

***A PROTEIN KINÁZ C IZOENZIMEK SZEREPE HUMÁN
HaCaT KERATINOCYTÁK SEJTMŰKÖDÉSEINEK
SZABÁLYOZÁSÁBAN***

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

Írta:
Papp Helga

Témavezető:
Dr. Bíró Tamás, egyetemi docens



TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés	3. oldal
A jelátvitel, a proliferáció és a differenciálódás szabályozása	3. oldal
A keratinocyták	4. oldal
A HaCaT keratinocyták	6. oldal
A protein kináz C izoenzimek	6. oldal
A PKC izoenzimek és keratinocyták kapcsolata	10. oldal
Problémafelvetés és célkitűzések	12. oldal
Anyagok és módszerek	14. oldal
Sejttenyésztés	14. oldal
PKC vektorok készítése	14. oldal
Rekombináns PKC overexpresszáló keratinocyták készítése	15. oldal
Az élő sejtek számának meghatározása	15. oldal
A sejtproliferáció vizsgálata	16. oldal
Antitestek	18. oldal
Western (immuno)blot	18. oldal
Immuncitokémia	19. oldal
$[Ca^{2+}]_i$ meghatározása	20. oldal
A rekombináns PKC izoenzimek aktivitásának meghatározása (kinase assay)	21. oldal
Az apoptózis meghatározása	21. oldal
A tumorigenezis vizsgálata SCID egerekben	22. oldal
Hisztológia és immunohisztokémia	22. oldal
Eredmények	24. oldal
A HaCaT keratinocyták jellegzetes PKC izoenzimintázata változik a sejtek proliferációja és differenciálódása során	24. oldal
A differenciálódási markerek kifejeződése, valamint a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ változik HaCaT keratinocyták proliferációja és differenciálódása során	27. oldal
A PMA gátolja a HaCaT sejtek proliferációját, megemeli az $[Ca^{2+}]_i$ -t és terminális differenciálódást indukál	28. oldal
A PMA proliferációt és differenciálódást befolyásoló hatását eltérő PKC izoformák mediálhatják HaCaT sejtekben	32. oldal
Különböző PKC inhibitorok hatása HaCaT keratinocyták proliferációjára és differenciálódására	35. oldal
Bizonyos PKC izoenzimek rekombináns overexpressziója	38. oldal
A PKC izoenzimek rekombináns overexpressziójának hatása HaCaT sejtek morfológiájára	41. oldal
A PKC izoenzimek rekombináns overexpressziójának hatása HaCaT sejtek proliferációjára és differenciálódására	42. oldal
A PKC izoenzimek rekombináns overexpressziójának hatása HaCaT sejtek apoptózisára	44. oldal
Az PKC izoformák overexpressziójának hatása a tumorigenezisre SCID egerekben	46. oldal
Megbeszélés	48. oldal
A HaCaT keratinocyták PKC izoenzimintázata, valamint annak változása a sejtek proliferációja és differenciálódása során	48. oldal
A PKC rendszer aktiválása PMA-val terminális differenciálódást indukál	50. oldal
A PKC izoenzimek specifikus szerepe a proliferáció, a differenciálódás, az apoptózis, valamint a tumorigenezis szabályozásában HaCaT sejtekben	52. oldal
Összefoglalás	57. oldal
Irodalomjegyzék	58. oldal
Köszönetnyilvánítása	67. oldal
Közlemények	68. oldal

BEVEZETÉS

A jelátvitel, a proliferáció és a differenciálódás szabályozása

A sejtfolyamatok szabályozása a különféle jelátviteli mechanizmusokon keresztül történik (Hunter, 2000). Az extracelluláris jelek átalakítása intracelluláris sejtválaszokká általában több lépcsőben valósul meg. Ez magában foglalja az agonista kölcsönhatását a receptorral, transzmembrán fehérjék és membrán asszociált enzimek aktiválását, másodlagos hírvivő molekulák (cAMP, cGMP, kalciumkoncentráció, IP₃, foszfolipidek) képződését és diffúzióját a különböző sejtkompartmentekhez, valamint enzimek közvetlen vagy közvetett módon történő aktiválását.

A jelátviteli folyamatok során aktiválódó intracelluláris enzimek közé tartoznak a fehérjék reverzibilis foszforilációját katalizáló protein kinázok. Ezen enzimek a fehérjék szeril (Ser), treonil (Thr) és tirozil (Tyr) oldalláncain lévő hidroxilcsoportba építik be a nukleozid trifoszfátok (leggyakrabban ATP) terminális foszfátcsoportját (Hunter, 2000). A fehérje foszforiláció az eukarióta sejtek csaknem minden folyamatában szabályozó szerepet játszik, azaz számos fehérje foszforilációs szintjének kialakításában résztvevő molekulák a metabolikus folyamatokat (zsír, szénhidrát és fehérje lebontás és szintézis), a sejtciklust, a proliferációt, a differenciálódást, a sejtek alakváltozását, kontraktilitását és migrációját, valamint csatorna, iontranszport és receptor fehérjék működését is szabályozzák.

A sejtek proliferációja és differenciálódása a szövetek fejlődésének, növekedésének, valamint a természetes és sérülést követő regenerációnak kulcslépése (Owa és mtsai, 2001, Cho-Chung és mtsai, 2002). A folyamatok komplex szabályozásában – többek között – a különféle protein kináz rendszerek, valamint az intracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) változása játszik meghatározó szerepet. Bebizonyosodott, hogy a sejtfehérjék foszforilációs szintjének kóros megváltozása

(pl. a fehérjék “túlfoszforiláltsága”), illetve az intracelluláris ionkoncentrációk patológiás módosulásai elsősorban a sejtek proliferációs és differenciálódási folyamataiban eredményeznek mélyreható változásokat, melynek egyik legsúlyosabb következménye a daganatos transzformáció (MacKintosh és MacKintosh, 1994; Hunter, 2000). Ismervén a daganatos betegségek incidenciájának és főként mortalitásának riasztóan emelkedő adatait nem meglepő, hogy ezen jelenségek az intracelluláris jelátviteli folyamatok aktivitását szabályozó effektor molekulák kutatására irányították a figyelmet.

A keratinocyták

A proliferáció, a differenciálódás, az apoptózis, valamint a tumorgenezis és progresszió egyik leggyakrabban tanulmányozott modellsejtei a keratinocyták, melyek a bőr legkülső rétegének, az epidermisnek a létrehozásáért és fenntartásáért felelős sejtek. Feladatuk a külső környezet és a test belső része között egy olyan fiziko-kémiai barrier kialakítása, amely védelmet nyújt a külvilág káros hatásaival szemben. A keratinocyták ezen fiziko-kémiai barrier állandóságának biztosítása érdekében folyamatosan és fokozottan proliferálnak, majd differenciálódnak és kialakítják az epidermis öt rétegét (Fuchs, 1990). Az alapi rétegben (stratum basale) a hengeres őssejtek proliferációja folyik, így az itt elhelyezkedő sejtek a különféle szabályzó ágensek fő támadáspontja. Ezen rétegből felfelé tolódva beindul az apoptózis folyamata és különböző citoszeletális fehérjék halmozódnak fel a sejtekben. Amíg a stratum basale keratinocytái átmeneti filamentumként keratin (K) 5-öt és 14-et tartalmaznak, addig a stratum spinosum-ban ezek K1 és 10-re cserélődnek ki (Schweizer és Winter, 1983). A felsőbb rétegekben (str. granulosum) a differenciálódás további folyamatában speciális proteinek, differenciálódási markerek

jelennek meg, mint például a K17, filaggrin (Harding és Scott, 1983), loricrin és involucrin (Watt, 1983; Mehrel és mtsai, 1990). Ezeket a proteineket a keratinocyta specifikus transzglutamináz-1 (Schroder és mtsai, 1992) kapcsolja össze γ -glutamil- ϵ -lizin izopeptid kötéseket létrehozva, így a terminálisan differenciálódó keratinocyták plazmamembránja alatt ún. cornified envelop alakul ki (Thacher és Rice, 1985). Ez a képződmény az, ami kémiaiilag ellenállóvá teszi a felső rétegek (stratum lucidum és stratum corneum) elhalt sejtjeit. Kimutatták, hogy amennyiben a proliferációs mechanizmusok szabályozásában vagy a mindenkori differenciáltsági fokban változás következik be, úgy hyperproliferatív transzformáció, illetve daganatos elváltozások alakulhatnak ki (Goodnight és mtsai, 1994).

A keratinocytákban megtalálható a jelátviteli folyamatok legtöbbjének receptora, így azok az ezirányú vizsgálatok ideális célsejtjeinek tekinthetők (Mitev és Miteva, 1999). A keratinocyták proliferációját és differenciálódását, valamint az általuk beindított mediátor-termelő és immunológiai folyamatok (Bos és Kapsenberg, 1993) lépéseit a szomszédos sejtek által termelt citokinek (interleukinek, kolónia stimuláló faktorok, tumor necrosis faktor- α stb.) és növekedési faktorok (NGF, HGF, PDGF, stb.) befolyásolhatják (Bos és Kapsenberg, 1993; Mitev és Miteva, 1999). Ezek az anyagok speciális receptoraikhoz kötődve aktiválhatják például a tirozin kináz útvonalat, továbbá befolyásolhatják a szerin/treonin kinázok (protein kináz A és C), valamint a foszfolipázok (foszfolipáz A₂, -C és -D) működését is (Decker, 2003). Mivel e jelátviteli útvonalak egymással bizonyos pontokon összekapcsolódva bonyolult hálózatokat alkotnak, ezért a további kutatások egyik legfontosabb célja ezen kapcsolatok elemeinek pontos feltérképezése.

A HaCaT keratinocyta

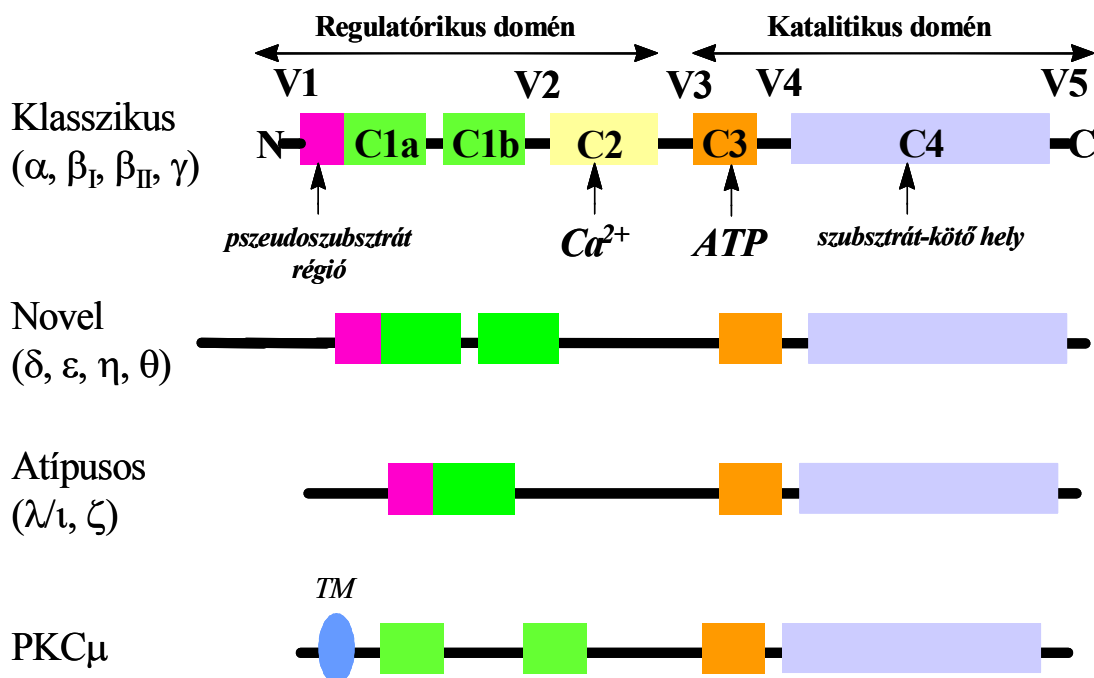
A humán dermatológiai kutatások során gyakran felmerül az a probléma, hogy a normál humán epidermális keratinocyta (NHEK) nehéz hosszú ideig tenyészteni és passzálni, mivel a beinduló apoptózis folyamán elhalnak. Ezért a kezdeti kutatások célja olyan sejtvonal megalkotása volt, ami *in vitro* jól modellezi a NHEK-kat, illetve azok sejtfolyamatait, ugyanakkor hosszú távon is fenntartható és tenyészthető. Erre az egyik alkalmas sejttípus a HaCaT sejtvonal, melyet egy melanómában szenvedő férfi beteg nem infiltrálódott bőrterületéből izoláltak (Boukamp és mtsai, 1988; 1997). A sejteket alacsony extracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_e$) mellett magasabb hőmérsékleten tartották, mely körülmények hatására azok spontán immortalizálódtak. A sejtek bizonyítottan nem szenvedtek daganatos transzformációt, ugyanakkor *in vitro* proliferációs, valamint *in vivo* tumorgenikus potenciáljuk megnövekedett differenciálódási képességük rovására (Breitkreutz és mtsai, 1991; Fusenig és Boukamp, 1998).

Ezen változások ellenére a HaCaT sejtek számos, a NHEK-ra jellemző működési sajátosságot mutatnak (sejtfelszíni adhéziós molekulák, MHC és komplement receptorok expressziója, citokinek termelése), így manapság a NHEK egyik legjobb modelljének tekinthetők olyan keratinocyta-specifikus folyamatok, mint a proliferáció, immortalizáció, transzformáció, valamint a tumorprogresszió vonatkozásában (Fusenig és Boukamp, 1998; Schoop és mtsai, 1999).

A protein kináz C izoenzimek

A protein kináz C (PKC) izoenzimcsalád a szerin/treonin kinázok egyik jelentős képviselője. A mai napig legalább 11 különböző PKC izoenzimet azonosítottak (Nishizuka, 1988, 1992; Jaken, 1996), melyeket szerkezeti jellegzetességeik (1. ábra),

valamint aktivációs mechanizmusaik alapján 4 nagyobb csoportba sorolhatunk. A “klasszikus” csoportba (cPKC) 4 izoenzim tartozik: a PKC α , β_I , β_{II} és γ . Ezen izoenzimek közös jellemzője, hogy kalcium- és diacil-glicerol- (DAG), illetve annak exogén megfelelőjeként működő forbol-észter-dependensek, vagyis aktiválásukhoz ezen anyagokat kofaktorként igénylik. A második csoportba a nem kalcium-dependens PKC δ , ϵ , η és θ izoenzimek tartoznak, melyeket “novel” PKC-nek (nPKC) is szokás nevezni. Közös jellemzőjük, hogy kalcium nélkül, forbol-észterekkel (illetve DAG-lal) is maximálisan aktiválhatók. A harmadik csoportba az “atípusos” izoenzimek sorolhatók (aPKC), melyek közé a PKC ζ és λ/ι izoenzimek tartoznak; lényeges tulajdonságuk, hogy aktiválódásukhoz sem kalciumot, sem forbol-észtert nem igényelnek. Végezetül külön csoportba sorolható a PKC μ , mely mind aktivációját, mind struktúrális jegyeit tekintve rendhagyó izoformának tekinthető.



1. ábra A PKC izoenzimcsalád 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 szabaddá válik a foszforilálendő szubsztrát számára;
- ezután az enzim a C1 doménen 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, transzkripciósfaktorok, 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 hoznak létre (Nishizuka, 1988 és 1992; Ohno és mtsai, 1991; Baier és mtsai, 1993; Goodnight és mtsai, 1994). A PKC α , δ , ϵ és ζ előfordulása ubikviternek tekinthető, ugyanakkor a PKC γ , η és θ expressziója túlnyomórészt csak bizonyos szövetekre korlátozódik; a PKC γ szinte kizárólag az agyban található meg, a PKC η leginkább keratinocytákban és T-sejtekben fordul elő, míg a PKC θ – habár megtalálható a testisben és egyes daganatokban – a harántcsíkolt izom legjellemzőbb izoenzimje (Boczán és mtsai, 2000, 2001).

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) szintézisében, ingerlékeny szövetek elektrofiziológiai jellegzetességeinek (csatorna-aktivitás, akciós potenciál kódolás, izomkontrakció) optimális kialakításában, a központi idegrendszer integritásának és működésének fenntartásában, a szervezet védekező mechanizmusában (fagocitózis, immunglobulin termelés), stb. (összefoglalva Decker, 2003).

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 különbözik(het) 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 PKC α felelős a forbol-észter által indukált cytostasis kialakulásáért, míg a PKC β_{II} ezen sejtek proliferációjában játszik szerepet (Murray és mtsai, 1993). Bebizonyosodott emellett, hogy az RBL-2H3 basophil leukémia sejtekben a PKC α és ϵ izoenzimek legkifejezettebben a foszfolipáz-C aktivitását gátolták (Ozawa és mtsai, 1993), ugyanakkor a PKC β és ϵ izoenzimek a hízósejtek nagy affinitású IgE receptora által mediált *c-fos* és *c-jun* expressziója kialakításában vettek részt (Razin és mtsai, 1994). Kimutatták azt is, hogy míg NIH 3T3 fibroblasztok esetén a PKC δ megállította a sejtek proliferációját, addig, ezzel szemben, a PKC ϵ fokozta azt (Cacace és mtsai,

1993; Mischak és mtsai, 1993). 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 keratinocyták kapcsolata

A PKC izoenzimek szabályozó szerepét keratinocyták sejtfolymatainak vonatkozásában is leírták (Mitev és Miteva, 1999). Az elsősorban egér keratinocytákon folyó vizsgálatok megállapították (Dlugosz és Yuspa, 1993, 1994), hogy a különböző sejtfolymatokban több izoenzimnek van/lehet szerepe (PKC α , δ , ϵ , η , ζ). Bebizonyították emellett azt is, hogy a PKC rendszer szerepet játszik a sejtek proliferációs és differenciálódási programjának szabályozásában. Például az $[Ca^{2+}]_e$ megemeléssel a sejtek differenciálódtak, amely folyamat végbemeneteléhez elengedhetetlenül szükséges volt a PKC aktiválódása (Dlugosz és Yuspa, 1993, 1994; Denning és mtsai, 1995). Kiderült továbbá az is, hogy ezen folyamat szabályozásában a PKC α izoenzim játszik meghatározó szerepet (Denning és mtsai, 1995, Lee és mtsai, 1997).

A NHEK-ről sokkal kevesebb információval rendelkezünk; habár az előbb említett izoenzimeket (PKC α , δ , ϵ , η , ζ) itt is kimutatták (Lee és mtsai, 1998), más izoenzimek jelenlétét sem vethetjük el (PKC β és μ) (Fisher és mtsai, 1993; Rennecke és mtsai, 1996). Bebizonyosodott, hogy a PKC izoformák kifejeződése és szubcelluláris lokalizációja jeletősen megváltozott a $[Ca^{2+}]_e$ megemelése, illetve a nagy sejtdenzitás (konfluencia) által indukált differenciálódási program beindulásával párhuzamosan (Denning és mtsai, 1995; Lee és mtsai, 1998).

Egér és humán keratinocytákban vizsgálták emellett a tumor-promóter forbol-észterek hatását, amelyek bőrbe adagolva előzetes iniciáció után tumort hoztak létre

(Paramio és Jorcano, 1997; Karen és mtsai, 1999). *In vitro* ugyanakkor (előzetes iniciáció nélkül) mindkét sejttípusban azt tapasztalták, hogy a PMA gátolta a proliferációt, csökkentette a korai, ugyanakkor növelte a késői differenciálódási markerek expresszióját, ezáltal a terminális differenciálódás felé irányította a sejteket (Dlugosz és Yuspa, 1993, 1994; Denning és mtsai, 1995; Lee és mtsai, 1998). Kimutatták továbbá, hogy a szelektív PKC gátló GF109203X és Ro-31-7549 – a proliferáció serkentése mellett (Bollag és mtsai, 1993; Le Panse és mtsai, 1994) – megváltoztatta a differenciálódási markerek megjelenését (Lee és mtsai, 1998) mind egér és NHEK-ban, rámutatva a PKC rendszer központi, endogén szerepére a keratinocyták fenti folyamatainak szabályozásában.

Hasonlóan az egér keratinocytákhoz, az utóbbi években a NHEK folyamatainak szabályozásában is beszámoltak számos PKC izoforma specifikus szerepéről. Kimutatták, a PKC α itt is központi szerepet játszik a terminális differenciálódási program beindításában és végrehajtásában (Murakami és mtsai, 1996; Lee és mtsai, 1998; Neill és mtsai, 2003). Adenovirus vektorok alkalmazásakor bebizonyosodott az is, hogy a PKC δ és η izoformák overexpressziója szintén meggátolta a sejtek proliferációját, és differenciálódást váltott ki (Ohba és mtsai, 1998; Li és mtsai, 1999). Bebizonyosodott végezetül, hogy a fenti izoformák transzgenikus jelenléte, ellentétben a tumorgenezist fokozó PKC ϵ kifejeződésével, jelentősen csökkentette az egér bőrben kifejlődő daganatok növekedési ütemét (Jansen és mtsai, 2001).

PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az egér és humán keratinocyttal ellentétben meglehetősen szegényes adatokkal rendelkezünk a PKC izoenzimek szabályozó szerepéről HaCaT keratinocyttal esetében. Az igen kisszámú korábbi kísérlet során kimutatták, hogy a PKC rendszer (bizonyos izoformáinak) gátlása megváltoztatta a sejtek morfológiáját és az egyes differenciálódási markerek megjelenését (Hegemann és mtsai, 1992; Dietrich és mtsai, 2001). Bebizonyosodott emellett az is, hogy a PKC δ szintjében bekövetkező változás összefüggésben áll(hat) a HaCaT sejtek (ras-indukált) tumoros átalakulásával (Geiges és mtsai, 1995).

Ezen eredmények ugyanakkor nem szolgáltatnak közvetlen bizonyítékot a PKC rendszer szabályozó szerepéről a HaCaT keratinocyttal sejtfolyamataiban, valamint hiányzott a PKC izoenzimek izoforma-specifikus funkcióinak pontos feltérképezése is. Ennek megfelelően a tézisekben az alábbi célkitűzések kísérletes megvalósítását hajtottuk végre:

1. Elsődleges célunk volt a HaCaT keratinocyttal PKC izoenzimintázátának meghatározása. Vizsgáltuk a PKC izoformák kifejeződését, megjelenését, valamint az abban megfigyelhető esetleges változásokat a HaCaT sejtek proliferációjának és (a nagy sejtdenzitás által kiváltott) differenciálódásának előrehaladtával.
2. Elemeztük emellett egy általános PKC aktivátor, a forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) hatását a HaCaT keratinocyttal proliferációjára és differenciálódására. Azonosítani kívántuk emellett, hogy a PMA celluláris hatásának kifejlődésében mely PKC izoenzimek vesznek részt.

3. Az egyes PKC izoenzimek szerepének tisztázására különféle szelektív és specifikus gátlószereket alkalmaztunk, majd vizsgáltuk az alkalmazott anyagok hatását a sejtprolifерációra és differenciálódásra.
4. Rekombináns technikákkal bizonyos PKC izoformákat stabilan overexpresszáló HaCaT keratinocytákat készítettünk, majd ezen molekuláris biológiailag megváltoztatott sejteken *in vitro* elemeztük az proliferáció, differenciálódás és apoptózis folyamatait, valamint a morfológiai jellegzetességeket.
5. Végezetül *in vivo* kísérleteinkben a rekombináns módszerekkel megváltoztatott PKC overexpresszor HaCaT sejteket immunhiányos (Severe Combined Immuno Deficiency, SCID) egerekbe injektáltuk, majd a kifejlődött daganatokat elemezve vizsgáltuk a PKC izoenzimek szerepét a tumorgenezis folyamatainak szabályozásában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

Kísérleteinkhez immortalizált humán HaCaT keratinocita sejtvonalat használtunk, mely Norbert E. Fusenig professzortól származott (Division of Differentiation and Carcinogenesis, German Cancer Research Center, Heidelberg, Németország). A sejteket termosztált körülmények között, 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú atmoszférában, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) tápoldatban tenyésztettük, amely 10 % embrionális borjú szérumot (FCS) (Sebak, Aidenbach, Németország), 2 mM L-glutamint, valamint a bakteriális és gombafertőzés elkerülése végett 50 U/ml penicillint, 50 µg/ml streptomicint és 1,25 µg/ml fungizont (Biogal, Debrecen, Magyarország) tartalmazott.

PKC vektorok készítése

A PKC vektorokat a korábban leírtak szerint állítottuk elő (Ács és mtsai, 1997a, 1997b), melynek során a PKC α , β , δ és ϵ cDNS szekvenciáit egy metallothionein promoter-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 HaCaT sejtekben overexpresszált, lásd alább) 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 fiziológiás működésére) nincs hatással.

Rekombináns PKC overexpresszáló keratinocyták készítése

A HaCaT sejteket 6-lyukú tenyésztőedényekbe szélesztettük, majd a megfelelő konfluencia (60-70 %) elérése után vagy az üres p ϵ MTH vektorral (kontroll sejtek esetében), vagy a PKC α , β , δ , illetve ϵ cDNS-ét kódoló vektorok egyikével transzfektáltuk őket (Ács és mtsai, 1997a, 1997b). A transzfekciót, 2-4 μ g cDNS-t felhasználva, Lipofectamine anionos detergenssel (Invitrogen, Paisley, UK) hajtottuk végre szérummentes DMEM oldatban, a gyártó által javasolt protokollt követve. A transzfektált sejteket ezután szérum-tartalmú, 750 μ g/ml G418 antibiotikummal (geneticin, Invitrogen) kiegészített DMEM oldatban 12-18 napig szelektáltuk, majd egyedi kolóniákat (klónok) izoláltunk. A klónokat ezután 500 μ g/ml G418-tartalmú DMEM oldatban tenyésztettük folyamatosan, majd Western blot segítségével ellenőriztük a stabil transzfekció és overexpresszió hatékonyságát (lásd alább, valamint a 9. ábrán). Ennek során a rekombináns technikákkal overexpresszált izoformák azon tulajdonságát használtuk ki, hogy az összes rekombináns exogén forma (a p ϵ MTH 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), így a sikeresen transzfektált klónok esetében dupla sávokat detektálhattunk. Kísérleteinket transzfektált sejtek „pool”-jain hajtottuk végre, ugyanakkor eredményeinket minden izoforma esetében legalább 3 klón hasonló vizsgálatával ellenőriztük.

Az élő sejtek számának meghatározása

Az élő sejtek számának meghatározását kolorimetriás MTT assay alkalmazásával végeztük. A módszer azon alapul, hogy az élő sejtek mitokondriális

dehidrogenáz enzimje az MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólium-bromid) (Sigma) tetrazolium gyűrűjét oldhatatlan színes formazánná alakítja, melynek mennyisége kolorimetriásan meghatározható. A HaCaT sejteket 96 lyukú edényben 50 µl RPMI 1640 (Sigma) tápoldatban 5000 sejt/well denzitásban szélesztettük. A sejteket a kitapadást követően (kb. 3 óra elteltével) kezeltük az egyes anyagok különböző koncentrációjával (0.1-1000 nM PMA, GF109203X, Gö6976, Rottlerin; mindegyik Calbiochem, San Diego, CA, USA), illetve azok oldószerével (dimetil-szulfoxid, DMSO, Sigma). A kezelést két napig folytattuk, majd minden lyukba a kezelő oldat 10 %-ának megfelelő mennyiségű MTT oldatot tettünk és a sejteket 37 °C-on 3 óráig inkubáltuk. Ezután a kiindulási oldatnak megfelelő mennyiségű MTT szolubilizáló oldattal (81 : 9 : 10 izopropanol : 1 N HCl : Triton X-100) a formazán kristályokat feloldottuk. Az abszorbanciát 550 nm-n kolorimetriásan határoztuk meg. Minden mérésnél 3-5 párhuzamos mintát határoztunk meg, majd az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. A kísérleteket legalább háromszor megismételtük.

A sejtprolifерáció vizsgálata

Mivel az MTT assay az élő sejtek számában bekövetkező változásról ad felvilágosítást, a proliferáció még pontosabb nyomonkövetésére kísérleteink egy részében bróm-deoxi-uridint (BrDU) felhasználó kolorimetriás assayt is 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 HaCaT sejteket az MTT assay-nél leírt módon 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 inkubáltunk. 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, majd 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, majd 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 határoztunk meg.

Kísérleteink másik részében a PKC overexpresszorok kettőződési idejének, valamint maximális sejtszámának megállapításához a sejteket (három párhuzamost futtatva) 10⁴ sejt/well denzitásban 12-lyukú edényekbe szélesztettük komplett DMEM-ben (a médiumot másnaponta cseréltük). A sejteket ezután a bemutatandó tenyésztési napokon tripszin alkalémazásával összegyűjtöttük, majd a sejtszámot hemocitóméter segítségével határoztuk meg. Az átlagos kettőződési idők vizsgálata során kezdő időpontnak a szélesztés utáni 24. órás időpillanatot 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 N_0 a sejtek száma a kísérletek végén és az elején. A maximális sejtdenzitás megállapításához a sejteket 12-lyukú edényekben növesztettük a konfluencia eléréséig, majd további három napig

posztkonfluens állapotban tartottuk őket (napi médiumcserével) és azután a fenti módszer szerint sejtszámolást hajtottunk végre.

Antitestek

A PKC izoenzimek meghatározásnál alkalmazott antitesteket, melyek igazoltan specifikusan reagálnak a humán PKC izoformákkal (Boczán és mtsai, 2000, 2001), nyúlban termeltették. Az anti-PKC α , β , γ , ϵ , η és ζ a Sigma, míg az anti-PKC θ , δ és λ/ι a Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA) terméke. Az általunk vizsgált differenciálódási markerek megjelenését, illetve expressziójában bekövetkező változások kimutatására alkalmazott antitesteket egérben termeltették. Kísérleteinkben a korai str. spinosum marker K10 (Sigma), a késői differenciálódási sejtmaker a K17 (Novocastra, Newcastle, UK), valamint a terminális str. granulosum marker az involucrin (INV, Sigma), a filaggrin (FIL, Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA, USA) és keratinocyta-specifikus transzglutamináz-1 (TG, Biomedical Technologies Inc.) kifejeződését vizsgáltuk.

Western (immuno)blot

A tenyésztett sejteket hideg PBS-ben mostuk, majd 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 szonikálóval a sejteket feltártuk (Lázár és mtsai, 2003). Az így elkészített minták proteintartalmának meghatározása BCA protein assayvel (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 ditiotritol, 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 µg/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 30 percig blokkoltuk, majd a megfelelő elsődleges antitesttel inkubáltuk. Az elsődleges antitestekből a megfelelő hígítást 5 % tejet tartalmazó PBS-ben készítettük el, majd a membránokat vagy 2 órán keresztül szobahőmérsékleten vagy egy éjszakán keresztül 4 °C-on inkubáltuk. Az inkubációt követően a membránokat 30 percig PBST-ben (0,1 % Tween-20 PBS-ben, Sigma) mostuk, majd megfelelő torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (1:1000 hígítás 5 % tejet tartalmazó PBS-ben) inkubáltuk. Az immunjelek rögzítése minden esetben kemiluminescens (ECL) kit (Pierce), a detektálás pedig fényérzékeny film (AGFA, Brüsszel, Belgium) segítségével valósult meg. Az immunoblot eredményeket denzitometriás analízisnek is alávetettük (Szallasi és mtsai, 1996). 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) ellenes antitesttel (1:100 PBS tejben) (Santa Cruz) festettük meg, majd az előzőekhez hasonlóan elemeztük a jelet.

Immuncitokémia

A tenyésztett HaCaT sejteket többszöri PBS-ses mosást követően hideg acetonnal 5 percig 4 °C-on fixáltuk, majd a fedőlemezeket szobahőmérsékletű borjú szérum albumint (BSA) tartalmazó blokkoló oldattal (1 % BSA és 0,6 % Triton X-

100, Sigma) blokkoltuk. A sejteket ezután 2 órán keresztül a megfelelő PKC ellenes nyúlban termeltetett elsődleges antitesttel inkubáltuk (1:50 vagy 1:100 blokkoló oldatban). A továbbiakban biotinilát, kecskében termeltetett nyúl ellenes antitesttel (1:300 PBS-ben) (Vector, Burlingame, VA, USA) végeztük az immunreakciót, majd a sejteket 1 órán keresztül inkubáltuk streptavidin Texas Red komplex-szel (1:50 PBS-ben) (Amersham, Little Chalfont, UK). Végül a mintákra DAPI-t tartalmazó Vectashield fedőanyagot (Vector) helyeztünk, majd a sejtekről fluoreszcens mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk. A primer antitestek nélkül történő negatív kontroll vizsgálatok alkalmával nem kaptunk festődést.

$[Ca^{2+}]_i$ meghatározása

Az $[Ca^{2+}]_i$ meghatározásához a keratinocytaikat egy órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk kalciumérzékeny festékkel (5 μ M fura-2 AM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (Bíró és mtsai, 1998; Lázár és mtsai, 2003). A mérés előtt a sejteket szobahőmérsékleten (22-24 °C) normál Tyrode-oldatban (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$, 11,8 mM Hepes-NaOH, 1 g/l glükóz, pH 7,4) tartottuk 30 percig, a festék egyenletes eloszlása végett. A fura-2 festékkel feltöltődött sejteket invertált fluoreszcens mikroszkóp látóterébe helyeztük (Diaphot, Nikon, Tokió, Japán). A festék gerjesztése 340 és 380 nm-n történt, kettős hullámhosszú monokromátor segítségével (Deltascan, Photon Technology International, New Brunswick, NJ, USA). Az emissziót 510 nm-n monitoroztuk, 10 Hz mintavételezési sebesség mellett. Az $[Ca^{2+}]_i$ szintben bekövetkező változásokat a Grynkiewicz és munkatársai által megadott módon vizsgáltuk (Grynkiewicz és mtsai, 1985). Először meghatároztuk a 340 (F_{340}) és 380 nm-en (F_{380}) történő gerjesztés hatására emittált fluoreszcenciaintenzitás-hányadosokat ($R=F_{340}/F_{380}$). Felhasználva a disszociációs

konstans (K_D), a minimális ($R_{\min}$) és maximális ($R_{\max}$) ráció értékeket, valamint az emittált fluoreszcencia hányados értékeit nulla ($F_{380}[0]$) és a festéket szaturáló ($F_{380}[\text{Ca}]$) kalciumkoncentrációknál, a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ezt követően az alábbi képlet segítségével számolható:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \cdot (F_{380}[0] / F_{380}[\text{Ca}]).$$

Kalibrációs kísérleteinkben a K_D -t 76 nmol/l-nek találtuk $R_{\min} = 0,42$, $R_{\max} = 8,6$ és $F_{380}[0] / F_{380}[\text{Ca}] = 15,3$ értékek mellett. A kísérleteink során látóterenként 20 sejt nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jét határoztuk meg, majd az értékeket átlagoltuk és átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. A statisztikai analízist Student-féle t -próba alkalmazásával végeztük el.

A rekombináns PKC izoenzimek aktivitásának meghatározása (kinase assay)

A transzfektált HaCaT 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 (reakcióként 40 μg) kináz-aktivitását hiszton III (H-III), valamint miozin könnyű-lánc-kináz 20 (MLCK 20) (mindkettő Sigma) szubsztrátok segítségével vizsgáltuk. Az assay-hez használt oldat 20 mM Tris-t (pH 7,5), 20 mM MgCl_2 -ot, 1 mM CaCl_2 -ot, 25 μM ATP-t és 0,2 mg/ml szubsztrátot (mindegyik Sigma), valamint 0,1 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -t (Amersham Biosciences, Freiburg, Németország) tartalmazott. A meghatározást minden esetben triplikálva végeztük el.

Az apoptózis meghatározása

Az egyes PKC izoformákkal, valamint az üres vektorral stabilan transzfektált HaCaT sejteket 10 μM $1\alpha,25\text{-dihidroxivitamin D}_3$ -mal ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), illetve 50

nM tumor necrosis faktor- α -val (TNF α) (mindkettő Sigma) kezeltük két napig. Ezután a sejteket tripszinezéssel összegyűjtöttük, majd 10 percen keresztül 1 μ l fluorescein-izotiocianát (FITC)-konjugált annexin V-tel inkubáltuk (Coulter Immunotech, Hialeah, FL, USA). Végül áramlási citométer (Coulter EPICS XL 4) segítségével meghatároztuk az apoptotikus sejtek számát az össz-sejtszámhoz viszonyítva.

A tumorigenezis vizsgálata SCID egerekben

A különböző PKC izoformákat overexpresszáló sejteket (a kontroll HaCaT sejtekkel egyetemben) nagy mennyiségű tenyészetekben növesztettük. A keratinocytákat tripszin alkalmazásával összegyűjtöttük, kétszer mostuk PBS-sel, majd $1-2 \times 10^6$ élő sejt/200 μ l denzitásban újrassuszpendáltuk őket a tenyésztő médiumban. A sejtsuszpenziót ezután SCID egerekbe intradermálisan injektáltuk, majd az egereket 30 napig megfigyelés alatt tartottuk (ezalatt az idő alatt egyik állatnál sem alakult ki halálos tumorprogresszió). Az állatokat végül eutanizáltuk és vizsgáltuk a kialakult tumorok átlagos háromdimenziós méreteit, valamint hisztológiai jellegzetességeit (lásd alább) (minden csoportban három-négy állattal).

Hisztológia és immunohisztokémia

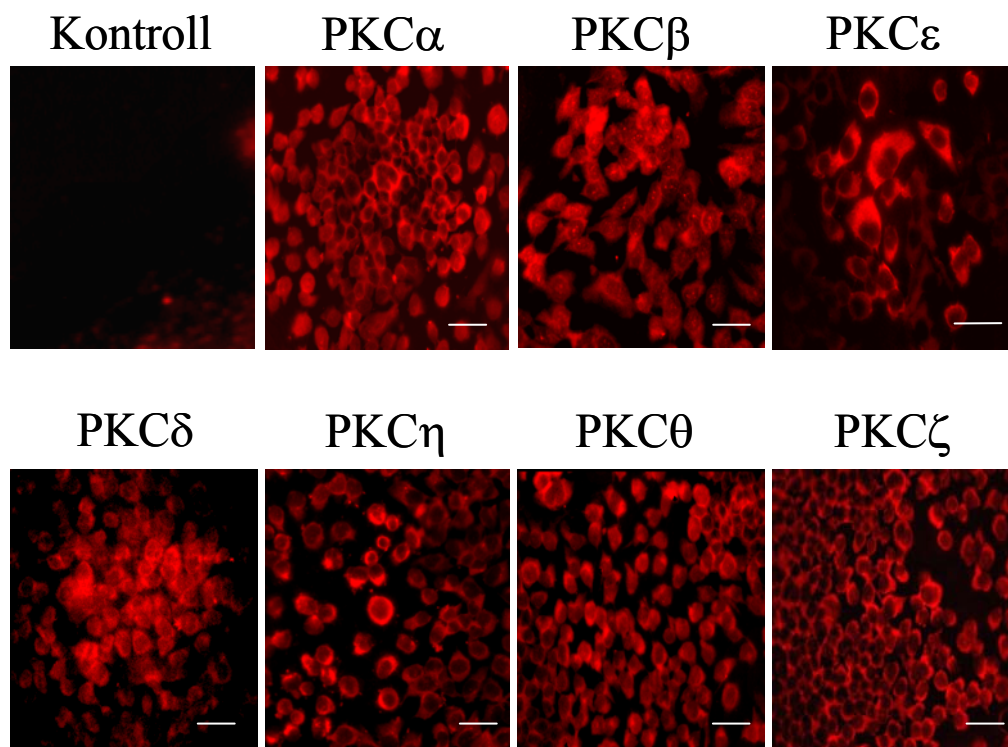
A kialakult tumorok hisztológiai paramétereit formalin-fixált, paraffinba ágyazott hematoxin-eozin (HE)-festett metszeteken határoztuk meg. A sejtsztódások átlagos számának megállapításához fénymikroszkóp segítségével tíz különböző, nagy nagyítású látótérben megszámoltuk a mitózis látható jeleit mutató sejtmagvakat, és az így kapott eredményeket a tumorok minden csoportja esetében átlagoltuk.

Ezen túlmenően a proliferáló sejtek számának meghatározásához a formalin-fixált, paraffinba ágyazott metszeteket a proliferációs (nukleáris) marker Ki-67 (Rose és mtsai, 1994) ellen festettük meg egy háromlépéses streptavidin-biotin-komplex (SABC) alapú immunhisztokémiai eljárás segítségével (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. Az egér anti-Ki-67 monoklonális, egérben termeltetett elsődleges antitestet (1:50 PBS-ben) a legoptimálisabb 1:50 hígításban alkalmaztuk (a különböző koncentrációk kipróbálásával nyert tapasztalataink alapján). 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 metilén-zöld (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.

EREDMÉNYEK

A HaCaT keratinocyták jellegzetes PKC izoenzimintázata változik a sejtek proliferációja és differenciálódása során

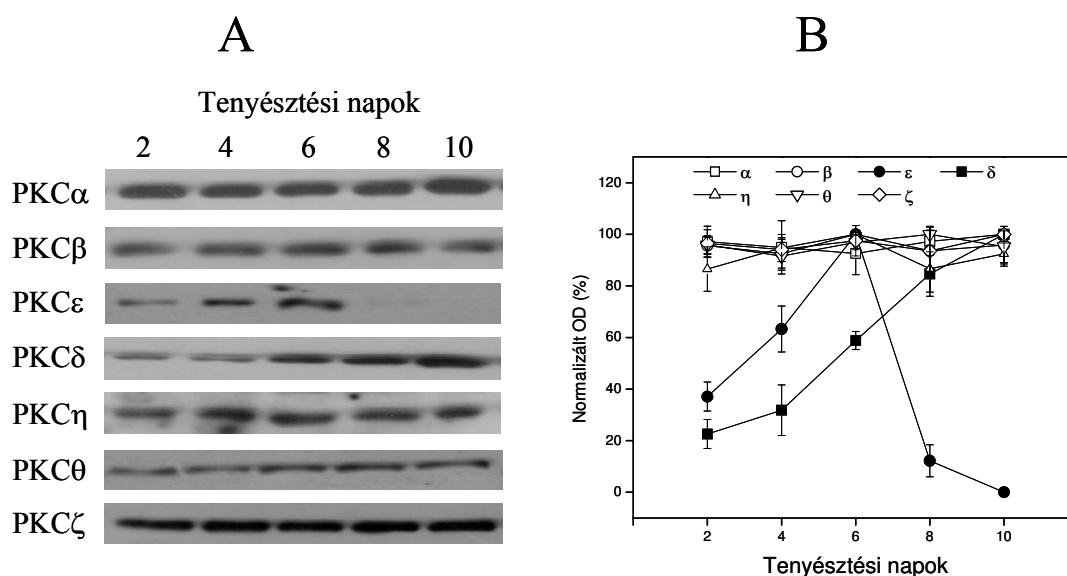
Kísérleteink során első lépésben azt vizsgáltuk, hogy a humán HaCaT keratinocytákban milyen PKC izoenzimek fordulnak elő a már ismert 11 izoforma közül. A fedőlemezekben tenyésztett (kb. 80 %-os konfluenciájú) HaCaT sejteken végzett immuncitokémiai kísérleteink során kiderült, hogy a keratinocytákban 7 izoforma expresszálódik: a “klasszikus” cPKC α és β ; a “novel” nPKC δ , ϵ , η és θ ; illetve az atípusos aPKC ζ (2. ábra).



2. ábra Humán HaCaT keratinocyták jellegzetes PKC izoenzimintázata

A sejteket 80 %-os konfluencia eléréséig tenyésztettük, a fedőlemezeket acetonnal fixáltuk, Triton X-100-at tartalmazó oldattal blokkoltuk, majd az “Anyagok és módszerek”-ben leírtak szerint nyúlban termeltetett anti-PKC elsődleges antitestekkel inkubáltuk. A fluoreszcens immunreakciót biotinilált, kecskében termeltetett nyúl ellenes antitesttel végeztük, majd a sejteket streptavidin-Texas Red komplex-szel inkubáltuk. Az első kép (Kontroll) elsődleges antitest nélküli immunfestést mutat. Az ábra minden izoforma esetében legalább négy kísérlet reprezentatív eredményét mutatja. Kalibráció: 20 μ m.

Ezen eredményeink alátámasztása végett az izoenzimek expresszióját Western blottal is meg kívántuk vizsgálni. A HaCaT sejteket kiegészített DMEM oldatban tenyésztettük a meghatározott konfluencia (60-70 %) eléréséig T75-s tenyésztőedényben, majd PKC ellen termeltetett specifikus antitestek felhasználásával immunoblottot végeztünk. Megállapítottuk, hogy, hasonlóan immuncitokémiai eredményeinkhez, ezen technika alkalmazásával is 7 PKC izoforma (azaz a cPKC α és β ; az nPKC δ , ϵ , η , és θ ; valamint az aPKC ζ) kifejeződését tudtuk detektálni. Egyik módszerrel sem tudtuk ugyanakkor a cPKC γ és az aPKC λ/ι jelenlétét igazolni a sejtekben (nem mutatva).



3. ábra A PKC izoenzimintázat változik a HaCaT sejtek tenyésztése során

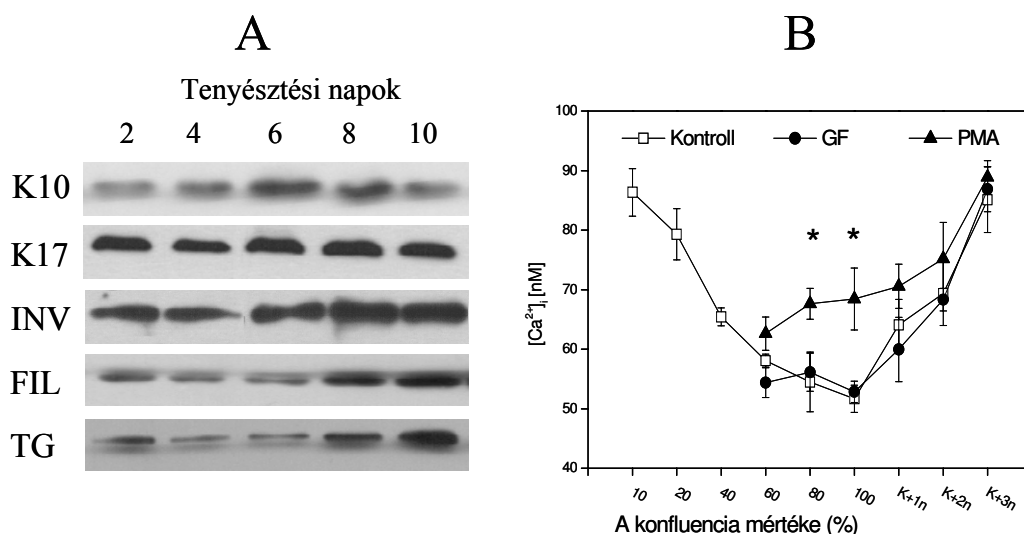
A) Különböző korú sejtenyészetekből azonos proteintartalmú mintákat készítettünk és az "Anyagok és módszerekben" leírtak alapján SDS gélelektroforézist, illetve Western(immu)blottot végeztünk nyúlban termeltetett anti-PKC elsődleges antitestek felhasználásával. **B)** A PKC izoformák mennyiségének tenyésztési napok függvényében való változását kvantitatív denzitometriával (optikai denzitás, OD) határoztuk meg. Ennek során az adott izoforma immunjelét denzitometráltuk, majd ezen értéket a kísérlet során az adott izoforma vonatkozásában maximális jel intenzitására (mint 100 %-ra) normalizáltuk. Az ábrán 4 független kísérlet eredményei láthatók átlag $\pm$ SEM formában.

A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy az előzőekben kimutatott 7 PKC izoenzim szintje hogyan változik a HaCaT keratinocyták proliferációja és differenciálódása során. A különböző korú tenyészeteket (melyek a 6. napon érték el a

konfluenciát) összegyűjtöttük, majd szigorúan azonos proteintartalmú mintákat futtatva (azaz az immunreaktív csíkok intenzitását sejtproteinre normálva, 3. ábra) Western blottot végeztünk. Megállapítottuk, hogy az egyes izoenzimek szintje eltérő módon módosult a tenyésztés során (3. ábra). Voltak olyan izoformák (cPKC α és β ; az nPKC η és θ ; valamint az aPKC ζ), melyek szintje nem változott a sejtek proliferációjának és differenciálódásának előrehaladtával. Ezzel szöges ellentétben, az nPKC δ jelentős (és folyamatosan növekvő) expressziót csak a differenciálódó kultúrákban mutatott, míg az ugyancsak “novel” nPKC ϵ szintje a proliferáló sejtekben növekedett, ugyanakkor a differenciálódó (posztkonfluens) tenyészetekben praktikusán nem volt kimutatható az izoforma. Ezen eredmények (melyeket nem bemutatott immuncitokémiai vizsgálataink is alátámasztottak) arra engedtek következtetni, hogy az egyes izoenzimek szerepet játszhatnak a humán HaCaT keratinocyták sejtfolyamatainak szabályozásában.

Lee és mtsai (1998) kimutatták, hogy a NHEK-ban a nagy sejtdenzitás által beindított differenciálódás előrehaladtával a cPKC α a citoplazmából a membrán frakcióba transzlokálódik, mely jelenség ezen izoenzim szerepére utalhat a differenciálódás folyamatában. Kísérleteink következő szakaszában ezért – a PKC izoformák különböző tenyésztési napokon történő immuncitokémiai jelölését követően – konfokális mikroszkópia alkalmazásával elemeztük a PKC izoenzimek szubcelluláris lokalizációját. Megállapítottuk, hogy – ellentétben a NHEK-on tapasztaltakkal (Lee és mtsai, 1998) – egyik PKC enzim szubcelluláris lokalizációja sem változott meg a sejtek proliferációjának és differenciálódásának előrehaladtával (nem mutatva). Mindezen adataink azt sugallták, hogy a HaCaT keratinocytákban a differenciálódás indukciója a PKC izoenzimintázat megváltozásával kapcsolható

össze, ugyanakkor az egyes izoformák szubcelluláris lokalizációja nem módosul a folyamat során.



4. ábra Differenciálódási markerek kifejeződésének és a nyugalmi [Ca²⁺]_i változása HaCaT sejtek proliferációja és differenciálódása során.

A) Különböző korú sejtenyészetekből (melyek a 6. napon érték el a konfluenciát) azonos proteintartalmú mintákat készítettünk és az “Anyagok és módszerekben” leírtak alapján SDS gélelektroforézist, valamint Western blot analízist hajtottunk végre a differenciálódási markerek; azaz keratin 10 (K10), keratin 17 (K17), involucrin (INV), fillagrin (FIL) és a keratinocita-specifikus transzglutamináz-1 (TG) kimutatására. **B)** A kontroll sejteket (□) 10%-os konfluenciától tenyésztettük a konfluencia (K) elérése után harmadik napig (K+3n). A párhuzamos tenyészeteket 50-60 %-os konfluencia elérése után naponta kezeltünk 1 μM GF109203X (●) vagy 100 nM PMA (○) anyaggal a három napos posztkonfluens kultúrák eléréséig. A feltüntetett napokon a sejteket 5 μM fura-2 AM-rel feltöltöttük, majd fedőlemezenként 20 sejten mértük a nyugalmi [Ca²⁺]_i-t az “Anyagok és módszerekben” leírtak szerint. A pontok 20 sejt átlag ± SEM értékeit reprezentálják. A * szignifikáns (p < 0,05) statisztikai különbséget jelez a PMA-kezelt és a napi kontroll csoportok értékei között.

A differenciálódási markerek kifejeződése, valamint a nyugalmi [Ca²⁺]_i változik HaCaT keratinocyták proliferációja és differenciálódása során

A NHEK-ban különböző differenciálódási markerek jelennek meg a differenciálódási folyamat előrehaladtával (Harding és Scott, 1983; Schweizer és Winter, 1983; Watt, 1983; Mehrel és mtsai, 1990; Fuchs, 1990). Ezen mechanizmus nyomkövetésére a HaCaT keratinocyták differenciálódásának vizsgálatakor a korai (stratum spinosumban kifejeződő) differenciálódási marker K10, a késői (stratum granulosumban domináns) marker NV, FIL, valamint a TG, továbbá a

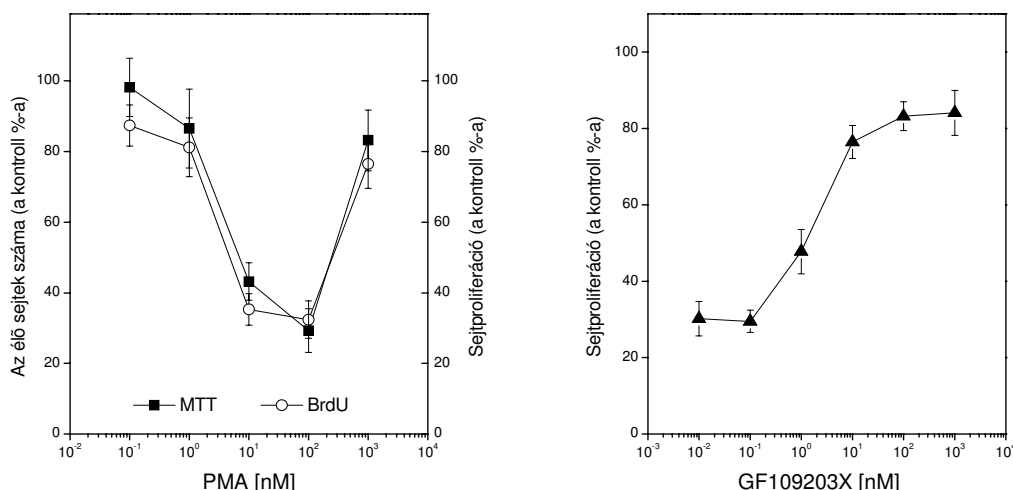
hyperproliferatív asszociációs marker K17 expresszióját tanulmányoztuk. Habár ezen markerek megjelenését és expressziós mintázatát már előzőekben meghatározták HaCaT sejteken is (Boukamp és mtsai, 1988; Ryle és mtsai, 1989), kísérleteinkben a mi *in vitro* rendszerünkben is szeretnénk volna leírni ezek expressziójának változását a tenyésztési napok függvényében. Western blot kísérleteinkben megállapítottuk, hogy, a várakozásoknak megfelelően, a különféle differenciálódási markerek szintje eltérő módon viselkedett a tenyésztés során (4./A. ábra). A K10 expressziója a maximumot a konfluencia utáni 1-2. napon érte el (korai differenciálódási marker), míg az INV, FIL és TG expressziós szintje a posztkonfluens kultúrákban volt a legnagyobb (késői differenciálódási markerek). A hyperproliferatív asszociációs marker K17 szintje nem változott jelentősen a tenyésztés előre haladtával.

Ezen túlmenően – mivel a NHEK differenciálódása a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ folyamatos növekedésével párosul (Hennings és mtsai, 1980; Pillai és Bikle, 1992) – vizsgáltuk a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ változását is az eltérő korú HaCaT tenyészetekben. Amint a 4./B. ábrán látható, a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ folyamatosan csökkent a proliferáció előrehaladtával a prekonfluens kultúrákban, ugyanakkor folyamatosan növekedett a differenciálódással párhuzamosan. Eredményeink ezért azt támasztják alá, hogy a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ vizsgálatával is jól jellemezhető a HaCaT keratinocyták differenciálódása.

A PMA gátolja a HaCaT sejtek proliferációját, megemeli az $[Ca^{2+}]_i$ -t és terminális differenciálódást indukál

Irodalmi adatokból alapján bebizonyosodott, hogy a PKC aktivátor forbolészter PMA mind az egér, mind a humán keratinocytákban meggátolta a sejtproliferációt és terminális differenciálódást indukált (Dlugosz és Yuspa, 1993,

1994; Denning és mtsai, 1995; Lee és mtsai, 1998). Ezért következő kísérleteinkben a PMA hatását vizsgáltuk a HaCaT sejtek folyamataira. Először a prekonfluens (50-60 %-os denzitás) HaCaT keratinocytákat PMA különböző koncentrációival 3 napon keresztül kezeltük, majd az élő sejtek számát MTT assay-vel határoztuk meg. Amint a 5./A. ábrán látható, hogy a PMA jellegzetes módon („U-alakú” görbe) dózis-függően csökkentette az élő sejtek számát (azaz leghatásosabbnak a 10 és 100 nM dózisban alkalmazott PMA bizonyult).



5. ábra A PMA csökkenti a HaCaT sejtek proliferációját

A HaCaT sejteket 50-60 %-os konfluencia eléréséig tenyésztettük 96-lyukú edényben, majd PMA különböző koncentrációjával kezeltük (A), illetve különböző koncentrációjú GF109203X előkezelést követően az oldat PMA koncentrációját 100 nM-ra állítottuk be (B). Ezt követően a harmadik napon BrdU assayt (A-○ és B-▲), illetve MTT assayt (A-■) végeztünk el. A pontok négy párhuzamosan vizsgált minta átlag ± SEM értékeit reprezentálják. Három-négy ismeltelt meghatározás azonos eredményre vezetett.

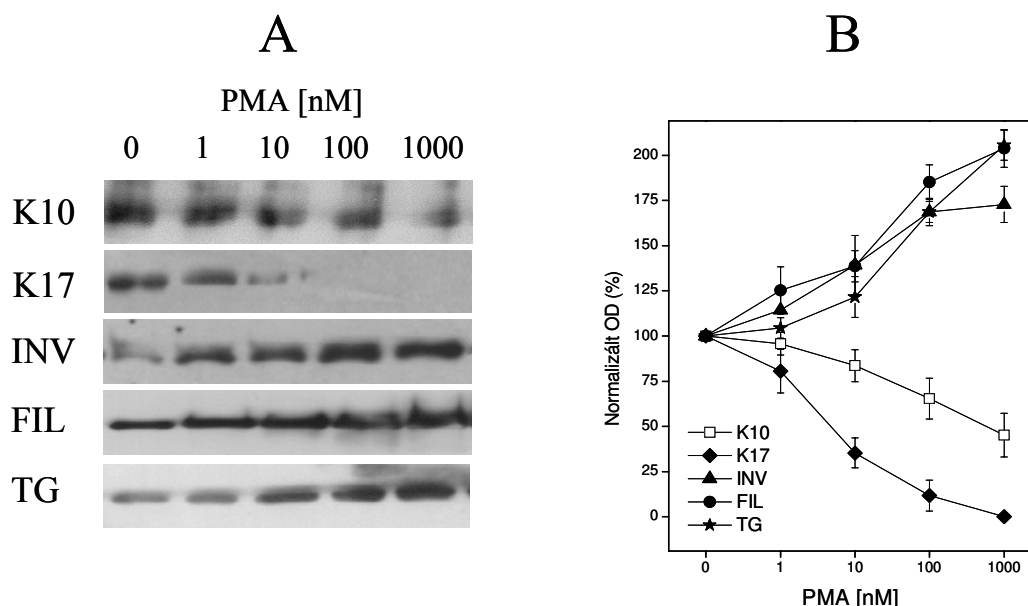
Mivel az élő sejtek számában bekövetkező csökkenés egyaránt adódhat a proliferáció gátlásából, valamint a sejthalál különféle formáinak (apoptózis, nekrozis) beindulásából, annak bizonyítása érdekében, hogy a PMA valóban a sejtek proliferációját változtatta meg, kísérleteinket azonos módon elvégzett BrDU assayvel is ellenőriztük. Amint az 5./A. ábrán látható, a PMA az MTT assay során mért adatokhoz nagyon hasonló módon csökkentette a proliferációt („U-alakú” dózis-hatás

görbe, leghatásosabb 10 és 100 nM koncentrációk). Ezen eredményeink arra engedtek következtetni, hogy, hasonlóan az egér és NHEK-nál tapasztaltakhoz, a PMA a HaCaT keratinocyták proliferációját gátolta és nem sejthalált indukál. Ezt bizonyította azon megfigyelésünk is, hogy kolorimetriás laktát-dehidrogenáz alapú cititoxicitás assay során soha nem tapasztaltunk mérhető sejthalált egyetlen vizsgált PMA koncentráció alkalmazásakor sem (nem mutatva).

Annak bizonyítására, hogy a PMA proliferációt csökkentő hatását specifikus módon, azaz a PKC rendszeren keresztül, fejtette ki, a PMA kezeléssel egyidőben egy szelektív PKC gátlószert, a GF109203X anyagot (Toullec és mtsai, 1991; Martiny-Baron és mtsai, 1993) is alkalmaztuk. A sejteket különböző koncentrációjú GF109203X inhibitorral előkezeltük (maximális 1 μ M koncentrációig, mely önmagában nem volt hatással a sejtek proliferációjára, lásd 8. ábra), majd egy óra múlva 100 nM PMA-t (a leghatásosabb koncentráció, lásd fent) alkalmaztunk és két nap elteltével BrDU assayt végeztünk. Amint a 6./B. ábrán látható, a GF109203X koncentráció-függő módon kivédte a PMA proliferációt csökkentő hatását, mely eredmény a PMA PKC izoenzimeken keresztüli specifikus hatására utal.

Megvizsgáltuk a PMA hatását a differenciálódási marker kifejeződésére is. Ezesetben a kb. 90 %-os konfluenciában lévő sejteket 5 napon keresztül (azaz a posztkonfluens 3. napig) kezeltük PMA különböző koncentrációival, majd azonos porteintartalmú mintákat felhasználva Western blot analízis végeztük. Kimutattuk, hogy a PMA különböző módon változtatta meg az egyes differenciálódási markerek expresszióját. Míg a forbol-észter kezelés, eltérő dózis-hatás viszonyokat és hatékonyságot mutatva, csökkentette a K10 (korai marker) és K17 (hyperproliferatív marker) szintjét, addig a késői és terminális differenciálódási markerek (azaz az INV, FIL és TG) expressziója fokozatosan és jelentősen növekedett PMA hatására. Ezen

eredményeink azt mutatják, hogy a forbol-észter a HaCaT sejtekben terminális differenciálódást indított be, a korai differenciálódási folyamatok párhuzamos gátlása mellett.



6. ábra A PMA megváltoztatja a differenciálódási markerek expresszióját a HaCaT keratinocytákban

A) A kb. 90 %-os konfluenciájú HaCaT sejteket különböző koncentrációjú PMA-val 5 napon keresztül kezeltük. A sejtekből azonos proteintartalmú mintákat futtattunk SDS gélen, majd Western blottot végeztünk az „Anyagok és módszerekben“ ismertetett módon. A kísérlethez egérben termeltetett elsődleges antitesteket használtunk a differenciálódási markerek; azaz a keratin 10 (*K10*), keratin 17 (*K17*), involucrin (*INV*), fillagrin (*FIL*) és a keratinocytára jellemző transzglutamináz-1 (*TG*) kimutatására. **B)** A differenciálódási markerek mennyiségének PMA kezelés hatására bekövetkező változását kvantitatív denzitometriával (optikai denzitás, OD) határoztuk meg. Ennek során az adott marker immunjelét denzitometráltuk, majd ezen értéket a kontroll (DMSO, mint vivőanyaggal kezelt) minta jelintenzitására (mint 100 %-ra) normalizáltuk. Az ábrán 4 független kísérlet eredményei láthatók átlag $\pm$ SEM formában.

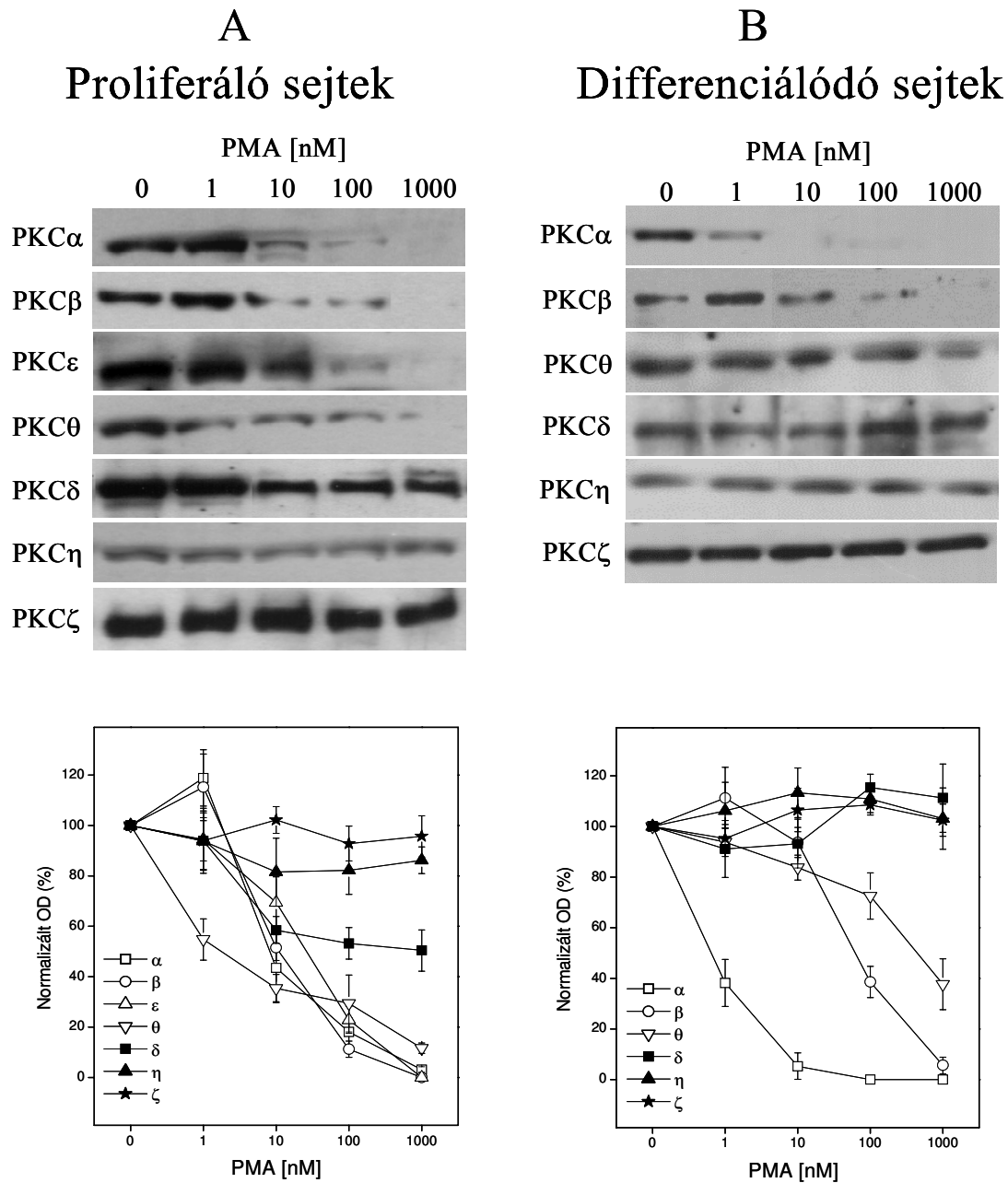
A differenciálódás vizsgálata mellett tanulmányoztuk, hogyan változik a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ a PMA kezelés hatására. Ennek során 50-60 %-os konfluenciájú HaCaT keratinocytákat 6 egymást követő napon kezeltük 100 nM PMA-val, majd megmértük a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ változását, a napi kontroll (azaz DMSO-kezelt) sejtek hasonló értékeihez viszonyítva. Amint a 4./B. ábrán látható, a prekonfluens kultúrákban a PMA megnövelte a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -t; szignifikáns ($p < 0,05$) emelkedést tapasztaltunk az 1. (24 % növekedés) és a 2. (32 % növekedés) forbol-

észter adagolást követően. Ezzel szemben ugyanakkor a PMA nem befolyásolta értékelhető mértékben a sejtek nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -jét a konfluencia elérése után. Ezen eredményeink, hasonlóan a differenciálódási markerek vizsgálatakor kapott adatainkhoz, arra utalnak, hogy a PMA terminális differenciálódást indított el HaCaT keratinocytákban is.

A PMA proliferációt és differenciálódást befolyásoló hatását eltérő PKC izoformák mediálhatják HaCaT sejtekben

Azt is meg kívántuk vizsgálni, hogy a PMA proliferációra és differenciálódásra kifejtett fent bemutatott hatását mely PKC izoformák mediálhatják. Általánosan elfogadott tény, hogy a hosszantartó PMA kezelés során az egyes PKC izoenzimek aktiválódnak, más intracelluláris kompartmentbe transzlokálódnak, végül down-regulálódnak, azaz kifejeződésük az adott sejtben (Nishizuka, 1988; Jaken, 1996), így NHEK-ban is (Fisher és mtsai, 1993; Matsui és mtsai, 1996), csökken. Mivel a transzlokáció egy relatíve gyors (perceken belül lezajló) folyamat, ezért kísérleteinkben hosszantartó PMA hatását vizsgáltuk az izoenzimek down-regulációjára.

Proliferáló (50-60 %-os konfluencia) HaCaT keratinocytákat különböző koncentrációjú PMA-val kezeltük 3 napig, majd azonos proteintartalmú mintákat futtatva Western blottot készítettünk. Megállapítottuk, hogy a PMA kezelés a különböző izoenzimek szintjét eltérő módon változtatta meg (7./A. ábra). Habár általánosan elmondható volt, hogy az összes PMA-szenzitív (azaz cPKC és nPKC) izoforma szintje csökkent a kezelés hatására, a PMA-indukálta down-reguláció mértéke jelentős különbségeket mutatott (a PMA-inszenzitív aPKC ζ szintje, értelemszerűen, nem változott).



7. ábra A PMA különböző mértékben down-regulálja a PKC izoenzimeket proliferáló és differenciálódó HaCaT sejtekben

Felső panelek: Proliferáló (50-60 %-os konfluencia) (A), illetve differenciálódó (kb. 90 %-os konfluencia) (B) HaCaT sejteket PMA különböző koncentrációival 2, illetve 5 napon keresztül kezeltük, majd "Anyagok és módszerekben" leírtak alapján SDS gélelektroforézist és Western blot alkalmaztunk nyúlban termeltetett anti-PKC elsődleges antitestek felhasználásával. **Alsó panelek:** A PKC izoformák mennyiségének PMA kezelés hatására bekövetkező változását kvantitatív denzitometriával (optikai denzitás, OD) határoztuk meg. Ennek során az adott izoenzim immunjelét denzitometráltuk, majd ezen értéket a kontroll (DMSO, mint vivőanyaggal kezelt) minta jelintenzitásához (mint 100 %-ra) normalizáltuk. Az ábrán izoenzimekként 3-4 független kísérlet eredményei láthatók átlag $\pm$ SEM formában.

Voltak olyan izoenzimek (PKC α , β , ϵ és θ), melyek teljes mértékben eltűntek a sejtekből a PMA hatására, ugyanakkor a forbol-észter eltérő dózis-hatás viszonyok mellett fejtette ki hatását. Ezzel ellentétben, habár a PKC δ down-regulációja is jelentős volt (40-50 %-os csökkenés), az izoforma még a legnagyobb PMA koncentrációk jelenlétében is szignifikáns expressziót mutatott a sejtekben. Végezetül azt tapasztaltuk, hogy a PKC η szintje csak kismértékben (kb. 20 %-os csökkenés) változott a forbol-észter hatására.

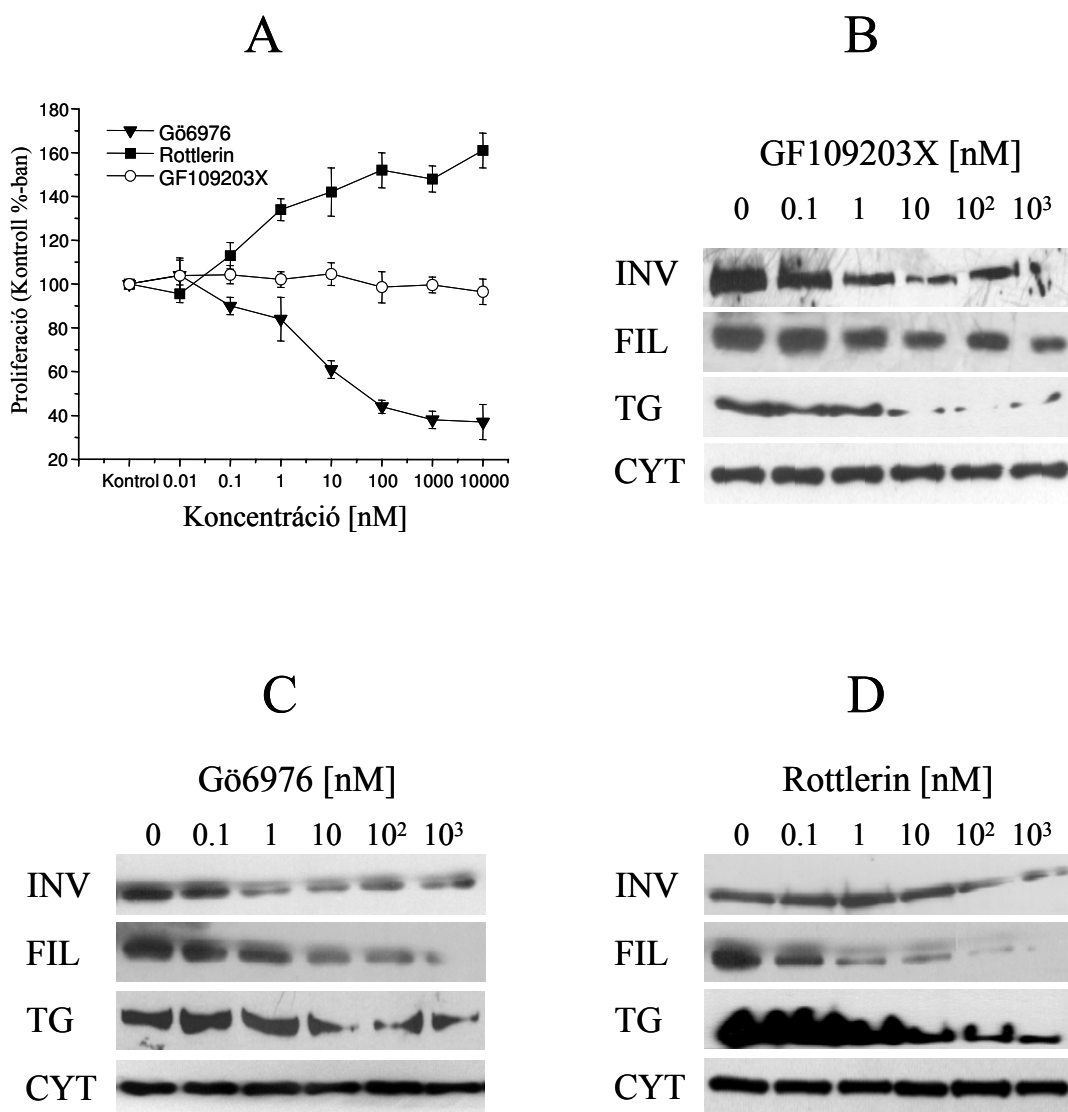
További kísérleteinkben arra kerestünk választ, hogy a PMA kezelés hogyan változtatta meg az egyes PKC izoformák megjelenését a differenciálódó HaCaT sejtekben. Ezen esetben a sejteket kb. 90 %-os konfluencia elérése után 5 napon keresztül kezeltük PMA különböző koncentrációival, majd itt is Western blot analízist hajtottunk végre. Amint a 7./B. ábrán látható, a PMA, hasonlóan a proliferáló sejtek esetében mértékhez, eltérő módon változtatta meg az egyes izoformák kifejeződését. Legfontosabb kísérletes eredményünk ugyanakkor az volt, hogy a PMA-érzékeny PKC izoforma-populáció jelentősen eltért a differenciálódó és a proliferáló keratinocytákban. Azaz, a forbol-észter alkalmazása, szöges elletétben a proliferáló sejtekben tapasztaltakkal, nem változtatta meg a proliferáló sejtekben down-regulálódott nPKC δ és η szintjét. Ezen túlmenően, habár a PMA a differenciálódó sejtekben is jelentősen csökkentette a PKC α és θ izoenzimek expresszióját, a forbol-észter eltérő dózis-hatás viszonyok mellett fejtette ki celluláris hatását a kétféle sejtpopuláción, rámutatva a proliferáló és differenciálódó sejtek PKC izoformáinak eltérő (PMA iránt mutatott) érzékenységére. Végezetül megállapítottuk azt is, a PMA hasonló hatékonysággal csökkentette a cPKC β expresszióját a differenciálódó keratinocytákban, mint a proliferáló sejtekben, míg az aPKC ζ esetében is „érzéketlennek” mutatkozott a PMA hatásával szemben (mint az a 3. ábrán

bemutattuk, az nPKC ϵ kifejeződése nem volt detektálható a posztkonfluens kultúrákban). Mindezen eredményeink arra utalnak, hogy egy karakterisztikus PKC izoformamintázat vesz részt a PMA differenciálódást indukáló hatásának kifejlődésében HaCaT keratinocytákon. Adataink ugyanakkor azt is sugallják, hogy ezen PKC mintázat nagy valószínűséggel jelentős mértékben eltér attól, mely a forbol-észter proliferációt gátló hatását közvetíti a sejteken.

Különböző PKC inhibitorok hatása HaCaT keratinocyták proliferációjára és differenciálódására

A fent bemutatott kísérleteink egyértelműen azt sugallták, hogy a PKC izoenzimeknek jelentős specifikus szerepük lehet a humán HaCaT keratinocyták sejtfolyamatainak szabályozásában. Továbbiakban ezért különféle PKC gátlószerek hatását elemeztük. Első lépésben a korábban már említett GF109203X anyag hatását tanulmányoztuk, mely a cPKC és nPKC izoenzimek hatékony gátlószere (Toullec és mtsai, 1991; Martiny-Baron és mtsai, 1993). Western blot alkalmazásával kimutattuk, hogy a GF109203X jelentősen és dózis-függő módon szupresszálta a késői differenciációs markerek (INV, FIL és TG) expresszióját (8./B. ábra). Az is bebizonyosodott ugyanakkor, hogy – ellentétben a differenciálódásra gyakorolt drámai hatásával, de hasonlóan a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ befolyásolásához (lásd 4./B. ábra) – az inhibitor nem módosította HaCaT keratinocyták proliferációját (8./A. ábra). Ezen utóbbi megfigyelésünket (legalább) kétféleképpen értelmezhetjük. Először is, ezek az eredmények azt sugallhatják, hogy a PKC aktivitás egyáltalán nem játszik szerepet a HaCaT sejtek proliferációjában, mely meglehetősen valószínűtlen a PMA-val kapott fent bemutatott eredmények tükrében (lásd 5-7. ábrák). Egy másik hipotézis az lehet, hogy a sejtek összes létező cPKC és nPKC izoformájának (azaz a cPKC α és

β ; nPKC δ , ϵ , η és θ) együttes gátlása által egyenlő mértékben szupresszáldtak a növekedést serkentő és gátló folyamatok, mely hatások, mintegy egymást kioltva, összességében semmilyen kimutatható változást nem eredményeztek.



8. ábra Különböző PKC inhibitorok hatása a HaCaT keratinocyták proliferációjára és differenciálódására

A) A HaCaT sejteket 50-60%-os konfluencia eléréséig 96-lyukú edényben tenyésztettük, majd különböző koncentrációjú PKC inhibitorokkal két napon keresztül kezeltük, végül BrdU assay-t végeztünk. A pontok négy párhuzamosan vizsgált minta átlag $\pm$ SEM értékeit reprezentálják. Három-négy ismételt meghatározás azonos eredményre vezetett. **B-D)** A sejteket különböző koncentrációjú GF109203X (**B**), Gö6976 (**C**) és Rottlerin (**D**) inhibitorokkal három napon keresztül kezeltük, majd Western blottot végeztünk az "Anyagok és módszerekben" ismertetett módon. A kísérlethez egérben termeltetett elsődleges antitesteket használtunk a differenciálódási markerek; azaz az involucin (*INV*), fillagrin (*FIL*) és a keratinocytá-specifikus transzglutamináz-1 (*TG*) kimutatására. A kísérletek során, a proteintartalom ellenőrzése végett, a membránokat egyúttal egérben termeltetett cytochrome-C ellenes antitesttel is megfestettük (*CYT*). Az ábra 3-4 hasonló eredményt szolgáltató kísérlet egyikét mutatja.

Ezen második hipotézisünket bizonyítandó, megvizsgáltuk más PKC inhibitorok hatását is a HaCaT sejtek proliferációjára, valamint differenciálódására. Először a cPKC izoformák – azaz esetünkben a cPKC α és β inhibitorát – a Gö6976 gátlószert alkalmaztuk (Martiny-Baron és mtsai, 1993). Amint az 8./A. ábrán látható, a GF109203X hatásával szöges ellentétben, a cPKC izoformák inhibitora jelentősen és dózis-függően gátolta a sejtek proliferációját. Ezen túlmenően a Gö6976 a differenciálódási markerek expressziójában nagyon hasonló változásokat okozott, mint a GF109203X; azaz, cPKC izoenzimek kizárólagos gátlása dózis-függő módon lecsökkentette az INV, a FIL és a TG expresszióját (8./B. és C. ábra). Ezen eredmények erőteljesen azt sugallták, hogy a cPKC izoformák jelentős (pozitív) szerepet játszanak a HaCaT keratinocyták proliferációs és differenciálódási folyamataiban.

Ezután megvizsgáltuk az nPKC izoformák lehetséges szerepét a fenti sejtfolyamatokban. Mivel kereskedelmi forgalomban csak a specifikus nPKC δ inhibitor, a Rottlerin (Gschwendt és mtsai, 1994) volt elérhető, ezért ennek a molekulának a hatását vizsgáltuk a HaCaT keratinocyták sejtfolyamataira. Amint az 8./A. és D. ábrán látható, az nPKC δ specifikus gátlása dózis-függő módon megnövelte a sejtek proliferációját, ugyanakkor – nagyon hasonlóan a GF109203X és Gö6976 gátlószerek hatásához – lecsökkentette a differenciálódási markerek (INV, FIL, TG) szintjét. Habár teljes bizonyossággal nem zárható ki, hogy a Rottlerin a PKC rendszeren kívül egyéb rendszerekre is hatással lehet, eredményeink arra engednek következtetni, hogy az nPKC δ aktivitás a differenciálódás pozitív, míg a proliferáció negatív modulátorként viselkedhet HaCaT keratinocytákban.

Bizonyos PKC izoenzimek rekombináns overexpressziója

Az inhibitorok alkalmazásával kapott eredmények megmutatták, hogy bizonyos cPKC és nPKC izoformáknak fontos szerepük lehet a HaCaT keratinocyták proliferációjának és differenciálódásának regulációjában. Mindazonáltal – habár a GF109203X anyagot széles körben alkalmazzák általános PKC inhibitoraként, csakúgy, mint a Gö6976-t a klasszikus izoformák inhibitoraként, illetve a Rottlerint az nPKC δ inhibitoraként – ezen anyagok egyike sem annyira specifikus és/vagy szelektív, mint azt kezdetben hitték. Például néhány rendszer esetében a GF109203X blokkolta a mitogén-aktivált protein kináz-aktivált protein kináz-1 β -t és a p70 S6 kinázt (Alessi, 1997), míg a Rottlerinről azt közölték, hogy nem teljes mértékben szelektív az nPKC δ -ra (Gschwendt és mtsai, 1994). Ezen felül adataink alapján nem tudtunk különbséget tenni például a cPKC α és β izoforma feltételezett izoforma-specifikus szerepe között, valamint nem határozhattunk meg egyéb nPKC izoforma-specifikus funkciókat sem. Ezért a korábban elkészített MTH vektorok (Oláh és mtsai, 1994; Ács és mtsai, 1997a, 1997b; Lázár és mtsai, 2003) segítségével a HaCaT keratinocytákat rekombináns cPKC α -val és β -val, valamint nPKC δ -val és ϵ -nal stabilan transzfektáltuk. Az utóbbi izoformát azért választottuk ki a többi nPKC izoforma közül, mert a sejtoszódásban és a differenciálódásban betöltött potenciális szerepe számos sejttípus esetében – beleértve a keratinocytákat is – korábban igazolódott (Mischak és mtsai, 1993; Goodnight és mtsai, 1994 és 1995; Brodie és mtsai, 1998; Jansen és mtsai, 2001; Zang és mtsai, 2003).

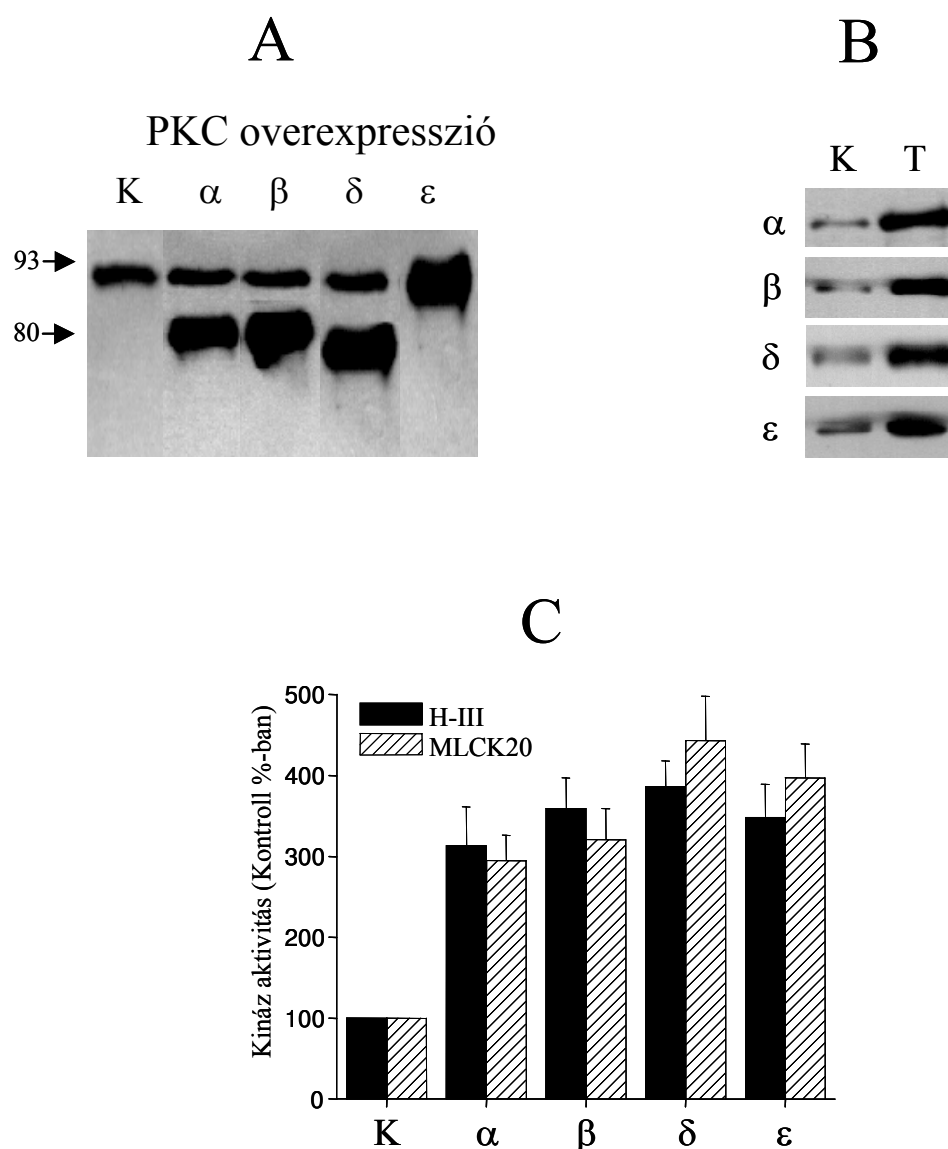
Először a rekombináns overexpresszió hatékonyságát vizsgáltuk meg. A „pool” tenyészetek (9. ábra), valamint az egyes szelektált klónok (nem mutatva) sejtlizátumait Western blot analízisnek vetettük alá. Ennek során olyan nPKC ϵ -ellenes antitestet használtunk, mely specifikusan a nPKC ϵ fent említett szekvenciáját ismeri

fel, azaz specifikusan jelöli mind a sejtekben található endogén PKC ϵ -t (kb. 90 kDa-os sávok), mind pedig a transzfektált sejtek által expresszált összes rekombináns izoforma ϵ -tag szekvenciáját (a rekombináns PKC α , β és δ esetében kb. 80 kDa-nál kaptunk immunjelet, míg a rekombináns PKC ϵ esetén természetesen szintén 90 kDa-nál). Tehát ezen antitesttel való immunfestést követően a kontroll sejtekben egyedi, kb. 90 kDa-os magasságban festődő, a sejtekben jelenlévő endogén PKC ϵ kifejeződését reprezentáló sáv látható (9./A. ábra). A rekombináns PKC α , β és δ izoformák valamelyikét overexpresszáló keratinocyták esetében ugyanakkor ezen endogén PKC ϵ festődése mellett az exogén PKC α , β és δ molekulatömegének megfelelően (kb. 80 kDa) egy másik, az endogén PKC ϵ jelenél sokkal erősebb festődés is tapasztalható (mely természetesen hiányzik a nem transzfektált kontroll sejtekben), és amely a rekombináns izoforma nagyon erőteljes expresszióját jelzi. A rekombináns PKC ϵ -t kifejező sejtek immunképein természetesen csak egy immunreaktív sáv látható, hiszen ezesetben az endogén és exogén izoformák molekulatömegük szerint nem különülnek el. Jól látható ugyanakkor, hogy az azonos proteintartalmú mintákat felhasználó Western blot analízis során sokkal erőteljesebb immunjelzést tapasztalhattunk a rekombináns PKC ϵ -t overexpresszáló sejtek esetében, mint az üres vektorral transzfektált (kontroll) keratinocytákon, jól reprezentálva a stabil transzfekció hatásosságát (9./A. ábra).

Mindezekén túlmenően – a különböző rekombináns, overexpresszált PKC izoenzimeket kimutató – izoforma-specifikus antitestek használatával azt tapasztaltuk, hogy az overexpresszált PKC izoenzimek szintje (9./B. ábra) 3-7-szer magasabb volt, mint a megfelelő endogén PKC izoformák kifejeződése.

Végül, hogy meggyőződhessünk arról, hogy az overexpresszált izoformák funkcionálisan is aktívak, megmértük a sejtlyázatok kináz (PKC) aktivitását is.

Amint az a 9./C. ábrán látható, a rekombináns PKC izoformákat expresszáló sejtek magasabb PKC aktivitási értékeket mutattak a kontroll (üres vektorral transzfektált) HaCaT sejtekhez képest mindkét kináz-szubsztrát esetében.

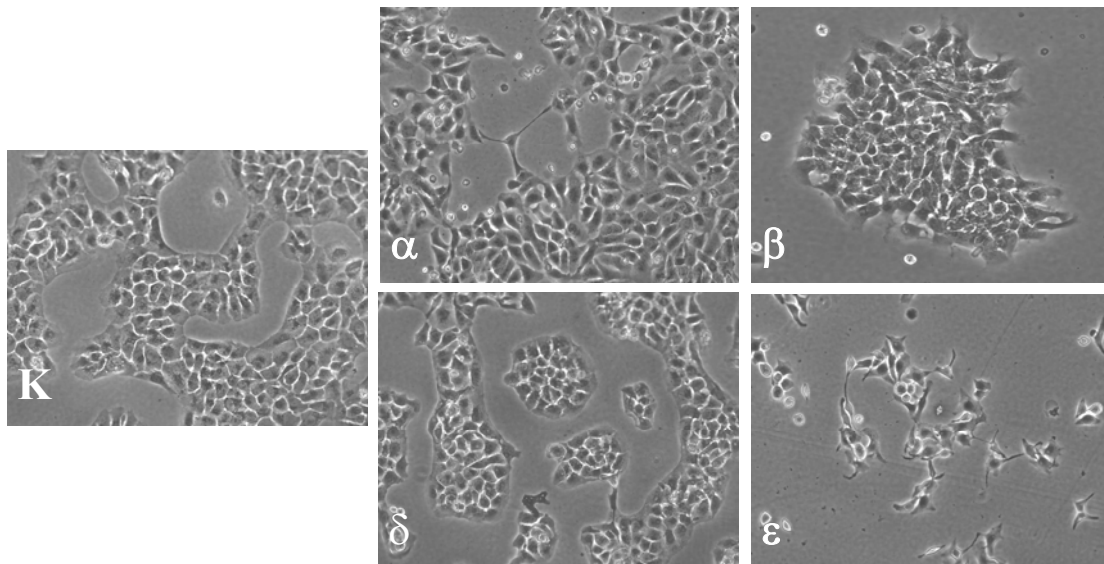


9. ábra Egyes PKC izoenzimek overexpressziója HaCaT keratinocytákban

A) Különböző PKC izoenzimekkel stabilan transzfektált HaCaT keratinocytákat, valamint az üres vektort tartalmazó sejteket (Kontroll, K) Western blot analízisnek vetettük alá. Ennek során olyan anti-PKCε antitestet használtunk, mely specifikusan jelöli mind a sejtekben található endogén PKCε-t (kb. 90 kDa-os sávok), mind pedig a transzfektált sejtek által expresszált összes rekombináns izoforma ε-tag szekvenciáját (a rekombináns PKCα, β és δ esetében kb. 80 kDa-nál kaptunk immunjelet, míg a rekombináns PKCε esetén szintén 90 kDa-nál). **B)** Az overexpresszió mértékének meghatározásához a kontroll (K) és transzfektált (T) sejteken szintén Western blottot hajtottunk végre, de ezesetben a transzfektált izoformára specifikus anti-PKC antitestek felhasználásával. **C)** Az transzfektált és a kontroll (üres vektort tartalmazó, K) sejtek kináz aktivitásának meghatározásakor a ³²P beépülését mértük hiszton III (H-III) és miozin könnyű-lánc-kináz 20 (MLCK20) szubsztátok felhasználásával. A pontok három párhuzamosan vizsgált minta átlag ± SEM értékeit reprezentálják. Három ismeltelt meghatározás azonos eredményre vezetett.

A PKC izoenzimek rekombináns overexpressziójának hatása HaCaT sejtek morfológiájára

A PKC izoformák overexpressziója eltérően befolyásolta a HaCaT keratinocyták morfológiáját. Amint az a 10. ábrán látható, a kontroll (üres vektorral transzfektált) HaCaT sejtek megszokott, karakterisztikus macskakő rajzolata drámaian megváltozott az nPKC ϵ overexpressziójának hatására; ezen sejtek fibroblast-szerű, orsó alakú struktúrát kezdtek mutatni. Ezenfelül a cPKC β -t overexpresszáló sejtek alakja is megnyúltabbá vált (bár kifejezett nyúlványokat esetükben nem láthattunk) és sokkal nagyobb denzitású szigetekkéket formáltak a tenyésztés során. Az nPKC δ és cPKC α overexpresszója nem járt drámai morfológiai változásokkal, bár az nPKC δ -t overexpresszáló sejtek megjelenése mintha még jobban hasonlított volna a macskakő rajzolatára.



10. ábra A különféle PKC izoformák rekombináns overexpressziója eltérő módon változtatja meg a HaCaT sejtek morfológiáját

Az ábrán látható felvételek fáziskontraszt mikroszkóppal készültek (nagyítás, 200 $\times$) az egyes izoenzimeket overexpresszáló és üres vektort tartalmazó kontroll (K) HaCaT sejtekről.

A PKC izoenzimek rekombináns overexpressziójának hatása HaCaT sejtek proliferációjára és differenciálódására

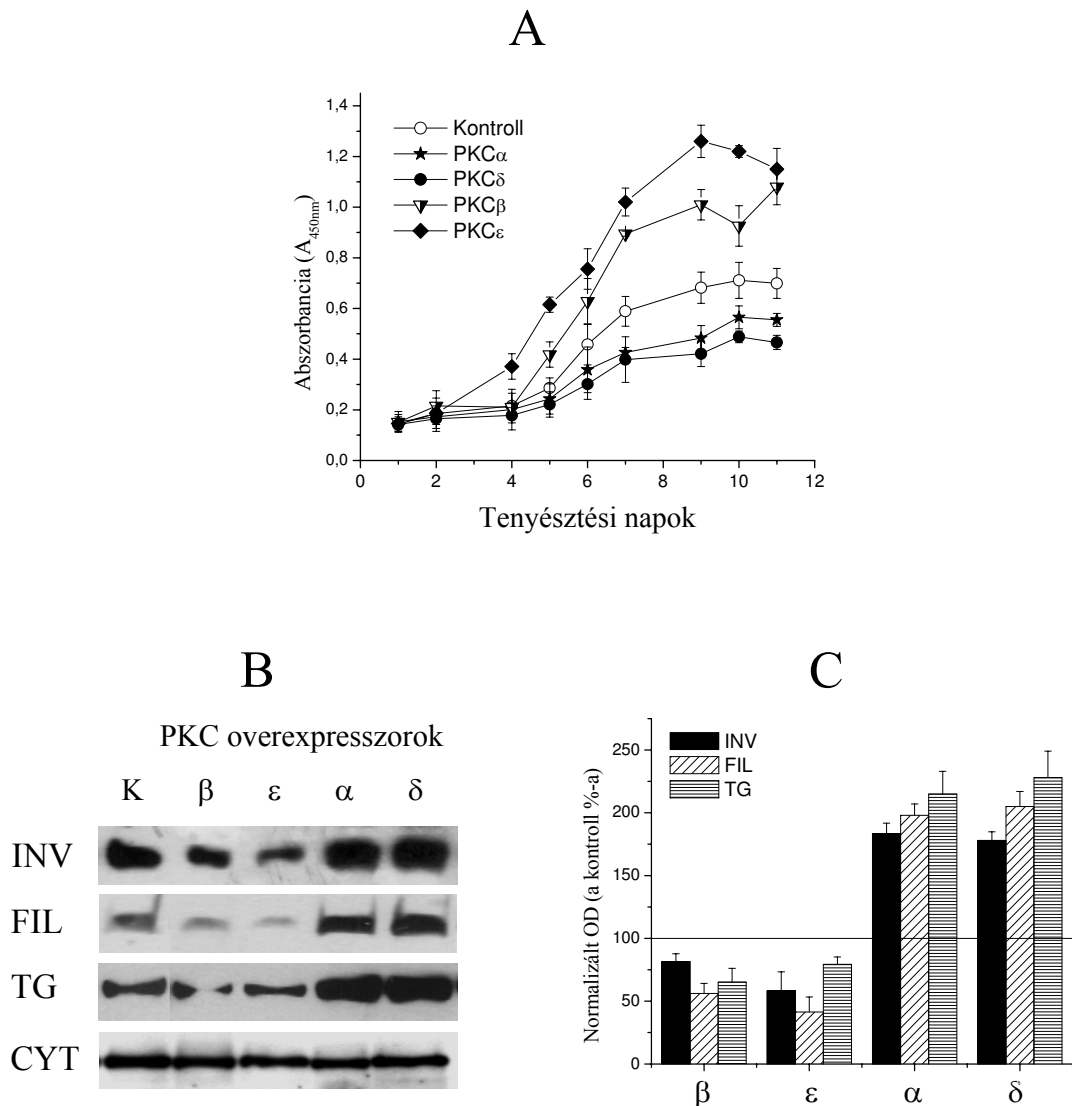
Ezután megvizsgáltuk a PKC izoformák overexpressziójának hatását a HaCaT sejtek proliferációjára. Amint az a BrdU assay-kból (11./A. ábra), valamint a standard növekedési görbék (1. táblázat) elemzéséből kiderült, a PKC izoformák overexpressziója jelentősen megváltoztatta HaCaT keratinocyták proliferációját. A cPKC α és az nPKC δ overexpressziója lecsökkentette a sejtek növekedését. Ezzel ellentétben, a cPKC β -t és az nPKC ϵ -t overexpresszáló keratinocyták a kontroll (üres vektorral transzfektált) sejtekhez képest erőteljesebb proliferációt mutattak.

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

Izoforma	A sejtproliferáció <i>in vitro</i> vizsgálata		A tumorigenezis <i>in vivo</i> vizsgálata		
	Kettőződési idő (h)	Szaturáció denzitás (10 ⁵ sejt/cm ²)	Átlagos tumorméret (mm)	Mitózisok száma	Ki-67+ sejtek százaléka
Kontroll	23,2 ± 2,5	1,4 ± 0,2	7×8×4,3	6,2 ± 1,0	25,2 ± 2,1
cPKCα	27,4 ± 3,2	1,0 ± 0,2	4,3×4×2,3	3,6 ± 0,5	13,2 ± 2,3
nPKCδ	30,5 ± 4,3	0,8 ± 0,1	4,6×4,3×2	4 ± 0,3	11,4 ± 3,1
cPKCβ	16,5 ± 3,3	2,1 ± 0,1	11×8,3×4,3	16 ± 1,2	34,9 ± 4,5
nPKCϵ	13,2 ± 3,9	2,8 ± 0,2	16×12×5,3	19 ± 2,8	41,4 ± 3,9

Az „Anyagok és módszerek” fejezetben megadott paramétereket vizsgáltuk. Az eredményeket átlag ± SEM formában adtuk meg, kivéve az átlagos tumorméret esetében, ahol csoportonként három-négy tumor átlagolt háromdimenziós méretét tüntettük fel.

A proliferációs folyamatok különbségeit a kultúrák átlagos kettőződési idejének és szaturációs denzitásának meghatározásával is számszerűsíthettük. A BrdU assay-kben kapott eredményeinkkel jó összhangban a cPKC α -t és az nPKC δ -t overexpresszáló sejtekre a megnyúlt kettőződési idő, valamint a lecsökkent szaturációs denzitás volt jellemző (1. táblázat).



11. ábra A különböző PKC izoformák rekombináns overexpressziója eltérő módon változtatja meg HaCaT sejtek proliferációját és differenciálódását

A) A HaCaT sejteket 1000 sejt/well denzitásban szélesztettük, majd a proliferáció vizsgálatára minden napon BrdU assayt végeztünk az “Anyagok és módszerekben” leírt módon. Az egyes pontok négy párhuzamosan vizsgált minta átlag $\pm$ SEM értékeit reprezentálják. Három ismételt meghatározás azonos eredményre vezetett. **B)** Az egyes izoenzimekkel stabilan transzfektált és üres vektort tartalmazó (K) HaCaT sejteken Western blotot készítettünk az “Anyagok és módszerekben” ismertetett módon. A kísérlethez egérben termeltetett elsődleges antitesteket használtunk a differenciálódási markerek; azaz az involucrin (*INV*), fillagrin (*FIL*) és a keratinocita-specifikus transzglutamináz-1 (*TG*) kimutatására. A kísérletek során, a proteintartalom ellenőrzése végett, a membránokat egyúttal egérben termeltetett cytochrome-C ellenes antitesttel is megfestettük (*CYT*). Az ábra 3-4 hasonló eredményt szolgáltató kísérlet egyikét mutatja. **C)** Az egyes PKC izoenzimekkel overexpresszált sejtek differenciálódási markereinek expresszióját kvantitatív denzitometriával (optikai denzitás, OD) határoztuk meg. Ennek során az adott marker immunjelét denzitométerlünk, majd ezen értéket a kontroll (üres vektossal transzfektált) sejtekből származó minta jelintenzitására (mint 100 %-ra) normalizáltuk. Az ábrán differenciálódási markerekként 3-4 független kísérlet eredményei láthatók átlag $\pm$ SEM formában.

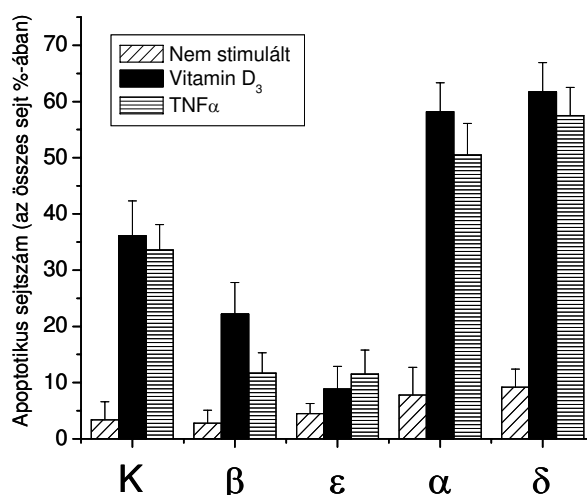
Ezzel szemben a cPKC β -t és az nPKC ε -t overexpresszáló sejtek szaturációs denzitása jelentősen megnőtt, míg kettőződési ideje lecsökkent a kontroll sejtekhez képest (1.táblázat).

A differenciálódás nyomonkövetéséhez megvizsgáltuk bizonyos keratinocytaspecifikus differenciálódási markerek expressziós szintjét a PKC overexpresszáló sejtekben. Mivel az nPKC δ -t overexpresszáló sejtek igen gyakran nem érték el a konfluencia állapotát és proliferációjuk kb. 80–90 %-os konfluenciánál abbamaradt (nem mutatva) – amely jelenség az nPKC δ -t overexpresszáló sejtek szupresszált növekedési kapacitására is utal(hat) –, összehasonlítható adatok gyűjtéséhez minden sejtkulturát 80–85 %-os konfluenciánál arattunk le, és azonos mennyiségű proteint tartalmazó mintákat felhasználva, SDS-PAGE után, a különböző markerek expressziójának mértékét Western blottal vizsgáltuk.

Amint a 11./B. és C. ábrán látható, a cPKC α -t és az nPKC δ -t overexpresszáló sejtekben a késői-terminális differenciálódási markerek szintje megemelkedett, míg a cPKC β és az nPKC ε izoformát overexpresszáló keratinocytákban a differenciálódási markerek szintje lecsökkent a kontroll HaCaT sejtekhez képest.

A PKC izoenzimek rekombináns overexpressziójának hatása HaCaT sejtek apoptózisára

Több PKC izoformáról felvetették, hogy kulcsszerepet játszhatnak különféle anyagok által indukált apoptotikus folyamatokban (Gutcher és mtsai, 2003). Ezért megvizsgáltuk két ismert apoptózist indukáló anyag – az 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ és TNF α (Müller-Wieprecht és mtsai, 2000) – hatását a különféle PKC izoenzimeket overexpresszáló sejteken (12. ábra).



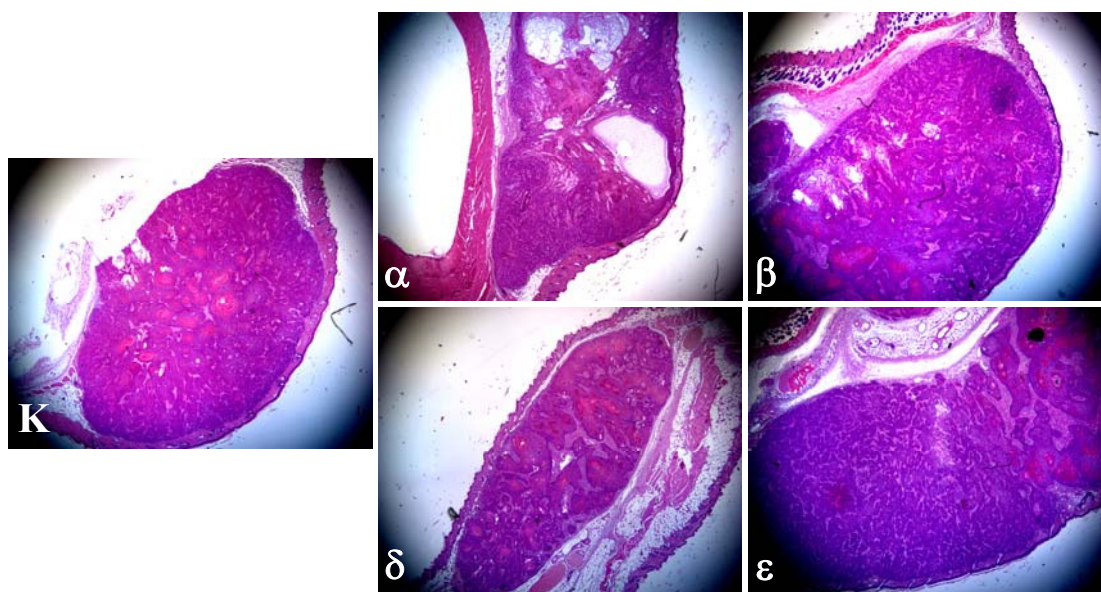
12. ábra A különféle PKC izoformák rekombináns overexpressziója eltérő módon változtatja meg HaCaT sejtek apoptózisát

A stabilan transzfektált, valamint az üres vektort tartalmazó (kontroll, K) HaCaT sejteket a tenyésztő médiummal (nem stimulált), 10 μM $1\alpha,25\text{-dihydroxivitamin D}_3$ -mal ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), illetve 50 nM tumor necrosis faktor- α -val ($\text{TNF}\alpha$) két napon keresztül kezeltük, majd az apoptózist annexin-V meghatározásán alapuló áramlásos citometriás vizsgálattal tanulmányoztuk. Az ábra az apoptotikus sejtek számát mutatja a teljes sejtszámhoz viszonyítva, három reprezentatív kísérlet átlag $\pm$ SEM értékeit feltüntetve.

Az annexin V-alapú áramlásos citometriás vizsgálat alapján nem volt szignifikáns eltérés a bazális apoptózis mértékében a kontroll, valamint a cPKC β -t és az nPKC ϵ -t overexpresszáló sejtek esetében. Ezzel szemben az nPKC δ izoezimmel transzfektált sejtekben és – bár kisebb mértékben, de a cPKC α -t overexpresszáló sejtekben is – a bazális apoptotikus ráta magasabb volt, mint a kontroll sejtek esetében. Ezen felül a cPKC α , valamint az nPKC δ overexpressziója a kontroll sejtekhez képest megnövelte a transzfektált sejtek érzékenységét a 10 μM $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, valamint az 50 nM $\text{TNF}\alpha$ indukálta apoptózis iránt, míg a cPKC β és az nPKC ϵ overexpresszorok ezen anyagok hatásával szemben kisebb szenzitivitást mutattak, mint a kontroll sejtek.

Az PKC izoformák overexpressziójának hatása a tumorigenezisre SCID egerekben

Végezetül a tumorigenezisre, azaz az *in vivo* sejtproliferációra irányuló vizsgálatokban meghatároztuk az egyes PKC izoenzimeket overexpresszáló sejtek viselkedését. A különböző PKC izoformákat overexpresszáló (valamint kontroll) HaCaT sejtek szuszpenzióját ($1-2 \times 10^6$ élő sejt/200 μ l) SCID egerekbe injektáltuk (minden csoportban három-négy egér), majd harminc nap elteltével meghatároztuk a kialakult tumorok jellemzőit.



13. ábra Az egyes PKC izoformákat overexpresszáló HaCaT sejtek eltérő tulajdonságú tumorokat indukálnak SCID egerekben.

A különböző PKC izoformákkal, valamint a kontroll (K) üres vektorral stabilan transzfektált HaCaT 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 hematoxinil-eozinnal festettük meg. Eredeti nagyítás: 20 $\times$.

A HE-festett metszeteken látható, hogy a kontroll HaCaT sejtek egy bazális sejtekben gazdag, a periférián expanszív növekedést mutató tumort formálnak, centrálisan élénk sejteréssel és differenciálódással (keratin gyöngyök, dyskeratoticus sejtek, néha cisztaképződés) (13. ábra). A proliferációt, valamint a differenciálódást mutató területek relatív nagysága megközelítőleg egyformának mutatkozott. Az eltérő PKC izoformákat overexpresszáló HaCaT sejtek egerekbe injektálása alapvetően nem

változtatta meg a kialakult tumorok fő hisztológiai jellemzőit. Azaz minden egyes tumor megtartotta expanszív növekedési tulajdonságát (környezetét nem infiltrálva, benignusan növekedett), valamint azt a szövettani jellegzetességét, hogy a tumor centrumában a sejtek differenciálódása észlelhető, a periférián pedig erőteljes proliferáció. Mindazonáltal a legnagyobb jelentőséggel azon felfedezésünk bírt, hogy a különböző izoenzimok esetében a tumorok átlagos méretében, az osztódó sejtek számában, valamint (a szövettani metszeteken) a proliferációt és a differenciálódást mutató területek relatív arányában jelentős különbségeket tapasztaltunk. Az nPKC ϵ és a cPKC β overexpressziója jelentősen fokozta a tumorok növekedési ütemét, amint az a megnövekedett tumorméretekből, valamint az osztódó sejtek számának megemelkedéséből is kiderült (1. táblázat). Ezen túlmenően, a proliferáló területek relatív aránya a differenciálódó területekhez képest szintén megemelkedett ezen tumorok esetében (a nPKC ϵ -t és a cPKC β -t overexpresszáló HaCaT sejtek által indukált tumorok esetén a szövettani metszetek területének több mint 70 %-án a proliferáló területek domináltak). Ezzel szemben a cPKC α és az nPKC δ overexpresszorok által indukált tumorok esetén az átlagos tumorméret és a mitózisok száma is lecsökkent, valamint ezen daganatok esetében a differenciálódó területek domináltak (a szövettani képen a tumor több mint 70 %-át uralták) (13. ábra és 1. táblázat).

A PKC overexpresszor sejtek tumorigenezisre kifejtett eltérő tulajdonságait a tumorok Ki-67 pozitív (azaz proliferáló) sejtjeinek megszámlálásával is bizonyítottuk. Amint az 1. táblázat adatai mutatják, a kontroll sejteknél tapasztaltakkal összehasonlítva, az nPKC ϵ -t és a cPKC β -t overexpresszáló sejtek által okozott tumorokban a Ki-67 pozitív (proliferáló) sejtek száma megemelkedett, ugyanakkor a cPKC α és az nPKC δ overexpresszorok esetében ez a szám lecsökkent.

MEGBESZÉLÉS

A HaCaT keratinocyták PKC izoenzimintázata, valamint annak változása a sejtek proliferációja és differenciálódása során

Vizsgálataink során először a HaCaT keratinocyták PKC izoenzimkészletét írtuk le. Kimutattuk, hogy a HaCaT sejtek számos PKC izoenzimet expresszálnak: a cPKC α -t és β -t; a nPKC δ -t, ε -t, η -t és θ -t; valamint az aPKC ζ -t (2. és 3. ábra). Ez a mintázat különbözött attól, amit Geiges és mtsai (1995) korábban dokumentáltak (az irodalomban fellelhető egyetlen ilyen jellegű vizsgálat során), hiszen ők a PKC α , δ , ε , és ζ jelenlétét, ugyanakkor a PKC β , θ , és η hiányát írták le. Mivel 1) a fent említett izoenzimek kimutatását mind Western blot, mind immuncitokémiai technikák alkalmazásával is elvégeztük; 2) az általunk használt antitestek különböztek a Geiges munkacsoportja által alkalmazottaktól; 3) nem publikált kísérleteink során ezen izoenzimek jelenlétét egy másik gyártótól származó monoklonális antitestek alkalmazásával is kimutattuk; úgy hisszük, hogy a fenti eltérő eredmények főként technikai különbségekre vezethetők vissza.

Általánosan elfogadott, hogy a NHEK a PKC α , δ , ε , η és ζ izoformákat expresszálják, ugyanakkor a PKC β , γ és μ jelenlétét is dokumentálták korábban (Fischer és mtsai, 1993; Fisher és mtsai, 1993; Rennecke és mtsai 1996). Mivel a nPKC θ volt az egyetlen izoenzim, melyet NHEK-ban nem találtak meg (ugyanakkor mi sikerrel mutattuk ki HaCaT sejtekben, 2. és 3. ábra), eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a HaCaT keratinocyták PKC izoenzimintázata nagyon hasonló a NHEK-ben találhatóhoz.

Ugyanakkor amennyiben megvizsgáltuk, hogy milyen módon változik az egyes izoenzimek kifejeződése, valamint szubcelluláris lokalizációja a sejtek

proliferációja és differenciálódása során, néhány jelentős különbséget is találtunk a HaCaT keratinocyták és a NHEK között. A HaCaT sejtek esetében az egyes izoenzimek expressziója eltérő módon változott a tenyésztés során (3. ábra). Az nPKC δ expressziója növekedett a proliferációval és differenciálódással, míg az nPKC ϵ szintje bifázisos mintázatot mutatott; azaz expressziója folyamatosan nőtt a proliferáló sejtekben, míg szintje folyamatosan csökkent (majd eltűnt) a differenciálódással párhuzamosan. A többi izoforma (cPKC α és β ; nPKC η és θ ; aPKC ζ) megjelenése nem változott a tenyésztési idő előrehaladtával.

Irodalmi adatokból kiderült, hogy NHEK-ban *in vitro* a PKC izoenzimek expressziójának szintje nem változott jelentősen a nagy sejtdenzitás által kiváltott differenciálódás során (csak a cPKC α szintje növekedett minimálisan) (Lee és mtsai, 1998), ugyanakkor *in vivo* a nPKC η jelentős mértékben a differenciált rétegek keratinocytáiban expresszáldott (Koizumi és mtsai, 1993). Ehhez nagyon hasonlóan, NHEK-ban és egér keratinocytákban az $[Ca^{2+}]_e$ megemeléssel kiváltott differenciálódási program során (Denning és mtsai, 1995; Matsui és mtsai, 1992), valamint a rekonstituált epidermis differenciálódó keratinocytáiban (Gherzi és mtsai, 1992) jelentősen megváltozott a PKC izoenzimek expressziója és aktivitása a differenciálódás során.

A HaCaT sejtek és a NHEK között az egyik legjelentősebb különbséget ugyanakkor akkor tudtunk kimutatni, amikor az egyes PKC izoenzimek szubcelluláris lokalizációját vizsgáltuk a tenyésztés során. Konfokális mikroszkópia segítségével kimutattuk, hogy a HaCaT keratinocytákban a jelenlévő izoenzimek lokalizációja nem változott (adat nem mutatva), ellentétben a humán és egér keratinocytákkal (Denning és mtsai 1995; Lee és mtsai, 1998), melyekben bizonyos izoformák transzlokálódtak a differenciálódás során. Ez a különbség egyrészt adódhat a HaCaT sejtekben

kifejeződő PKC izoformák jellegéből (nevezetesen, inkább a PKC izoenzimek expressziós mintázata, mintsem azok lokalizációja változott a differenciálódással, 3. ábra), másrészt az intracelluláris lokalizáció vizsgálatára használt eltérő kísérletes megközelítésekéből is (azaz, amíg mi immunfestést követően konfokális mikroszkópiát alkalmaztunk, addig mások szubcelluláris frakcionálást követő Western blot technikával elemezték a jelenséget).

A PKC rendszer aktiválása PMA-val terminális differenciálódást indukál

A PKC rendszer izoenzimjeinek leírása után arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen hatással bír az általános PKC aktivátor PMA a HaCaT keratinocyták proliferációjára és differenciálódására. Megállapítottuk, hogy a forbol-észter – specifikusan hatva az érzékeny PKC izoenzimekre (lásd alább, 7. ábra) – meggátolta a HaCaT sejtek proliferációját (5. ábra), lecsökkentette a korai differenciálódási marker K10 expresszióját, valamint megnövelte a késő-terminális differenciálódási markerek (INV, FIL, TG) kifejeződését (6. ábra). Ezen túlmenően, a PMA kezelés a pre-konfluens kultúrákban (de nem a már poszt-konfluens, azaz differenciálódó sejtekben) az $[Ca^{2+}]_i$ növekedését váltotta ki (4. ábra), mely eredmény szintén a forbol-észter differenciálódást indukáló hatására utal. Ezen adatok arra engednek következtetni, hogy – hasonlóan a NHEK esetében leírtakhoz (Liew és mtsai, 1992; Matsui és mtsai, 1993, 1996) – a forbol-észter alkalmazása terminális differenciálódást indít el a HaCaT keratinocytákban is.

Megállapítottuk azt is, hogy a PMA eltérő izoenzimek különböző mértékű befolyásolása (azaz down-regulációja) révén fejtette ki celluláris hatásait a proliferáló (proliferáció gátlása) és a differenciálódó (terminális differenciálódás indukciója) HaCaT keratinocytákon (7. ábra). A proliferáló sejtekben a PMA praktikusán az

összes szenzitív (cPKC és nPKC) izoenzimet down-regulálta (csak a nPKC η mutatott igen kisfokú változást a PMA hatására), habár a down-reguláció mértéke, valamint a PKC izoformák PMA-val szemben mutatott érzékenysége (melyet az eltérő dózis-hatás viszonyok mutattak) meglehetősen eltérő volt az egyes PKC izoformák esetében. A differenciálódó sejtekben ugyanakkor – habár a PKC α , β és θ izoenzimeket a forbol-észter itt is down-regulálta (ugyancsak eltérő mértékben és különböző dózis-hatás összefüggést mutatva) – a nPKC δ és η szintjét a PMA kezelés alig módosította. Ezen túlmenően azon izoenzimek közül, melyek mind a proliferáló, mind a differenciálódó sejtekben down-regulálódnak PMA hatására, a cPKC α jobban down-regulálódott a differenciálódó sejtekben, míg a nPKC θ szintje inkább a proliferáló sejtekben csökkent (a cPKC β hasonlóan viselkedett mindkét kultúrában). Úgy tűnik tehát, hogy a nagy sejtdenzitás által indukált differenciálódási program beindulásával a legtöbb PKC izoenzim (kivéve a cPKC β) PMA iránt mutatott érzékenysége megváltozott, mely az egyes PKC izoformák fenti folyamatokat szabályozó aktivitásában bekövetkező lehetséges változásokra utalhat.

Amennyiben feltételezzük, hogy egyes izoenzimek az adott sejtben különböző és gyakran ellentétes szereppel bírnak bizonyos sejtfolyamatok szabályozásában (Murray és mtsai, 1993; Mischak és mtsai, 1993; Brodie és mtsai, 1998), a PKC izoformák eltérő érzékenysége a PMA hatásával szemben magyarázatot adhat a különböző dózis-hatás viszonyok érvényesülésére a PMA által kifejtett a proliferáció-gátlásban, illetve az egyes differenciálódási markerek expressziójának befolyásolásában. Például, a proliferációs kísérletekben a PMA jellegzetes “U-alakú” görbe szerint fejtette ki gátló hatását; azaz, a 100 nM PMA hatásosabbnak bizonyult a proliferáció csökkentésében, mint a 1 μ M-os koncentráció. A fenti hipotézis tükrében ezt úgy (is) magyarázhatjuk, hogy a két PMA dózis más-más PKC izoenzim

expressziós mintázatot hozott létre az izoformák eltérő down-regulációja révén. Így ha az 1 μ M PMA (ellentétben a 100 nM hatásával) olyan PKC izoenzim(ek) aktivitását csökkentette, mely(ek) gátolják(k) a proliferációt és/vagy olyan izoformá(k) aktivitását növelte, mely(ek) fokozzák a sejtnövekedést, akkor ez a magasabb koncentrációjú PMA kevésbé kifejezett proliferációt gátló hatásában nyilvánulhat(ott) meg.

A PKC izoenzimek specifikus szerepe a proliferáció, a differenciálódás, az apoptózis, valamint a tumorgenezis szabályozásában HaCaT sejtekben

Ezen fent bemutatott adatok – jó összhangban az irodalomban fellelhető, főként a NHEK-ra vonatkozó nagyszámú ismerettel (Lee és mtsai, 1997; Lee és mtsai, 1998; Li és mtsai, 1999; Bikle és mtsai, 2001; Jansen és mtsai, 2001; Neill és mtsai, 2003) – egyértelműen alátámasztották azt a hipotézist, hogy a PKC rendszer központi szerepet játszik számos keratinocyta-specifikus sejtfolyamat regulációjában HaCaT sejtekben is. Ezenfelül eredményeink arra is rámutattak, hogy bizonyos izoenzimek (elsősorban az nPKC δ és η) akár specifikus módon is képesek a sejtfolyamatok szabályozására. A tézisek második részében bemutatott kombinált farmakológiai, valamint molekuláris biológiai kísérletek szükségeltettek ugyanakkor ezen szabályozó mechanizmusok pontos azonosításához, valamint a izoforma-specifikus szerep részletes tisztázásához.

Ezen kísérletes eredményeink interpretálásának egyik kulcskérdése az volt, hogy a HaCaT sejtekkel elvégzett kísérleteink következtetései mennyire relevánsak az NHEK-hoz viszonyítva. A keratinocyták biológiai folyamatainak egyik leginkább tanulmányozott PKC izoenzimjéről, a cPKC α -ról korábban már kimutatták, hogy központi szerepet játszik a kalcium- és a konfluencia-indukálta terminális differenciálódási folyamatokban egér és humán keratinocytákban (Lee és mtsai, 1997; Lee és mtsai, 1998; Bikle és mtsai, 2001; Jansen és mtsai, 2001; Neill és mtsai, 2003;

Zang és mtsai, 2003). Erről az izoformáról NHEK esetében még azt is kimutatták, hogy – hasonlóan az általunk HaCaT keratinocytákban tapasztaltakhoz (7. ábra) – forbol-észterek hatására gyorsan és jelentősen down-regulálódik (Lee és mtsai, 1998). Ezen folyamatról úgy tartják, hogy valószínűleg kulcsszerepe lehet a fenti anyagok terminális differenciálódást okozó hatásának közvetítésében. Molekuláris biológiai kísérleteinkben kimutattuk, hogy a cPKC α overexpressziója fokozta a differenciálódást, valamint az apoptózist kiváltó ágensek iránt mutatott érzékenységet, ugyanakkor meggátolta a sejtproliferációt és a tumornövekedést (11–13. ábra). Ezen eredményeink tehát arra utalnak, hogy – hasonlóan az NHEK sejtekben betöltött szerepéhez – a cPKC α központi helyet foglal el HaCaT keratinocytákban is a proliferáció negatív, míg a differenciálódás pozitív szabályozásában.

A cPKC α esetében kapott eredményeinket (az apoptózis és a differenciálódás stimulálása; az *in vitro* és *in vivo* sejtproliferáció gátlása) összehasonlítva azokkal az adatokkal, melyeket a cPKC izoformák inhibitorával, a Gö6976-tal kaptunk (azaz mind a proliferáció, mind a differenciálódás gátlása, 8. ábra), felmerült, hogy a cPKC β (egy másik, HaCaT sejtekben előforduló cPKC izoforma, 2. és 3. ábra), melyet a Gö6976 szintén gátolt, a fenti folyamatokat ellentétes irányban szabályozhatja. Ezt alátámasztva kimutattuk, hogy a cPKC β -t overexpresszáló sejtek proliferációja, valamint tumort indukáló hatása felerősödött, míg a differenciálódás, valamint az apoptotikus folyamatok gátlódtak a kontroll HaCaT sejtekhez képest (11.-13. ábra). Ezen eredmények jó összhangban álltak korábbi adatokkal, melyek szerint az egyik leggyakoribb hyperproliferatív megbetegedésben, a psoriasisban – ahol a differenciálódás és a proliferáció finom egyensúlya felborul – a cPKC β expressziós szintje jelentősen megváltozott a keratinocytákban (Fisher és mtsai, 1993).

A Gö6976 alkalmazásával nyert adataink (8. ábra) a PKC enzimesalád konvencionális csoportjába (cPKC) tartozó izoformák antagonistá szerepének egy további fontos tulajdonságára világítottak rá. Abban az esetben ugyanis, ha a cPKC α a differenciálódást stimulálja, de a növekedést gátolja; és fordítva, a cPKC β a proliferációt serkenti, valamint a differenciálódást gátolja, akkor a Gö6976 anyag (mely mind a cPKC α -t, mind a cPKC β -t gátolja) proliferációra és differenciálódásra kifejtett gátló hatását (11-13. ábra) csak úgy magyarázhatjuk, hogy a két izoenzim stimuláló hatása (a cPKC α -nak a differenciálódásra és az apoptózisra; a cPKC β -nak pedig a proliferációra és a tumorigenezisre) effektívebb, mint az ellentétes folyamatokra kifejtett gátló hatásuk. Mindazonáltal adataink egyértelműen bizonyítják a hasonló aktivációs mechanizmussal rendelkező (ez esetben kalcium- és forbolészter-dependens) PKC izoformák ellentétes szabályozó szerepét a HaCaT keratinocyták különböző sejtfolymataiban.

A novel nPKC izoformák vizsgálata során drámaian hasonló jelenséget figyelhattunk meg. Az irodalmi adatok alapján a nPKC ϵ számos sejtípus estében bizonyult a sejtproliferáció kulcsfontosságú pozitív regulátorának (Mischak és mtsai, 1993; Goodnight és mtsai, 1994; Brodie és mtsai, 1998; Gutcher és mtsai, 2003). A nPKC ϵ overexpressziójának esetében kimutatták azt is, hogy az patológiás proliferációhoz (hyperproliferatív transzformációhoz) vezet, míg az enzim down-regulációja, illetve domináns negatív mutánsának overexpressziója a proliferáció gátlódását, valamint a differenciálódás indukcióját eredményezte (Mischak és mtsai, 1993; Goodnight és mtsai, 1994; Brodie és mtsai, 1998). Ezenfelül a nPKC ϵ -ról nemrégiben bebizonyosodott, hogy szerepet játszik transzgenikus egerek bőrtumorainak kialakulásában is (Jansen és mtsai, 2001). Mivel a nPKC ϵ -ról jelen kísérleteinkben sikerült kimutatnunk, hogy – csakúgy mint az NHEK-ban (Zang és

mtsai, 2003) – a HaCaT sejtek esetében is kizárólag a proliferáló sejtekben expresszálódik és a differenciálódó sejtekben nincs jelen (3. ábra), a 11-13. ábrákon, valamint az 1. táblázatban bemutatott adatok (azaz, az nPKC ϵ -t overexpresszáló sejtek növekedési üteme és tumort indukáló hatása drámaian megnövekedett, míg differenciálódási és apoptotikus kapacitásuk lecsökkent) egyértelműen amellett szólnak, hogy ezen izoforma pozitívan regulálja mind az *in vitro*, mind az *in vivo* növekedési folyamatokat a HaCaT keratinocytákban.

A nPKC δ tekintetében eredményeink ezzel ellentétesnek adódtak, ugyanis ezen izoforma a differenciálódás és az apoptózis pozitív regulátoraként működött, ezzel párhuzamosan pedig gátló hatást fejtett ki a sejtproliferációra és a tumornövekedésre (11-13. ábra, 1. táblázat). Kimutattuk továbbá, hogy differenciálódó HaCaT keratinocytákban a nPKC δ expressziós szintje jelentősen megemelkedett (3. ábra). Számos kutatócsoport beszámolt arról, hogy NHEK-ban a nPKC δ aktivációja vagy overexpressziója meggátolta a sejtproliferációt, elősegítette a differenciálódási program beindulását (Li és mtsai, 1999), továbbá mind NHEK (Denning és mtsai, 1998, 2002; Li és mtsai, 1999), mind HaCaT sejtek (Fukunaga és mtsai, 2001) esetében számos apoptózist indukáló anyag hatását mediálta. Ezen túlmenően HaCaT sejtekben kimutatták azt is, hogy a Ha-ras overexpresszió okozta malignus transzformáció (azaz megnövekedett proliferációs kapacitás és lecsökkent differenciálódási tendencia) esetében a nPKC δ izoenzim eltűnt a sejtekből (Geiges és mtsai, 1995), valamint, hogy a kontroll HaCaT sejtek Rottlerinnel való kezelése megváltozott (proliferáló) fenotípus kialakulásához vezetett (Dietrich és mtsai, 2001). Ezen irodalmi adatokkal jó összhangban lévő eredményeink is arra utalnak, hogy az nPKC δ központi szerepet játszik a differenciálódás, valamint az apoptózis beindításában, illetve kifejlődésének elősegítésében.

Végezetül fontos megemlítenünk, hogy, legjobb tudomásunk szerint, a mi munkánk volt az irodalomban az első, amely a HaCaT sejtek tumort indukáló hatásáról számoltak be SCID egerekben. Kimutattuk, hogy a „nude” egerek esetében kapott eredményekkel ellentétben – ahol a HaCaT sejtek jellegzetes, pár hét után regrediáló cisztikus granulumokat formáltak (Boukamp és mtsai, 1988; Fusenig és Boukamp, 1998) –, SCID állatokban a HaCaT keratinocyták expanszívan növekedő, benignus tumorokat idéztek elő (13. ábra), melyek szövettanilag nagyon hasonlítottak a ras-transzfektált (de malignusan nem transzformált) HaCaT klónokkal beoltott egerek tumoraihoz (Breitkreutz és mtsai, 1991; Fusenig és Boukamp, 1998). Ezen adatok alapján tehát elmondhatjuk, hogy –hasonlóan más tumort indukáló sejttípus növekedési tulajdonságaihoz (Xie és mtsai, 1992; Taghian és mtsai, 1993; Kubota és mtsai, 1993) – a HaCaT sejtek tumort indukáló képessége erőteljesebben érvényesül SCID egerekben, mint „nude” egerekben. Mindazonáltal, mivel egyik PKC izoforma overexpressziója sem okozott malignus átalakulást (még a hyperproliferatív cPKC β -é vagy az nPKC ϵ -é sem), szemben a bizonyos Ha-ras transzfektáció malignitásával (Breitkreutz és mtsai, 1991; Fusenig és Boukamp, 1998), eredményeink arra utalnak, hogy habár bizonyos PKC izoformák *in vitro* és *in vivo* is stimulálják HaCaT keratinocyták növekedését, konstitutív kifejeződésük önmagában nem elegendő ezen sejtek malignus transzformációjához.

Összefoglalva tehát azt a következtetést vonhatjuk le, hogy bizonyos cPKC és nPKC izoformák a humán HaCaT keratinocyták *in vitro* és *in vivo* növekedésében, differenciálódásában, valamint apoptózisában betöltött izoforma-specifikus szerepe nagyon hasonló a korábban NHEK sejtek esetében már jellemzett folyamatokhoz. Mindezek alapján eredményeinket a NHEK-ra vonatkozóan is relevánsnak tekinthetjük.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben a protein kináz C (PKC) izoenzimek szerepét vizsgáltuk humán HaCaT keratinocyták sejtfolymatainak szabályozásában. Kimutattuk, hogy a sejtek jellegzetes izoenzimintázattal rendelkeznek (cPKC α , β ; nPKC δ , ϵ , η és θ ; aPKC ζ), mely jelentős mértékben változott a sejtek proliferációja és differenciálódása során. Bebizonyosodott az is, hogy az általános PKC aktivátor forbol-12-mirisztát-13-acetát, eltérő módon hatva az egyes izoformákra, meggátolta a HaCaT keratinocyták proliferációját, valamint terminális differenciálódást indukált. Különféle PKC inhibitorok alkalmazásával megállapítottuk, cPKC and nPKC izoformák együttes gátlása (GF109203X) nem változtatta meg a sejtproliferációt, ugyanakkor csökkentette a terminális differenciálódást. Ezzel ellentétben a cPKC izoenzimek gátlása (Gö6976) mind a sejtek proliferációját, mind differenciálódását jelentős mértékben csökkentette, míg a novel nPKC δ gátlása (Rottlerin) megnövelte a sejtek proliferációját, ugyanakkor lecsökkentette a differenciálódást. Molekuláris biológiai kísérleteinkben, melyek során különféle PKC izoformákat stabilan expresszáló HaCaT keratinocytákat állítottunk elő, megállapítottuk, hogy a cPKC α és nPKC δ overexpressziója meggátolta a HaCaT sejtek *in vitro* proliferációját és *in vivo* tumort indukáló képességét, ugyanakkor fokozta a sejtek differenciálódását és apoptózist. Ezzel szöges ellentétben a cPKC β és nPKC ϵ jelenléte fokozta a sejtek *in vitro* és *in vivo* növekedését, míg meggátolta azok differenciálódását és apoptózist. Mindezen adataink egyes cPKC és nPKC izoenzimek specifikus, ugyanakkor egymással ellentétes szerepére utalnak humán HaCaT keratinocyták sejtfolymatainak szabályozásában.

IRODALOMJEGYZÉK

- 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 Lett.* **402**:121–123
- 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 F. J., Blumberg P. M. (1997b) Both the catalytic and regulatory domains of protein kinase C chimeras modulate the proliferation properties of NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **272**:28793–28799
- Baier G., Telford D., Giampa L., Coggeshall K. M., Baier-Bitterlich G., Isakov N., Altman A. (1993) Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **268**:4997–5004
- Bikle D. D., Ng D., Tu C. L., Oda Y., Xie Z. (2001) Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **177**:161–171.
- Bíró T., Szabó I., Hunyadi J., Kovács L., Csernoch L. (1998) Distinct sub-populations in HaCaT cells as revealed by the characteristics of intracellular calcium release induced by phosphoinositide-coupled agonists. *Arch. Dermatol. Res.* **290**:270–276
- 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
- Bollag W. B., Ducote J., Harmon C. S. (1993) Effects of the selective protein kinase C inhibitor, Ro 31-7549, on the proliferation of cultured mouse epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **100**:240–246

- Bos J. D., Kapsenberg M. L. (1993) The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol. Today* **14**:75-78
- Boukamp P., Petrussevska R. T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N. E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell. Biol.* **106**:761-771
- Boukamp P., Popp S., Altmeyer S., Hulsen A., Fasching C., Ceremer T., Fusenig N. E. (1997) Sustained nontumorigenic phenotype correlates with largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromos. Cancer* **19**:201-214
- Breitkreutz D., Boukamp P., Ryle C. M., Stark H. J., Roop D. R., Fusenig N. E. (1991) Epidermal morphogenesis and keratin expression in c-Ha-ras-transfected tumorigenic clones of the human HaCaT cell line. *Cancer Res.* **51**:4402-4409
- 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
- Cacace A. M., Guadagno S. N., Krauss R. S., Fabbro D., Weinstein I. B. (1993) The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene* **8**:2095-2104
- 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
- Decker LV (ed) (2003). *Protein Kinase C*, Oxford Press, New York
- Denning M. F., Dlugosz A. A., Williams E. K., Szallasi Z., Blumberg P. M., Yuspa S. H. (1995) Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell. Growth Differ.* **6**:149-157
- Denning M. F., Wang Y., Nickoloff B. J., Wrone-Smith T. (1998) Protein kinase Cdelta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **273**:29995-30002
- Denning M. F., Wang Y., Tibudan S., Alkan S., Nickoloff B. J., Qin J. Z. (2002) Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV

- radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C. *Cell. Death Differ.* **9**:40-52
- Dietrich C., Gumpert N., Heit I., Borchert-Stuhltrager M., Oesch F., Wieser R. (2001) Rottlerin induces a transformed phenotype in human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**:575-579
- Dlugosz A. A., Yuspa S. H. (1993) Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J. Cell. Biol.* **120**:217-225
- Dlugosz A. A., Yuspa S. H. (1994) Protein kinase C regulates keratinocyte transglutaminase (TGK) gene expression in cultured primary mouse epidermal keratinocytes induced to terminally differentiate by calcium. *J. Invest. Dermatol.* **102**:409-414.
- Fischer S. M., Lee M. L., Maldve R. E., Morris R. J., Trono D., Burow D. L., Butler A. P., Pavone A., Warren B. (1993) Association of protein kinase C activation with ornithine decarboxylase in murine but not in human keratinocyte cultures. *Mol. Carcinog.* **7**:228-237
- Fisher G. J., Tavakkol A., Leach K., Burns D., Basta P., Loomis C., Griffiths C. E., Cooper K. D., Reynolds N. J., Elder J. T. (1993) Differential expression of protein kinase C isoenzymes in normal and psoriatic adult human skin: reduced expression of protein kinase C-betaII in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **101**:553-559
- Fuchs E. (1990) Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell Biol.* **111**:2807-2814
- Fukunaga M., Oka M., Ichihashi M., Yamamoto T., Matsuzaki H., Kikkawa U. (2001) UV-induced tyrosine phosphorylation of PKC delta and promotion of apoptosis in the HaCaT cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**:573-579
- Fusenig N. E., Boukamp P. (1998) Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol. Carcinog.* **23**:144-158
- Geiges D., Marks F., Gschwendt M. (1995) Loss of protein kinase C δ from human HaCaT keratinocytes upon ras transfection is mediated by TGF α . *Exp. Cell. Res.* **219**:299-303

- Gherzi R., Sparatore B., Patrone M., Sciutto A., Briata P. (1992) Protein kinase C mRNA levels and activity in reconstituted normal human epidermis: relationships to cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**:283-291
- 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
- Goodnight J. A., Mischak H., Kolch W., Mushinski J. F. (1995) Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIN 3T3 fibroblasts: isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J. Biol.Chem.* **270**:9991–10001
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**:3440-3450
- Gschwendt M., Müller H.-J., Kialbassa K., Zang R., Kittstein W., Rincke G. (1994) Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**:93–98
- 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
- Harding C. R., Scott I. R. (1983) Histidine-rich proteins (filaggrins): structural and functional heterogeneity during epidermal differentiation. *J. Mol. Biol.* **170**:651-673.
- Hegemann L., Wevers A., Bonnekoh B., Mahrle G. (1992) Changes of epidermal cell morphology and keratin expression induced by inhibitors of protein kinase C. *J. Dermatol. Sci.* **3**:103-110
- Hennings H., Michel D., Cheng C., Steinert P., Holbrook K., Yuspa S. H. (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* **19**:245-254
- Hunter T. (2000) Signaling-2000 and beyond. *Cell* **100**:113-127
- Jaken S. (1996) Protein kinase isozymes and substrates. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**:168-201.
- Jansen A. P., Dreckschmidt N. E., Verwiebe E. D., Wheeler D. L., Oberley T. D., Verma A. K. (2001) Regulation of the induction of epidermal ornithine

- decarboxylase and hyperplasia to the different skin tumor-promotion susceptibilities of protein kinase C alpha, -delta, and -epsilon transgenic mice. *Int. J. Cancer*. **93**:635-643
- Karen J., Wang Y., Javaherian A., Vaccariello M., Fusenig N. E., Garlick J. A. (1999) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces clonal expansion of potentially malignant keratinocytes in a tissue model of early neoplastic progression. *Cancer Res*. **59**:474-481
- Koizumi H., Kohno Y., Osada S., Ohno S., Ohkawara A., Kuroki T. (1993) Differentiation-associated localization of nPKC η , a Ca⁺⁺ independent protein kinase C, in normal human skin and skin diseases. *J. Invest. Dermatol*. **101**:858-863
- Kubota T., Yamaguchi H., Watanabe M., Yamamoto T., Takahara T., Takeuchi T. (1993) Growth of human tumor xenografts in nude mice and mice with severe combined immunodeficiency (SCID). *Surg. Today* **23**:375-377
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685
- Lázár J., Szabó T., Kovács L., Blumberg P. M., Bíró T. Distinct features of recombinant vanilloid receptor-1 expressed in various expression systems. *Cell. Mol. Life Sci*. **60**:2228-2240
- Lee Y. S., Dlugosz A. A., McKay R., Dean N. M., Yuspa S. H. (1997) Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C alpha in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes. *Mol. Carcinog*. **18**:44-53
- Lee Y. S., Yuspa S. H., Dlugosz A. A. (1998) Differentiation of cultured human epidermal keratinocytes at high cell densities is mediated by endogenous activation of the protein kinase C pathway. *J. Invest. Dermatol*. **111**:762-766
- Le Panse R., Coulomb B., Mitev V., Bouchard B., Lebreton C., Dubertret L. (1994) Differential modulation of human fibroblast and keratinocyte growth by the protein kinase C inhibitor GF 109203X. *Mol. Pharmacol*. **46**:445-451
- Li L., Lorenzo P. S., Bogi K., Blumberg P. M., Yuspa S. H. (1999) Protein kinase C δ targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by and adenoviral vector. *Mol. Cell. Biol*. **19**:8547-8558

- Liew F. M., Yamanishi K. (1992) Regulation of transglutaminase 1 gene expression by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, dexamethasone, and retinoic acid in culture human keratinocytes. *Exp. Cell. Res.* **202**:310-315
- 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 Gö 6976. *J. Biol. Chem.* **268**:9194-9197
- Matsui M. S., Chew S., DeLeo V. A. (1992) Protein kinase C in normal human epidermal keratinocytes during proliferation and calcium-induced differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **99**:565-571
- Matsui M. S., Illarda I., Wang N., DeLeo V. A. (1993) Protein kinase C agonist and antagonist effects in normal human epidermal keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **2**:247-256
- Matsui M. S., Wang N., DeLeo V. A. (1996) Ultraviolet radiation B induces differentiation and protein kinase C in normal human epidermal keratinocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **12**:103-108
- MacKintosh C., MacKintosh, R. W. (1994) Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* **19**:444-448
- Mehrel T., Hohl D., Rothnagel J. A., Longley M. A., Bundman D., Cheng C., Lichti U., Bisher M. E., Steven A. C., Steinert P. M., Yuspa S. H., Roop D. R. (1990) Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell* **61**: 1103-1112
- Mischak H., Goodnight J. A., Kolch W., Martiny-Baron G. M., Schachtele C., Kazanietz M. G., Blumberg P. M., Pierce J. H., Mushinski J. F. (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
- Mitev V., Miteva L. (1999) Signal transduction in keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **2**:96-108
- Murakami A., Chida K., Suzuki Y., Kikuchi H., Imajoh-Ohmi S., Kuroki T. (1996) Absence of down-regulation and translocation of the eta isoform of protein kinase C in normal human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **106**:790-794
- 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
- Müller-Wieprecht V., Riebeling C., Stooss A., Orfanos C. E., Geilen C. C. (2000) Bcl-2 transfected HaCaT keratinocytes resist apoptotic signals of ceramides, tumor necrosis factor α and $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃. *Arch. Dermatol. Res.* **292**:455-462
- Neill G. W., Ghali L. R., Green J. L., Ikram M. S., Philpott M. P., Quinn A. G. (2003) Loss of protein kinase C α expression may enhance the tumorigenic potential of Gli1 basal cell carcinoma. *Cancer Res.* **63**:4692-4697
- Nishizuka Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature* **334**:661-665
- Nishizuka Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**:607-614
- Ohba M., Ishino K., Kashiwagi M., Kawabe S., Chida K., Huh N. H., Kuroki T. (1998) Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of the η and δ isoforms of protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* **18**:5199-5207
- Ohno S., Akita Y., Hata A., Osada S., Kubo K., Kohno Y., Akimoto K., Mizuno K., Saïdo T., Kuroki T., Suzuki K. (1991) Structural and functional diversities of a family of signal transducing protein kinases, protein kinase C family; two distinct classes of PKC, conventional cPKC and novel nPKC. *Adv. Enzyme Regul.* **31**:287-303
- 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
- Owa T., Yoshino H., Yoshimatsu K., Nagasu T. (2001) Cell cycle regulation in the G1 phase: a promising target for the development of new chemotherapeutic anticancer agents. *Curr. Med. Chem.* **8**:1487-1503
- Ozawa K., Yamada K., Kazanietz M. G., Blumberg P. M., Beaven M. A. (1993) Different isozymes of protein kinase C mediate feedback inhibition of phospholipase C and stimulatory signals for exocytosis in rat RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* **268**:2280-2283

- Paramio J. M., Jorcano J. L. (1997) Role of protein kinases in the in vitro differentiation of human epidermal HaCaT cells. *Br. J. Dermatol.* **137**:44-50
- Pillai S., Bikle D. D. (1992) Adenosine triphosphate stimulates phosphoinositide metabolism, mobilizes intracellular calcium, and inhibits terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *J. Clin. Invest.* **90**:43-51
- Razin E., Szallasi Z., Kazanietz M. G., Blumberg P. M., Rivera J. (1994) Protein kinases C-beta and C-epsilon link the mast cell high-affinity receptor for IgE to the expression of c-fos and c-jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:7722-7726
- Rennecke J., Johannes F. J., Richter K. H., Kittstein W., Marks F., Gschwendt M. (1996) Immunological demonstration of protein kinase C μ in murine tissues and various cell lines. Differential recognition of phosphorylated forms and lack of down-regulation upon 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment of cells. *Eur. J. Biochem.* **242**:428-432
- 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
- Ryle C. M., Breitkreutz D., Startk H. J., Leigh I. M., Steinert P. M., Roop D., Fusenig N. E. (1989) Density-dependent modulation with synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HaCaT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation* **40**:42-54
- Schoop V. M., Mirancea N., Fusenig N. E. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **112**:343-353.
- Schroder W. T., Thacher S. M., Stewart-Galetka S., Annarella M., Chema D., Siciliano M. J., Davies P. J., Tang H. Y., Sowa B. A., Duvic M. (1992) Type I keratinocyte transglutaminase: expression in human skin and psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **99**:27-34
- Schweizer J., Winter H. (1983) Keratin biosynthesis in normal mouse epithelia and in squamous cell carcinomas. mRNA-dependent alterations of the primary structure of distinct keratin subunits in tumors. *J. Biol. Chem.* **258**:13268-13272
- Szallasi Z., Bogi K., Gohari S., Biro T., Acs P., Blumberg P. M. (1996) Non-equivalent roles for the first and second zinc fingers of protein kinase C δ . Effect of their mutation on phorbol ester-induced translocation in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **271**:18299-18301

- Taghian A., Budach W., Zietman A., Freeman J., Gioioso D., Suit H. D. (1993) Quantitative comparison between the transplantability of human and murine tumors into the brain of NCr/Sed-nu/nu nude and severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* **53**:5018-5021
- Thacher S. M., Rice R. H. (1985) Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell* **40**:685-695
- Toullec D., Pianetti P., Coste H., Bellevergue P., Grand-Perret T., Ajakane M., Baudet V., 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
- Watt F. M. (1983) Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **81**:100s-103s
- Xie X., Brunner N., Jensen G., Albrechtsen J., Gotthardsen B., Rygaard J. (1992) Comparative studies between nude and scid mice on the growth and metastatic behavior of xenografted human tumors. *Clin. Exp. Metastasis* **10**:201-210
- Zang L. C., Ng D. C., Bikle D. D. (2003) Role of protein kinase α in calcium induced keratinocyte differentiation: defective regulation in squamous cell carcinoma. *J. Cell. Physiol.* **195**:249-259

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A következőkben szeretnék köszönetet nyilvánítani mindazoknak, akik bármilyen módon segítségemre voltak az egyetemi doktori értekezést megalapozó kísérletek elvégzésében.

Először is **Dr. Kovács László** professzor úrnak, a DE OEC Élettani Intézet igazgatójának szeretnék köszönetet mondani, amiért lehetővé tette számomra, hogy az Élettani Intézet Sejt- és Molekuláris Biológiai Laboratóriumában elvégezhessem kísérleteimet, illetve biztosította az ehhez szükséges anyagi háttérrel.

Ugyancsak szeretném megköszönni **Dr. Bíró Tamásnak**, témavezetőmnek munkám során nyújtott útmutatásait, szakmai és baráti tanácsait, valamint türelmét a három év alatt felmerülő problémák megoldásában.

Ugyancsak hálával tartozom **Lázár Józsefnek** és **Czifra Gabriellának**, akik tanácsaikkal segítették munkámat.

Köszönöm **Dr. Vargáné Kis Ibolyának**, a sejtenyésztő laboratórium asszisztensének segítő tevékenységét és mindenre kiterjedő figyelmét.

Végül, de nem utolsósorban, az **Élettani Intézet valamennyi** külön meg nem nevezett **munkatársának** köszönöm munkám során nyújtott bármilyen segítségét.

KÖZLEMÉNYEK

AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

- 1) **Papp H.**, Czifra G., Lázár J., Gönczi M., Csernoch L., Kovács L., and Bíró T. (2003): Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol.* **12**:811-824. **IF: 2,303**
- 2) **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 (2003): 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: 5,259**

TOVÁBBI IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

- 3) 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: 2,283**
- 4) Gönczi M.; **Papp H.**, Bíró T.; Kovács L.; Csernoch L. (2002): Effect of protein kinase C on transmembrane calcium fluxes in HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **11**:25-33. **IF: 2,303**

IDÉZHETŐ ELŐADÁSKIVONATOK:

- 1) Bíró 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) Bíró 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) Bíró 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) Szentandrassy N., Gönczi M, **Papp H.**, Lázár J., Kovács L., Bíró T., and L. Csernoch (2002): Stretch activated channels and their regulation by protein kinase C in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **119(3)**:746
- 5) Lázár J., Czifra G., **Papp H.**, Marincsák R., Papp L., Kovács L., and Bíró T. (2002): Protein kinase C regulates the sensitivity of recombinant rat vanilloid receptor to capsaicin. *Acta Physiol. Hung.* **89(1-3)**:13
- 6) **Papp H.**, Bodó E., Lázár J., Czifra G., Kovács L., and Bíró T. (2002): Effects of pharmacological modification of protein kinase C on proliferation and differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Acta Physiol. Hung.* **89(1-3)**:348

- 7) Czifra G., **Papp H.**, Lázár J., Kern A., Kovács L., and Bíró T. (2002): PKC δ mediates the growth promoting effect of IGF-I on cultured human skeletal muscle cells. *Acta Physiol. Hung.* **89(1-3)**:278
- 8) Bíró 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
- 9) Czifra G., **Papp H.**, Lázár J., Kern A., Kovács L., and Bíró T. (2003): PKC δ mediates the growth promoting effect of IGF-I on cultured human skeletal muscle cells. *Neuromuscular Disord.* **13(7-8)**: 621
- 10) Bíró 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