoon D.A., Lin V.K. (1989): Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56:607-617.
- Xie H. and Rothstein T.L. (1995): Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig. *J. Immunol.* 154: 1717-1723.
- Yablonka-Reuveni Z., Bowen-Pope D.F., Hartley R.S. (1990): Proliferation and differentiation of myoblasts: the role of platelet derived growth factor and the basement membrane. in "The Dynamic State of Muscle Fibers" Ed: Pette, D., 693-706.

Zorzano A., Kaliman P., Guma A., Palacin M. (2003): Intracellular signals involved in the effects of insulin-like growth factors and neuregulins on myofibre formation. *Cell. Signalling* 15:141-149.

Zhu Y.Y., Schwartz R.J., Crow M.T. (1991): Phorbol esters selectively downregulate contractile protein gene expression in terminally differentiated myotubes through transcriptional repression and message destabilization. *J. Cell Biol.* 115:745-754.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani az Élettani Intézet valamennyi munkatársának, akik munkájukkal, figyelmességükkel és odaadásukkal segítették tevékenységemet.

Köszönettel tartozom **Dr. Kovács Lászlónak**, az MTA Sejtélettani Kutatócsoport vezetőjének, valamint témavezetőmnek, **Dr. Bíró Tamásnak** segítségükért, tanácsaikért és a lehetőségért, amelyet a PhD. tézisek alapjául szolgáló tudományos kutatások elvégzéséhez biztosítottak.

Köszönetet mondok továbbá korábbi és jelenlegi közvetlen munkatársaimnak, **Dr. Lázár Józsefnek, Dr. Papp Helgának, Dr. Marincsák Ritának, Tóth István Baláznak** és **Vargáné Kiss Ibolyának** határtalan türelmükért, megbízhatóságukért és a mindennapok során nyújtott segítségükért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a hazai és külföldi kollaborációs partnerek segítségét, együttműködését.

KÖZLEMÉNYEK

A téziseket megalapozó in extenso tudományos közlemények:

- 1) *Czifra G., Tóth I.B., Marincsák R., Juhász I., Kovács I., Ács P., Kovács L., Blumberg P.M., and Bíró T.* (2006): Insulin-like growth factor-I-coupled mitogenic signaling in primary cultured human skeletal muscle cells and in C2C12 myoblasts. A central role of protein kinase C δ . *Cell. Signal. Epub.* **IF: 4.741**
- 2) *Czifra G., Szöllősi A., Juhász I., Kiss A., Erdődi F., Varga A., Kovács I., Ács P., Kovács L., Blumberg P.M., and Bíró T.* (2006): Protein kinase C isoforms differentially regulate proliferation, differentiation, and tumorigenicity of skeletal muscle cells. *Exp. Cell. Res.* (közlésre beküldve)
- 3) *Zákány R., Szűcs K., Bakó É., Felszeghy Sz., Czifra G., Bíró T., Módis L., and Gergely P.* (2002): Protein phosphatase 2A is involved in the regulation of protein kinase A signalling pathway during in vitro chondrogenesis. *Exp. Cell. Res.* **275:1-8 IF: 4.007**

További in extenso tudományos közlemények:

- 1) *Boczán J., Bíró T., Czifra G., Lázár J., Papp H., Bárdos H., Ádány R., Mechler F., and Kovács L.* (2001): Phorbol ester treatment inhibits proliferation and differentiation of cultured human skeletal muscle satellite cells by differentially acting on protein kinase C isoforms. *Acta Neuropathol.* **102:55-62 IF: 2.503**
- 2) *Papp H., Czifra G., Lázár J., Boczán J., Gönczi M., Csernoch L., Kovács L., and Bíró T.* (2003): Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation of HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **12:811-824 IF: 1.707**
- 3) *Varga E., Nagy N., Lázár J., Czifra G., Bak I., Bíró T., and Tótsaki Á.* (2004): Inhibition of ischemia/reperfusion-induced damage by dexamethasone in isolated working rat hearts: the role of cytochrome c release. *Life Sci.* **75:2411-2423 IF: 2.158**
- 4) *Varga A., Czifra G., Tállai B., Németh T., Kovács I., Kovács L., and Bíró T.* (2004): Tumor grade-dependent alterations in the protein kinase C isoform pattern in urinary bladder carcinomas. *Eur Urol.* **46:462-465 IF: 2.651**
- 5) *Papp H., Czifra G., Bodó E., Lázár J., Kovács I., Aleksza M., Juhász I., Ács P., Sipka S., Kovács L., Blumberg P.M., and Bíró T.* (2004): Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* **61:1095-1105 IF: 4.812**
- 6) *Zákány R., Szigyártó Z., Matta Cs., Juhász T., Csontos Cs., Szűcs K., Czifra G., Bíró T., Módis L., and Gergely P.* (2005): Hydrogen peroxide inhibits formation of cartilage in chicken micromass cultures and decreases the activity of calcineurin: implication of ERK1/2 and Sox9 pathways. *Exp Cell Res.* **305:190-199. IF: 4.007**
- 7) *Kovács I., Pocsai K., Czifra G., Sarkadi L., Szűcs G., Nemes Z., and Rusznák Z.* (2005): TASK-3 immunoreactivity shows differential distribution in the human gastrointestinal tract. *Virchows Arch.* **446:402-410 IF: 2.227**
- 8) *Bodó E., Bíró T., Telek A., Czifra G., Griger Z., Tóth I.B., Mescalchin A., Ito T., Bettermann A., Kovács L. and Paus R.* (2005): A “hot” new twist to hair biology – involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am. J. Pathol.* **166:985-998 IF: 6.441**

- 9) Szabó G., Szentandrassy N., Biró T., Tóth I.B., Czifra G., Magyar J., Bányász T., Varró A., Kovács L., and Nánási PP. (2005): Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left-ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflügers Arch.* **450**:307-316 **IF: 2.260**

A közlemények összesített impakt faktora (a 2004. évi JCR alapján): 37,514

Idézhető kivonatok:

- 1) Biró T., Papp H., Lázár J., Czifra G., and Kovács L. (2000): Distinct roles of protein kinase C isozymes in regulating proliferation and differentiation of HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **115(3)**:548
- 2) Biró T., Papp H., Czifra G., Lázár J., and Kovács L. (2001): Endogenous activation of protein kinase C regulates proliferation and differentiation in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **117(2)**:502
- 3) Biró T., Papp H., Bodó E., Lázár J., Czifra G., and Kovács L. (2002): Modification of protein kinase C alters proliferation and differentiation of immortalized human keratinocytes. *Rev. Oncol.* **4(1)**:82
- 4) Lázár J., Czifra G., Papp H., Marincsák R., Papp L., Kovács L., and Biró T. (2002): Protein kinase C regulates the sensitivity of recombinant rat vanilloid receptor to capsaicin. *Acta Physiol. Hung.* **89**:13
- 5) Papp H., Bodó E., Lázár J., Czifra G., Kovács L., and Biró T. (2002): Effects of pharmacological modification of protein kinase C on proliferation and differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Acta Physiol. Hung.* **89**:348
- 6) Czifra G., Papp H., Lázár J., Kern A., Kovács L., and Biró T. (2002): PKC δ mediates the growth promoting effect of IGF-I on cultured human skeletal muscle cells. *Acta Physiol. Hung.* **89**:278
- 7) Biró T., Papp H., Bodó E., Lázár J., Czifra G., Kovács I., Gáspár K., Juhász I., and Kovács L. (2003): Opposite roles of protein kinase C isoforms in regulating human HaCaT keratinocyte proliferation, differentiation, and tumor genesis. *J. Invest. Dermatol.* **121(1)**:218, No. 195
- 8) Biró T., Papp H., Bodó E., Lázár J., Czifra G., Kovács I., Gáspár K., Juhász I., and Kovács L. (2003): Opposite roles of protein kinase C isoforms in regulating human HaCaT keratinocyte proliferation, differentiation, and tumor genesis. *J. Dermatol. Sci.* **32(2)**:169, No. 195
- 9) Czifra G., Lázár J., Kern A., Juhász I., Kovács I., Kovács L., Blumberg P.M., and Biró T. (2003): PKC δ mediates the growth promoting effect of IGF-I on cultured human skeletal muscle cells. *Neuromuscular Disord.* **13(7-8)**:621-622
- 10) Bodó E., Géczy T., Lázár J., Kovács I., Czifra G., Bettermann A., Kovács L., Paus R., and Biró T. (2003): The cutaneous vanilloid receptor 1 expression suggests multiple functions beyond sensory nerve signaling. *J. Invest. Dermatol.* **121(1)**:218, No. 823
- 11) Bodó E., Géczy T., Lázár J., Kovács I., Czifra G., Bettermann A., Kovács L., Paus R., and Biró T. (2003): The cutaneous vanilloid receptor 1 expression suggests multiple functions beyond sensory nerve signaling. *J. Dermatol. Sci.* **32**:169, No. 823
- 12) Biró T., Czifra G., Bodó E., Lázár J., Tóth I.B., Papp H., Kovács I., Juhász I., and Kovács L. (2004): Cell and isoform specific roles of protein kinase C isoenzymes in regulating in vitro and in vivo proliferation of keratinocytes and skeletal muscle cells. *J. Invest. Dermatol.* **122(3)**:A21

- 13) Szegedi A., **Czifra G.**, Schmidt E., Hunyadi J., and Bíró T. (2004): Protein kinase C isoforms have different effect on the expression of desmoglein 1, 3 and P-cadherin in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **123(2)**:011
- 14) Bodó E., Bíró T., Telek A., **Czifra G.**, Griger Z., Tóth I.B., Lázár J., Mescalchin A., Ito T., Bettermann A., Pertile P., Kovács L., and Paus R. (2004): A “hot twist” to hair biology – Involvement of vanilloid receptor-1 (VR1) signalling in human hair growth control. *Exp. Dermatol.* **13(9)**:581
- 15) Matta C., Juhász T., Szigyártó Z., Szűcs K., **Czifra G.**, Módis L., Gergely P., Zákány R. (2004): Protein kinase C isoenzymes regulates chondrogenesis of mesenchymes. *Tissue Antigens* **64(4)**:435-435
- 16) Juhász T., Szigyártó Z., Matta C., Szűcs K., **Czifra G.**, Bakó É., Zákány R., Módis L., Gergely P. (2004): The role of calcineurin in the inhibitory effect of oxidative stress on cartilage formation *Tissue Antigens* **64(4)**:435-436
- 17) Tóth I.B., Géczy T., **Czifra G.**, Seltmann H., Paus R., Kovács L., Zouboulis C.C., Bíró T. (2005): The vanilloid receptor 1 (TRPV1) is expressed and functionally active on human SZ95 sebocytes. *J. Invest Dermatol.* **124(4)**:A68-A68 405 Suppl. S
- 18) Juhász T., Matta C., Szigyártó Z., **Czifra G.**, Bíró T., Gergely P., Módis L., Zákány R. (2005): Calcineurin regulates chondrogenesis via the modulation of ERK1/2 activity. *FEBS J.* **272**:307-307 Suppl. 1
- 19) Matta C., Juhász T., Szigyártó Z., **Czifra G.**, Bíró T., Gergely P., Módis L., Zákány R. (2005): The role of protein kinase C isoenzymes chondrogenesis of micro-mass cell cultures. *FEBS J.* **272**:310-310 Suppl. 1
- 20) Rusznák Z., Kovács I., Pocsai K., **Czifra G.**, Sarkadi L., Nemes Z., Szűcs G (2005): Distribution of TASK-3 channels in healthy and pathological human tissue samples *FASEB J.* **19(5)**: A1160-A1160 Part 2 Suppl. S