

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Czifra Gabriella



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS -ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET**

**Debrecen
2006**

BEVEZETÉS

Az izomregeneráció

A harántcsíkolt izom egyik jellegzetes tulajdonsága, hogy nagyfokú *in vivo* és *in vitro* regenerációs képességgel rendelkezik, mely központi szerepet játszik a sérülést követő, valamint a posztnekrotikus izomújraépülésben (pl. izomdystrophiák, myopathiák, myositisek). Az *in vivo* izomregeneráció kiinduló forrása a szatellitasejtek. Fontos jellemzőjük, hogy specifikus ingerek hatására mitotikusan osztódni kezdenek (myoblastok kialakulása), DNS tartalmuk beépül a mitózisra már képtelen izomsejtek magjába, majd ezt követően (akár a sérült izomrosttal való) fúzió és differenciálódás után többmagvú izomsejteké olvadnak össze. Az izomregeneráció kiválóan modellezhető *in vitro* humán vázizomsejtek tenyésztésével. Ennek során az izombiopsziákból izolált szatellitasejtek és myoblastok proliferálnak, differenciálódnak és fuzionálnak, majd sokmagvú myotube-okat hoznak létre. Az *in vitro* vizsgálatok másik lehetséges módja szekunder tenyészetek létrehozása, melyek izomsejt eredetű sejtvonalakból indíthatóak, és megfelelő körülmények hatására a fentiekhez hasonló differenciálódási folyamat figyelhető meg bennük.

Az izomregeneráció eseményei az alábbi folyamatsorral jellemezhetők: a szatellitasejtek aktivációját az izomsérülés helyére bevándorló polimorfonukleáris leukociták és a szatellitasejtek közötti sejt-sejt interakció (integrinek, adhézions molekulák) indíthatja el. Ezzel párhuzamosan, az izomrostok és a szatellitasejtek által termelt máj növekedési faktor fokozza a sejtek proliferációját, valamint a sérülés helyére történő migrációját. Ezt követően az aktivált szatellitasejtek további proliferációját, differenciálódását és fúzióját számos egyéb növekedési faktor és citokin (pl. interleukinek) autokrin és parakrin módon létrehozott kapcsolata szabályozza.

A szatellitasejtek proliferációját és differenciálódását különféle jelátviteli útvonalakon keresztül ható izomspecifikus szabályozó faktorok is

befolyásolhatják. Ezen miogén regulációs faktorok aktivitását (melynek fokozódása izomspecifikus fehérjék termelődését indítja el) nagyban befolyásolja foszforilációs állapotuk, mely a fent említett növekedési faktorok és citokinek receptoraihoz kapcsolt jeltávíteli útvonalakon keresztül módosulhat.

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

Az inzulinszerű növekedési faktor-I (IGF-I) az inzulinnal nagyfokú szerkezeti homológiát mutató növekedési faktor. Számos szövettípus mellett megtalálható a harántcsíktott izomszövetben is, mint a szatellitasejtek terméke. Kimutatták, hogy az IGF-I az izom működésének egyik esszenciális növekedési faktora, hiszen jelenléte szükséges az izom fejlődéséhez és növekedéséhez. Az IGF-I ugyanis fokozza a génexpressziót, a DNS és protein szintézist, különféle transzport-mechanizmusok aktivitását, valamint a sejtek migrációját, proliferációját és differenciálódását. Bebizonyosodott emellett, hogy izomsérülések és különféle eredetű izomatropiák után az izomsejtekben megnő az IGF-I termelődése, mely maga után vonta a myoblastok fokozott proliferációját, fúzióját és differenciálódását. Ezen adatokat alátámasztandó megállapítást nyert továbbá, hogy különféle dystrophiában szenvedő betegek rekombináns humán IGF-I-gyel, valamint géntranszfer technikákkal történő kezelése jelentősen javította a beteg vázizom metabolizmusát és funkcióját. Úgy tűnik tehát, hogy az IGF-I az izomregeneráció folyamatainak szabályozásában is központi szereppel bír.

Általánosan elfogadott, hogy az IGF-I mitogén hatását az egy transzmembrán doménnel rendelkező, tirozin-kináz aktivitással bíró receptorához kapcsolódva fejtí ki. Vázizomsejtek esetében ugyanakkor a különböző jeltávíteli útvonalak és kinázok részvétele az IGF-I celluláris hatásainak kifejlődésében erősen fajfüggő jelenséget mutat. Különbözö munkacsoportok számoltak be arról, hogy patkány és egér vázizomsejt tenyészetekben az IGF-I hatását részben a mitogén aktivált protein kináz

(MAPK) útvonal, részben MAPK-független jeltáviteli mechanizmusok, így Akt/foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3-K) és a protein kináz C (PKC) rendszerek közvetíthetik.

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

A protein kináz C izoenzimek

A PKC izoenzimcsalád a szerin-threonin kinázok egyik jelentős képviselője. A mai napig 11 különböző PKC izoenzimet különböztettek meg, melyeket aktivációs mechanizmusaik és szerkezeti sajátágaik alapján 4 nagyobb csoportba sorolhatunk. A klasszikus csoportba (cPKC) a cPKC α , β I, β II és a γ izoenzimek tartoznak. Ezen izoformák közös jellemzője, hogy aktiválódásukhoz diacil-glicerolt (DAG) és kalciumot igényelnek. A második csoportba a kalcium-független, de DAG-függő novel nPKC δ , ϵ , η és a θ izoenzimek tartoznak. A harmadik csoportba az atípusos izoenzimek sorolhatók (aPKC), azaz az aPKC ζ és λ I. Jellemzőjük, hogy aktiválódásukhoz sem kalciumot, sem phorbol-észtert nem igényelnek. A negyedik csoportot egyetlen enzim a PKC μ (újabb nevén a PKD) alkotja, mely mind aktivációját, mind struktúráját tekintve rendhagyó izoformának tekinthető.

A PKC enzimek az élettani szabályozó folyamatok legszélesebb skáláját képesek befolyásolni. Alapvető és központi szereppel bírnak pl. a sejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában, az apoptózis folyamatsorában, illetve meghatározott sejtípusok által termelt mediátorok

(vazoaktív anyagok, növekedési faktorok, citokinek) szintézisének szabályozásában.

Az utóbbi időben azonban egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a PKC izoenzimek nemcsak szerkezeti, aktivációs és megoszlási heterogenitást mutatnak, hanem regulációjuk és biológiai szerepük is jelentősen különböz(het)ik egymástól. 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.

A PKC izoenzimek és a harántcsíkolt izom kapcsolata

A PKC rendszer szabályozó szerepét vázizom esetén is leírták. Bebizonyosodott, hogy a PKC aktivitásának módosítása forbol-észterekkel fokozta az inzulinfüggő glükóz-transzportot, stimulálta a D-vitamin indukálta kalciumfelvételt, valamint utánozta a prosztanoidok hatását a myoblastok fúziójának serkentésében. Az izoenzimek specifikus szerepére vonatkozóan megállapították továbbá, hogy amíg az nPKC θ köponti szerepet játszik az inzulin vázizom-homeosztázist szabályozó folyamatainak kifejlődésében, addig a cPKC α és nPKC δ izoformák vesznek részt a tumor necrosis factor- α inzulin-szignalizációt gátló hatásában. Ezen túlmenően kimutatták, hogy az nPKC δ és az aPKC ζ fokozza a glükóz-transzport mechanizmusok aktivitását, valamint, hogy az aPKC ζ és λ izoformák meghatározó szereppel bírnak a fokozott (izom)munkavégzés által beindított metabolikus és génexpressziós válaszok szabályozásában.

A PKC rendszer szerepet játszik a harántcsíkolt izomsejtek növekedésének szabályozásában is. Patkányból izolált primer vázizomsejtkultúrákban specifikus PKC inhibitorral vagy a PKC aktivátor forbol 12-mirisztát 13-acetáttal (PMA) történő kezelés nem változtatta meg lényegesen a

myogenikus differenciálódást. Ezzel szemben csirke vázizomsejteken a PMA módosította a differenciálódási marker expresszióját, szelektíven és reverzibilisen gátolta a differenciálódási programot, blokkolta a DNS-szintézist, valamint down-regulálta a cPKC α -t. Ehhez részben hasonlóan, normál tenyésztett humán izomban kimutatták, hogy a PMA dózisfüggően gátolta a vázizomsejtek proliferációját és fúzióját, csökkentette az izomspecifikus differenciálódási marker dezmin expresszióját, valamint meggátolta a myogenezist a már fuzionált myotube-okban.

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

A hialinporc – a porcdifferenciáció legfontosabb lépései

A hialinporc különböző helyeken (ízületi csontfelszín, zsigeri porc) fordul elő a gerinces szervezetekben. Az állandó porcok sejtjei a perikondrium belső rétegében található kondrogenikus őssejtekből pótlódhatnak, míg a differenciált ízületi porc regenerációra képtelen a perikondrium hiánya miatt. Embrionális korban a porcszövet mezenchimális szövetből differenciálódik. A kondrogenikus őssejtek proliferációja, porcsejt irányba elkötelezett sejté alakulása, a porcsejt-fenotípus elnyerése és a porcszövet kialakítása egyaránt függ genomiális faktoroktól („master” gének, lásd alább), lokális mikroenvironmenti tényezőktől (autokrin és parakrin növekedési faktorok és

citokinek, extracelluláris mátrix és sejtadhéziós molekulák), valamint a differenciálódó sejtek felszíni receptorainak (integrinek, citokinreceptorok) mintázatától. A porcsejtek differenciációját ily módon számos, különböző forrásból származó faktor (hormonok, lokálisan termelt citokinek stb.) szabályozhatja. A porcdifferenciáció folyamatának kísérleti modellezésére kiválóan alkalmas a csirkeembriók végtagtelepeiből előállított primer, porcosodó high density (HD) sejt kultúra.

Mind az *in vivo*, mind az *in vitro* porcdifferenciálódás fontos kezdeti lépése a kondrogenikus sejtek kisebb sejtcsoportokba való kondenzációja. A korai sejt–sejt kapcsolatok a kondrogenikus sejtek felszínén megjelenő adhéziós molekulák révén valósulnak meg, ugyanakkor a szomszédos sejtek között számos gap junction is megjelenik. Emellett a differenciálódó sejteket körülvevő extracelluláris mátrix (ECM) is jelentős átalakulásokon megy keresztül, mely egyedi összetételű ECM nagy fontossággal bír a porcsejtek végleges fenotípusának kialakításában és fenntartásában.

A kondrogenézis szabályozása – a PKC rendszer lehetséges szerepe

A porcdifferenciáció folyamatának egyik központi „master” génje a transzkripciós faktor Sox9. A differenciálódás szabályozásában ugyancsak kiemelkedő szerepet tulajdonítanak annak, hogy a sejtek jelentős mennyiségű prostaglandin- E_2 -t termelnek, ami az intracelluláris cAMP szintjének emelkedéséhez, majd a cAMP függő protein kináz A (PKA) aktiválódása vezet. Megállapították, hogy a porcdifferenciáció során a PKA cAMP és BMP-2 hatására egyaránt aktiválódik. Bebizonyosodott az is, hogy a kondrogenikus sejtekben a PKA foszforilálja a Sox9-et, s ezzel aktiválja a ECM-ot kialakító II. típusú kollagén és az aggregán központi fehérjéjének a génjét. A PKA másik lehetséges target molekulája a „cAMP responsive element binding protein” (CREB). Megállapították, hogy a CREB-család transzkripciós faktorainak foszforilációja mind cAMP, mind az egyik legfontosabb szabályozó

citokincsalád, a transforming growth factor (TGF) csoport (pl. bone morphogenetic proteinek) mezenchimális kondenzációt elősegítő hatására fokozódik.

Kiderült ugyanakkor az is, hogy kondrocitákban a CREB a PKC-rendszer jelátviteli útvonalainak eredményeképpen is foszforilálódhat, mely felvetette a PKC-kapcsolt szignalizáció esetleges szerepét a porcdifferenciálódás szabályozásában. Kezdetben azt gondolták, hogy a PKC gátolja a porcdifferenciációt, hisz a staurosporin (mint PKC inhibitor) fokozta a kondrogenezist; később azonban kiderült, hogy a staurosporin egyéb hatásainak következtében fokozódott a porcdifferenciáció. Megállapították ugyanakkor azt is, hogy a PKC-aktivitás általános gátlása a porcdifferenciáció csökkenéséhez vezet. Érdekes megfigyelés volt ugyanakkor, hogy a MAPK Erk-1 foszforiláltsága a PKC-aktivitás gátlásával párhuzamosan emelkedett, mely felvetette, hogy a PKC gátlása az Erk-1 aktiválódásán keresztül gátolhatja a porcdifferenciációt. Mindezen kisszámú irodalmi adat – habár egyértelműen alátámasztotta a PKC rendszer porcdifferenciálódásban betöltött szerepének fontosságát – nem adott egyértelmű választ a PKC-függő folyamatok részleteiről. Szinte teljes mértékben hiányzik emellett az egyes PKC izoenzimek specifikus szerepének leírása a kondrogenezis folyamataiban.

CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során az alábbi célkitűzések kísérletes megvalósítását hajtottuk végre:

1. Először az IGF-I hatását kívántuk jellemezni primer humán vázizomsejtek *in vitro* növekedésére, fúziójára és differenciálódására.
2. Ezt követően vizsgáltuk az IGF-I celluláris hatásának kifejlődésében (potenciálisan) résztvevő jelátviteli útvonalak szerepét.
3. Kísérleteinket elvégeztük az egér C2C12 myoblast sejtvonalon is, ahol kísérletes technikáinkat farmakológiai (szelektív és specifikus PKC gátlószerek) és molekuláris biológiai módszerekkel kiegészítve tanulmányoztuk a szignalizációs útvonalakat. Ezen utóbbiak során bizonyos PKC izoformákat stabilan overexpresszáló C2C12 myoblastokat készítettünk, majd ezen sejteken elemeztük az *in vitro* proliferáció, fúzió és differenciálódás folyamatait, valamint a morfológiai jellegzetességeket.
4. *In vivo* kísérleteinkben a rekombináns módszerekkel megváltoztatott PKC overexpresszor C2C12 sejteket immunhiányos egerekbe injektáltuk, majd a kifejlődött daganatokat elemezve vizsgáltuk a PKC izoenzimek szerepét a tumorgenezis folyamatainak szabályozásában.
5. Kísérleteink utolsó részében csirkeembriókból izolált primer high density (HD) porckultúrákban vizsgáltuk a PKC izoformák szerepét az *in vitro* porcdifferenciálódás szabályozásában. Először feltérképeztük a porckultúrák PKC izoenzimmintázatát, valamint nyomonkövettük a porcdifferenciálódás során expressziójukban bekövetkező változásokat.
6. Vizsgálni kívántuk emellett a PKC izoenzimek, különös tekintettel a PKC μ enzimaktivitásában bekövetkező változásokat a differenciálódás előrehaladtával. Végül a PKC μ inhibitor rezveratrol jelenlétében tanulmányoztuk a porcképződés folyamatát.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

A humán vázizomsejtek tenyésztése során az ortopédsebészeti beavatkozásokból származó izommintákat kombinált enzimatikus emésztésnek vetettük alá, majd a sejtszuspenziót mágneses szeparálás segítségével fibroblaszt-mentesítettük. Ezt követően a tisztított szatellitasejteket 5% főtális borjúsavót (FCS) és 5% lószérumot (HS), valamint antibiotikumokat tartalmazó, a sejtek proliferációját elősegítő Ham F-12 tápoldatban tenyésztettük termosztált (37 °C, 5% CO₂ tartalom) körülmények között. A 3. napon a médiumot Dulbecco által módosított tápoldatra (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM) cseréltük le, amely alacsony, 2% FCS és 2% HS tartalmánál fogva a myoblastok fúzióját és differenciálódását segítette elő.

Az egér rhabdomyomából izolált C2C12 sejtvonalat 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú atmoszférában, 15% FCS-sel és antibiotikumokkal kiegészített DMEM tápoldatban tenyésztettük.

A HD mezenchimális porckultúrákat a Hamburger-Hamilton szerinti 22-24-es fejlettségi stádiumban lévő csirkeembriók (Ross és Hybro fajták) distális végtagtelepeiből izoláltuk, majd a sejteket kiegészített (10% FCS, antibiotikumok) Ham F-12 tápoldatban tenyésztettük.

A sejtproliferáció vizsgálata

A humán szatellitasejt-kultúrák proliferációját a morfológiai jegyek, valamint növekedési görbék (a sejtmagok naponkénti számolásával; 5 látótér/edény) segítségével határoztuk meg.

Kontroll, valamint a különféle PKC izoformákat kifejező C2C12 myoblastok növekedésének vizsgálatához bróm-deoxi-uridint (BrDU) felhasználó kolorimetriás assay-t végeztünk. A módszer lényege, hogy a timidin-analóg BrDU a proliferáló sejtek DNS-ébe épül be, melynek mértéke a

BrdU ellen termeltetett antitest Fab-fragmentjéhez kapcsolt peroxidáz enzim, valamint tetra-metil-benzidin szubsztrát alkalmazásával kolorimetriásan mérhető. A PKC overexpresszorok esetében emellett meghatároztuk a sejtek kettőződési idejét, valamint a kultúrák maximális sejtdenzitását. 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.

Porcosodó sejt kultúrák proliferációs aktivitását a radioaktív ^3H -timidin beépülésének meghatározásával mértük.

PKC vektorok

A PKC vektorokat a korábban leírtak szerint állítottuk elő, melynek során a PKC α , β , δ és ϵ ; a kináz negatív PKC δ (DN-PKC δ); valamint az üres vektor cDNS szekvenciáit egy metallothionein promotor-vezérelt eukarióta expressziós vektorba (MTH) klónozták. A vektor szekvenciája a C-terminálison a PKC ϵ 12 aminosavból álló, specifikus szekvenciáját kódoló szakaszt (ϵ -tag) is tartalmazza, melynek fehérjeterméke fúziós proteinként minden egyes rekombináns (azaz a C2C12 sejtekben overexpresszált) PKC izoenzim végéhez hozzákapcsolódik.

Rekombináns PKC overexpresszálo C2C12 sejtek készítése

A C2C12 sejteket az üres pEMTH vektorral (kontroll sejtek esetében), illetve a PKC α , β , δ , ϵ , illetve a DN-PKC δ cDNS-ét tartalmazó vektorok egyikével transzfektáltuk, Superfect anionos detergens felhasználásával. A transzfektált sejteket ezután 825 $\mu\text{g/ml}$ G418 antibiotikummal (geneticin) kiegészített DMEM oldatban 12-18 napig szelektáltuk, egyedi kolóniákat (klónok) izoláltunk, majd a klónokat 550 $\mu\text{g/ml}$ G418-tartalmú DMEM oldatban

tenyésztettük folyamatosan. Ezt követően Western blot és kináz assay segítségével ellenőriztük a stabil transzfekció és overexpresszió hatékonyságát.

Western (immuno)blot

A tenyésztett sejteket hideg lízis-pufferben homogenizáltuk, ultrahangos szonikálóval feltárást végeztünk, majd meghatároztuk a minták proteintartalmát. Ezután SDS poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) követően a szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, majd megfelelő elsődleges és másodlagos antitestek felhasználásával immunfestést végeztünk. Az immunjelek rögzítése minden esetben kemilumineszcens kit, a detektálás pedig fényérzékeny film (Fujifilm) vagy LAS 3000-es darkbox segítségével valósult meg. Az expresszió kvantitatív meghatározását denzitométer, valamint megfelelő szoftver segítségével hajtottuk végre.

A PKC-specifikus enzimaktivitás mérése (kináz assay)

A transzfektált C2C12 sejtek PKC aktivitásának megállapítása során a sejteket lízis-pufferben homogenizáltuk, majd a sejt-lizátumok kináz-aktivitását hiszton III és simaizom miozin könnyű-lánc 20 (MLC20) szubsztrátok segítségével vizsgáltuk. Az aktivitást a radioaktív γ -³²P-ATP beépülésének mérésével határoztuk meg.

A PKC aktivitást porcsejteken a fent leírt módszer segítségével vizsgáltuk. A PKC μ enzimaktivitás mérése a fentiekől annyiban tért el, hogy ebben az esetben a hiszton III szubsztrát helyett a PKC μ specifikus szubsztrátjának tekinthető syntide-2-be történő ³²P beépülését határoztuk meg.

Immuncitokémia és konfokális mikroszkópia

A PKC izoenzimek IGF-I hatására bekövetkező esetleges szubcelluláris lokalizáció változásait (mint aktivációjuk jelét) immunfestést követő konfokális mikroszkóp technikával vizsgáltuk. A sejttenyészeteket acetonnal fixáltuk, majd

blokkoló oldattal történő kezelést követően az adott PKC ellenes antitesttel inkubáltuk. Ezt követően fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált antitesttel történő jelölést hajtottunk végre, majd a mintákat DAPI-t tartalmazó fedőanyaggal fedtük, végül a sejtekről konfokális mikroszkóppal felvételeket készítettünk.

A porcsejtek metakromáziás festése és fénymikroszkópos vizsgálata

A HD-kultúrákat 40% formaldehid és abszolút alkohol 4:1 arányú keverékével fixáltuk, majd a sejteket dimetil-metilénkék (DMMK) 3% ecetsavban oldott 0,1%-os oldatával festettük. Az alacsony pH-n történő DMMK-festést követően a porcmátrix magas proteoglikán tartalmánál fogva erős, vörös metakromatikus színben látszik, míg az ortokromatikus kék festődés elhanyagolható ezen körülmények között.

A tumorgenezis vizsgálata SCID egerekben

A különböző PKC izoformákat overexpresszáló C2C12 sejteket $1-2 \times 10^6$ élő sejt/200 μ l denzitásban immunhiányos (Severe Combined ImmunoDeficiency, SCID) egerekbe intradermálisan injektáltuk, majd az egereket 30 napig megfigyelés alatt tartottuk. Az állatokat végül eutanizáltuk és vizsgáltuk a kialakult tumorok átlagos háromdimenziós méreteit, valamint hisztológiai jellegzetességeit (minden csoportban 3-5 állattal).

Hisztológia és immunohisztokémia

A kialakult tumorok hisztológiai paramétereit, valamint a sejtosztódások számát formalin-fixált, paraffinba ágyazott hematoxilin-eozin (HE)-festett metszeteken határoztuk meg. A proliferáló sejtek számának meghatározásához a metszeteken a proliferációs (nukleáris) marker Ki-67-elleni, streptavidin-biotin-komplex (SABC) alapú immunhisztokémiai eljárást alkalmaztuk.

EREDMÉNYEK

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

Kísérleteink első részében IGF-I hatásának kialakulásában résztvevő jelátviteli útvonalakat vizsgáltuk humán vázizomsejteken. Megállapítottuk, hogy az IGF-I dózis- és időfüggően fokozta a sejtek növekedését. Kimutattuk továbbá, hogy az IGF-I emellett megnövelte az 5. nap környékén meginduló fúziós aktivitást és az izomspecifikus differenciálódási marker dezmin kifejeződését. Mindezen adataink arra utaltak, hogy az IGF-I dózisfüggően fokozta mind a korai (proliferáció), mind a késői (fúzió és dezmin expresszió) regenerációs eseményeket humán tenyésztett vázizomsejt kultúrákban.

Bebizonyosodott emellett, hogy a MAPK és PI3-K útvonalak gátlása nem befolyásolta az IGF-I által kifejtett proliferációt és differenciálódást fokozó hatást. Kimutattuk azt is, hogy az IGF-I nem változtatta meg a MAPK Erk-1/2 foszforiláltsági állapotát (mint a potenciális aktiváció jelét). Ezzel ellentétben a PKC rendszer általános inhibitora, a GF109203X jelentősen lecsökkentette a sejtproliferációt és a differenciálódási marker expresszióját. Mindezen eredményeink azt sugallták, hogy humán primer vázizomsejtekben nem a MAPK Erk-1/2 és PI3-K útvonalak vesznek részt az IGF-I celluláris hatásának kifejlődésében, hanem a PKC rendszer valamely tagja(i).

Ezen feltevést vizsgálva megállapítottuk, hogy a humán vázizomsejtekben kifejeződő cPKC izoenzimek (cPKC α és γ) szelektív inhibitora, a Gö6976 nem befolyásolta az IGF-I hatását. Kimutattuk ugyanakkor, hogy az nPKC δ specifikus inhibitora, a Rottlerin már igen alacsony koncentrációban (mely dózis önmagában nem módosította a sejtek növekedését és differenciálódását) teljes mértékben felfüggesztette az IGF-I hatását. Végezetül bebizonyosodott, hogy

IGF-I hatására az nPKC δ a citoplazmából a magmembránba és a magba transzlokálódott (mely jelenség az izoforma aktivációját jelzi), míg a többi PKC izoenzim szubcelluláris lokalizációja nem változott. Ezen eredményeink az nPKC δ központi és kizárólagos szerepére utalnak az IGF-I által kifejtett celluláris hatások kialakításában humán vázizomsejteken.

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

A következő lépésekben a fenti kísérleteket egér C2C12 myoblastokon is megismételtük, mely sejtvonal számos tulajdonságát tekintve a humán tenyésztett vázizomsejtek jó modelljeként alkalmazható. Kimutattuk, hogy az IGF-I C2C12 sejteken is fokozta a sejtek növekedését, a fúziós aktivitást, valamint az izomspecifikus differenciálódási marker dezmin expresszióját. Megállapítottuk továbbá, hogy – ugyancsak hasonlóan a humán izomsejteken mértékhez – az IGF-I hatását a GF109203X (a PKC rendszer általános inhibitora) teljes mértékben felfüggesztette, míg a PI3-K útvonal gátlása nem volt hatással a fenti folyamatokra. A humán vázizomsejteken tapasztaltakkal ellentétben ugyanakkor bebizonyosodott, hogy a MAPK Erk-1/2 inhibitor PD098059 szignifikáns módon, de nem teljes mértékben (30-40%), kivédte az IGF-I hatását. Megállapítottuk továbbá, hogy az IGF-I fokozta a MAPK Erk-1/2 aktivációját jelző foszforilációt. Ezen eredményeink arra utaltak, hogy C2C12 sejteken az IGF-I hatásának kifejlődésében a PKC rendszer mellett a MAPK jelátviteli útvonalnak is szerepe lehet.

A két rendszer pontos részvételének tisztázásához ezt követően azt elemeztük, hogy az IGF-I által kifejtett hatások közvetítésében mely PKC izoenzim(ek) játszhat(nak) szerepet. Kimutattuk, hogy a C2C12 myoblastokban 6 PKC izoforma expresszálódik: a cPKC α és β , az nPKC δ , η és θ , valamint az aPKC ζ . Megállapítottuk továbbá, hogy az nPKC δ szelektív gátlószere, a

Rottlerin – a humán vázizomsejtekhez hasonlóan – teljes mértékben felfüggesztette az IGF-I mitogén hatását, míg a cPKC izoenzimek (jelen esetben a cPKC α és β) inhibitora nem befolyásolta a növekedési faktor hatását. Bebizonyosodott emellett, hogy az IGF-I jelentős mértékben és szelektív módon megnövelte az nPKC δ tirozin-foszforilációjának mértékét (mely az enzim aktiválódásának jeleként értelmezhető).

Ezek az adatok azt a feltételezésünket erősítették meg, hogy az nPKC δ központi szerepet játszhat az IGF-I által kiváltott sejtfolymatok szabályozásában C2C12 myoblastokon is. Ennek további bizonyítására olyan C2C12 kultúrákat hoztunk létre, melyek stabilan overexpresszálják a konstitutíven aktív nPKC δ -t, illetve annak kináz (domináns) negatív mutáns (DN-PKC δ) formáját. Ezen sejteken megállapítottuk, hogy az nPKC δ -t kifejező myoblastok proliferációja lényegesen fokozódott. Kimutattuk azt is, hogy az nPKC δ overexpresszor sejtek növekedése teljes mértékben megegyezett az IGF-I-gyel kezelt kontroll C2C12 sejtek növekedésével. Bebizonyosodott továbbá, hogy IGF-I alkalmazásával az nPKC δ overexpresszorok jelentős mértékben megnövekedett sejtproliferációja tovább már nem volt fokozható, azaz a konstitutíven aktív nPKC δ kifejeződése mintegy „utánozta” az IGF-I mitogén hatását. Megállapítottuk emellett, hogy a DN-nPKC δ overexpressziója drámaian lecsökkentette a sejtek proliferációját. Mivel ezen sejtek növekedése IGF-I jelenlétében sem fokozódott, eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy az IGF-I celluláris hatásainak kifejlődéséhez C2C12 izomsejtekben (is) elengedhetetlenül szükséges az nPKC δ aktív jelenléte.

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

Azon fent bemutatott eredményeink, hogy C2C12 sejteken (1) az nPKC δ az IGF-I-kapcsolt jelátvitel központi molekulája; (2) az nPKC δ specifikus

gátlószere teljes mértékben felfüggesztette, míg a MAPK útvonal inhibitora csak részben gátolta meg az IGF-I proliferációt fokozó hatását; azt sugallták, hogy az nPKC δ és a MAPK által befolyásolt jelátviteli útvonalak között esetleges kapcsolat található. Ezt a hipotézist alátámasztandó először kimutattuk, hogy a specifikus nPKC δ inhibitor Rottlerin jelentős mértékben csökkentette az IGF-I Erk-1/2 foszforilációt növelő hatását. Megállapítottuk továbbá, hogy az nPKC δ overexpresszor sejtek jelentősen fokozódott proliferációja részlegesen (mintegy 35-40%-kal), de statisztikailag szignifikáns mértékben gátolható volt a MAPK inhibitor PD098059 alkalmazásával. Ezen adataink megerősítették feltevésünket, hogy C2C12 myoblastokon az nPKC δ és a MAPK Erk-1/2 szignalizációs útvonalak kapcsolatban vannak. Eredményeink emellett rámutatnak azon új felfedezésre is, miszerint C2C12 myoblastokon az IGF-I hatásának kifejlődésében az nPKC δ a MAPK útvonal „upstream” regulátoraként viselkedik (azaz megelőző aktivációja szükséges a MAPK rendszer aktivációjához).

Különböző PKC izoformák eltérő módon szabályozzák C2C12 myoblastok proliferációját és a differenciálódási marker dezmin expresszióját

Következő kísérletsorozatunkban számos egyéb PKC izoenzim (cPKC α és β , valamint nPKC ϵ) rekombináns stabil overexpresszióját is végrehajtottuk, majd vizsgáltuk az overexpresszor sejtek növekedésében megfigyelhető esetleges módosulásokat. Kimutattuk, hogy a különféle PKC izoenzimek overexpressziója eltérő módon változtatta meg a sejtek növekedését. A cPKC α és β izoenzimek overexpressziója jelentősen lecsökkentette a C2C12 myoblastok proliferációját, míg a novel nPKC ϵ jelenléte nem okozott szignifikáns változást a sejtek növekedésében. Ezzel ellentétben az nPKC δ overexpressziója (mint azt fent bemutattuk) drámaian fokozta a sejtek proliferációját a kontroll sejtekhez viszonyítva. Megállapítottuk továbbá, hogy a

hipoproliferatív cPKC α és β overexpresszor sejtekben a differenciálódási marker dezmin szintje jelentősen fokozódott, míg ezzel ellentétben, a hiperproliferatív nPKC δ overexpresszor myoblastok dezmin expressziója jelentősen lecsökkent a kontroll C2C12 sejtekben mértékhez képest (az nPKC ϵ paraméterei ismételtelen nem változtak a kontrollhoz képest).

Kimutattuk emellett, hogy a cPKC izoformák (C2C12 sejtek esetében cPKC α és β) gátlószere dóziszfüggő módon fokozta kontroll C2C12 sejtek proliferációját. Ezzel ellentétben, az nPKC δ gátlószere, a Rottlerin dóziszfüggően gátolta ezen sejtek növekedését. Ezen túlmenően bebizonyosodott, a DN-nPKC δ overexpressziója drámai módon elnyújtotta a sejtek kettőződési idejét. Mindezen adatok arra utaltak, hogy a cPKC α és β negatív, míg az nPKC δ pozitív szerepet tölt be C2C12 myoblastok proliferációjának szabályozásában.

A PKC izoenzimek overexpressziója különböző tumorokat indukál SCID egerekben

Végezetül megvizsgáltuk a különböző PKC izoformákat (valamint a mutáns DN-nPKC δ -t) overexpresszáló C2C12 sejtek tumorindukáló képességét és *in vivo* növekedését is. A különböző C2C12 sejtek szuszpenzióját SCID egerekbe injektáltuk, majd harminc nap elteltével meghatároztuk a kialakult tumorok jellemzőit. Szövetteni metszeteket vizsgálva kimutattuk, hogy kontroll C2C12 sejtek kis méretű, a széleken expanszív növekedésű, centrálisan rhabdoid differenciálódás jeleit mutató tumort hoztak létre. A cPKC α , β vagy nPKC ϵ izoformákat overexpresszáló sejtek injektálása, a kontrollhoz képest, általában hasonló szövettani jellegzetességgel bíró daganatok kialakulását eredményezte. Azaz, az így kifejlődött tumorok megtartották expanszív (nem infiltratív, benignus) növekedésüket, míg szövettanilag a perifériás proliferáció és a centrális rhabdoid differenciálódás jegyeit mutatták. Ezen túlmenően csak kis változásokat tapasztaltunk a tumorok (kontrollhoz viszonyított) átlagos

méretében, az osztódó sejtek számában, valamint a Ki67+ (azaz proliferáló) sejtek százalékos arányában (talán egyedüli különbséggént az volt elmondható, hogy a cPKC α és β overexpresszor sejtek által indukált tumorokban ezen értékek alacsonyabbnak adódtak).

A fentiekől teljesen eltérő eredményeket kaptunk ugyanakkor az nPKC δ esetében. Ezen izoformát kifejező sejtek extrém, nagy méretű, gyakran kifekélyesedő és vérző, valamint (számos esetben) a kísérleti állat (a vizsgálati perióduson belüli) jelentős súlyvesztését és halálát eredményező tumorok kifejlődését eredményezték. Szövettanilag ezen tumorok igen magas sejtosztódási rátával, a rhabdoid differenciálódás teljes hiányával, valamint infiltratív (azaz malignus) növekedési tulajdonságokkal voltak jellemzhetők, mely a kísérleti állat szubkután szöveteinek feldarabolódásához és roncsolódásához vezetett. Mindezek alapján az nPKC δ overexpresszor C2C12 myoblastok által indukált tumorok malignus rhabdomyosarcomáknak voltak diagnosztizálhatók. Fontos megfigyelésnek adódott emellett, hogy a DN-nPKC δ overexpresszor C2C12 myoblastok SCID egerekbe történő intradermális injektálása nem okozott tumorokat a kísérleti állatokban. A fentiek figyelembevételével ez tovább erősíti azon feltevésünket, hogy az nPKC δ központi szerepet játszik a C2C12 vázizomsejtek *in vivo* proliferációjának, valamint malignus transzformációjának serkentésében és kialakításában.

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

Fent bemutatott, különféle harántcsíkolt izomsejteken elvégzett kísérleteinkkel párhuzamosan megkezdtük csirkeembriók distális végtagtelepeiből indított HD porcsejt-tenyészetek PKC rendszerének tanulmányozását. Bebizonyosodott, hogy a sejtek 5 PKC izoformát (cPKC α ; nPKC ϵ ; aPKC λ és ζ ; PKC μ) expresszálnak. Kimutattuk továbbá, hogy az *in*

vitro porcdifferenciáció során a jelenlévő PKC izoformák szintje eltérő módon változott. Azaz, a cPKC α , nPKC ϵ és aPKC λ izoenzimek expressziója fokozatosan csökkent, míg a PKC μ kifejeződése folyamatosan nőtt a tenyésztés előrehaladtával (az aPKC ζ izoenzim mennyisége közel állandó maradt). Megállapítottuk emellett, hogy a teljes (azaz az összes jelenlévő izoformát magában foglaló) PKC enzimaktivitás kis mértékben, de szignifikáns módon csökkent a tenyésztés előrehaladtával. Ezzel ellentétben kimutattuk, hogy a PKC μ izoforma-specifikus aktivitása erőteljesen fokozódott a differenciált kultúrákban.

Mindezen adataink arra utaltak, hogy a cPKC α és nPKC ϵ izoformák a porcdifferenciáció korai, míg a PKC μ a folyamat késői fázisában bírhat szabályozó szereppel. Ezen utóbbi feltevésünket vizsgálva kimutattuk, a PKC μ gátlószer rezveratrol jelentősen megváltoztatta a metakromáziával megfestett kultúrák morfológiai jellegzetességeit; azaz hatására csökkent ugyan a differenciálódó területek összesített mérete (azaz az anyag gátolta a porcdifferenciációt), de a szer határása nagyobb porccsomók alakultak ki. Megállapítottuk végül, hogy a rezveratrol dóziszfüggően csökkentette a porcosodó kultúrák növekedési ütemét. Mindezen adataink tovább erősítették azon feltevésünket, hogy a PKC μ központi szerepet játszik a porcosodó mezenchimális sejt kultúrák proliferációjának és differenciálódásának pozitív szabályozásában.

MEGBESZÉLÉS

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

Kísérleteink első lépésében humán vázizomsejteken vizsgáltuk az IGF-I hatását a sejtek *in vitro* proliferációjára és differenciálódására, valamint elemeztük különféle jelátviteli útvonalak részvételét a növekedési hormon által közvetített sejtprogramok szabályozásában. Jó összhangban korábban közölt adatokkal megállapítottuk, hogy az IGF-I dóziszfüggő módon fokozta a humán vázizomsejtek proliferációját, fúzióját valamint a differenciálódási marker expresszióját. Az irodalomban ugyanakkor elsőként számoltunk be arról, hogy ezen sejteken az IGF-I celluláris hatásainak kifejlődésében az nPKC δ központi és kizárólagos szereppel bír. Ezen megállapításunkat a következő bizonyítékokkal támaszthattuk alá: (1) az IGF-I sejtnövekedést és differenciálódást fokozó hatását teljes mértékben felfüggesztette az nPKC δ specifikus inhibitora, ugyanakkor más inhibitorok, így a klasszikus cPKC α és γ izoenzimek, a MAPK, illetve a PI3-K útvonalak gátlószere nem befolyásolta azt; (2) az IGF-I nem aktiválta a MAPK Erk-1/2-t; (3) az IGF-I kizárólag az nPKC δ izoenzimet transzlokálta, amely az izoenzim aktivációjának elfogadott jele.

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

C2C12 myoblastokon az IGF-I celluláris hatásmechanizmusának megismerését célzó vizsgálataink ugyanakkor hasonló, de korántsem azonos eredményekre vezettek. Kimutattuk, hogy (1) az IGF-I mitogén hatását teljes mértékben felfüggesztette az nPKC δ szelektív inhibitora, ugyanakkor a cPKC izoenzimek, illetve a PI3-K útvonalak gátlószerei nem befolyásolták azt; (2) az IGF-I szelektíven fokozta az nPKC δ (aktivációt jelző) tirozin-foszforilációját; (3)

az nPKC δ konstitutíve aktív formájának rekombináns overexpressziója jelentős mértékben megnövelte a sejtproliferációs rátát, valamint mintegy „utánozta” az IGF-I proliferációt fokozó hatását; (4) az nPKC δ kináz negatív formájának overexpressziója meggátolta a C2C12 sejtek proliferációját és teljes mértékben kivédte az IGF-I celluláris hatásainak kifejlődését. Ezen eredmények egyértelműen alátámasztották azon feltevésünket, hogy – hasonlóan a humán vázizomsejteken mértékhez – az nPKC δ központi szerepet játszik az IGF-I-specifikus válaszok kialakulásában C2C12 myoblastokon is.

Azt is megállapítottuk ugyanakkor, hogy C2C12 izomsejteken a MAPK útvonal is szerepet játszik az IGF-I hatásainak közvetítésében. Bebizonyosodott ugyanis, hogy a MAPK útvonal specifikus inhibitora részlegesen meggátolta az IGF-I sejtfolymatokat fokozó hatásait, valamint, hogy az IGF-I fokozta a MAPK Erk-1/2 aktivitásfüggő foszforilációját is. Érdekes volt megfigyelnünk továbbá, hogy (1) az nPKC δ szelektív gátlása teljes mértékben, míg a MAPK Erk-1/2 inhibitor csak részben függesztette fel az IGF-I mitogén hatásait; (2) az nPKC δ inhibitor Rottlerin hatékonyan gátolta az IGF-I által kiváltott MAPK Erk-1/2 foszforilációt; (3) a konstitutíven aktív nPKC δ izoformát overexpresszáló C2C12 myoblastok jelentősen felgyorsult növekedési ütemét a MAPK inhibitor PD098059 részlegesen lecsökkentette. Mindezen utóbbi adataink arra utalnak, hogy C2C12 myoblastokon a MAPK rendszer részvételéhez (az IGF-I celluláris hatásainak kialakulásában) elengedhetetlenül szükséges az nPKC δ előzetes, IGF-I-függő aktivációja; azaz ezen izoforma működése a MAPK Erk-1/2 útvonal „upstream” szabályozó mechanizmusaként értelmezhető.

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

Kísérleteink második részében (az nPKC δ -n kívül) számos egyéb PKC izoforma (esetleges) szerepét vizsgáltuk C2C12 myoblastok sejtfolyamatainak szabályozásában. Az irodalomban elsőként számoltunk be arról, hogy bizonyos cPKC és nPKC izoenzimek specifikus, differenciált, ugyanakkor gyakran egymással ellentétes szabályozó funkciókkal jellemezhetők a C2C12 vázizomsejtek *in vitro* proliferációs és differenciálódási, valamint *in vivo* tumorgenetikus mechanizmusaiban. Megállapítottuk, hogy a „klasszikus” cPKC α és β izoformák a sejtproliferáció negatív regulátoraiként funkcionálnak, ugyanakkor aktivitásuk fokozza ezen sejtek differenciálódását.

Az nPKC ϵ izoformát korábban számos sejttípus esetében a sejtproliferáció egyik kulcsfontosságú stimulátor molekulájaként jellemezték. A disszertációban bemutatott kísérleteink során ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy C2C12 myoblastok esetében ezen izoenzim nem játszik szerepet a proliferáció, a differenciálódás vagy a tumorigenezis szabályozásában. Mivel kimutattuk, hogy az nPKC ϵ nem fejeződik ki C2C12 izomsejtekben, a konstitutíven aktív rekombináns izoenzim overexpressziójának „hatástalansága” valószínűleg az nPKC ϵ -hoz kapcsolt specifikus enzim – szubsztrát rendszer hiányára vezethető vissza.

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

Kísérleteink során a legfigyelemreméltóbb adatokat az nPKC δ izoenzim vizsgálata során kaptuk. Számos közlemény számolt be korábban arról, hogy az izoenzim (hasonlóan más PKC enzimekhez) jelentős mértékben vesz részt a proliferáció és differenciálódás szabályozásában. A legtöbb esetben ugyanakkor – így például humán keratinocytákon és fibroblasztokon – az derült ki, hogy az nPKC δ a sejtek differenciálódását és az apoptózis folyamatát serkenti, míg a proliferáció szabályozásában gátló szereppel bír. A mai napig

csupán egyes emlőcarcinoma sejtek esetében mutatták ki, hogy az izoforma (mintegy „túlélő” faktorként funkcionálva) fokozza a sejtek növekedését.

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

A C2C12 myoblastok vizsgálata során kapott adataink és a laboratóriumunk korábbi kutatási eredményeinek összehasonlítása egy további érdekes jelenségre mutatott rá. Humán epidermális keratinocytákon (ahol a disszertációban bemutatott kombinált molekuláris biológiai és farmakológiai technikákkal megegyező megközelítést alkalmaztunk) azt tapasztaltuk, hogy a cPKC α és az nPKC δ overexpressziója fokozta a sejtek differenciálódását, ugyanakkor gátolta azok proliferációját és a tumorgenezist. Ezzel ellentétben, a cPKC β és az nPKC ϵ aktivitása fokozta mind az *in vivo*, mind az *in vitro* sejtnövekedést és gátolta a differenciálódás folyamatát. A C2C12

vázizomsejteken a legtöbb esetben ezzel ellentétes jelenségeket tapasztaltunk; azaz a cPKC β gátolta a sejtek növekedését, az nPKC ϵ jelentéktelen szerepet játszott a proliferáció szabályozásában, az nPKC δ viszont jelentős mértékben fokozta a sejtproliferációt és a daganatok kialakulását/transzformációját. Ha figyelembe vesszük továbbá, hogy keratinocytákon még a hiperproliferatív átalakulást eredményező cPKC β és/vagy nPKC ϵ overexpressziója sem járt együtt a sejtek malignus transzformációjával (szemben az nPKC δ hatásával C2C12 myoblastokon), adataink alapján kimondható, hogy a PKC izoenzimek nemcsak izoforma-specifikus módon szabályozzák a sejtek növekedését és differenciálódását, de hatásuk igen kifejezett sejtípus-függéssel is jellemezhető.

A PKC μ központi szerepet játszik a porcdifferenciálódás folyamatainak serkentésében

Kísérleteink során megkezdtuk egy másik sejtípus, a porcosodó mezenchimális sejt kultúrák PKC izoenzimkészletének vizsgálatát is. Kimutattuk, hogy a differenciálódó kondrociták jellegzetes izoforma-mintázata, valamint a PKC aktivitás jelentősen változott a tenyésztési idő függvényében. Megállapítottuk, hogy a legtöbb izoenzim (cPKC α , nPKC ϵ , aPKC λ) szintje csökkent a differenciálódás előrehaladtával, mely arra utalhat, hogy ezen molekulák a folyamat korai fázisában játszhatnak szerepet. Az aPKC ζ szintje változatlan, de magas szintű maradt a tenyésztés során, mely az izoforma esszenciális biológiai folyamatokat szabályozó funkciójára utalhat.

Ezzel ellentétes jelenséget figyeltünk meg a kísérleteink során csak a porcsejtekben kimutatott PKC μ vizsgálata során. Bebizonyosodott, hogy a sejtekben kimutatott PKC izoformák közül egyedül a PKC μ szintje és (főként) aktivitása növekedett a differenciálódás során; azaz a cPKC α , nPKC ϵ és aPKC λ aktivitása mintegy „felcserélődött” a PKC μ aktivitására a folyamat késői fázisaiban. Mivel funkcionális kísérleteink során az is bebizonyosodott, hogy a

PKC μ gátlása igen jelentősen lecsökkentette a sejtek proliferációját és a metakromáziás festéssel kimutatható porcképződést, eredményeink a PKC μ központi szerepét valószínűsítik a porcdifferenciáció (késői folyamatainak) pozitív szabályozásában.

A kísérletes eredmények (potenciális) hasznosítása

A disszertációban bemutatott eredményeink – az egyértelmű alap kutatásban való felhasználáson túl – számos, az alkalmazott kutatásban, a kísérletes fejlesztésben, valamint (remélhetően) a klinikai gyakorlatban is relevanciával bíró további hasznosítás lehetőségét vetik fel. Az utóbbi évek során számos klinikai kutatás eredménye látott napvilágot, melyek a PKC izoformák aktivitásának megváltoztatása révén próbálják a daganatok fokozott növekedését gátolni. Ezen kutatások még pontosabb tervezéséhez, kivitelezéséhez, valamint az alkalmazott potenciális gyógyszerhatóanyagok biológiai hatáselemzéséhez nyújtanak további segítséget azon eredményeink, miszerint a PKC izoenzimek specifikus módon képesek a sejtproliferáció *in vitro* és *in vivo* szabályozására. Kísérletes adataink azt sugallják, hogy pl. a harántcsíkolt izom daganatos megbetegedéseiben hatékony beavatkozás lehet a myoblastokban hiperproliferatív átalakulást eredményező, illetve az IGF-I mitogén hatását közvetítő nPKC δ aktivitásának csökkentése szelektív inhibitorok, valamint az enzim kifejeződését csökkentő célzott technikák alkalmazásával. Másik, az előzőeket akár kiegészítő terápiás alternatívaként olyan szerek alkalmazása is sikerrel kecsegtethet, melyek a sejtproliferációt gátló (és a differenciálódást elősegítő) cPKC α és β izoenzimek aktivitásának fokozásán keresztül fejtik ki hatásukat. Végezetül, degeneratív porcmebetegekben egy potenciális terápiás alternatíva lehet (a kondrogenezis folyamatainak serkentésére) a PKC μ aktivitásának szelektív fokozása.

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

ÖSSZEFOGLALÁS

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

KÖZLEMÉNYEK

A téziseket megalapozó in extenso tudományos közlemények:

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

További in extenso tudományos közlemények:

- 1) *Boczán J., Bíró T., Czifra G., Lázár J., Papp H., Bárdos H., Ádány R., Mechler F., and Kovács L. (2001): Phorbol ester treatment inhibits proliferation and differentiation of cultured human skeletal muscle satellite cells by differentially acting on protein kinase C isoforms. *Acta Neuropathol.* **102**:55-62. **IF: 2.503***
- 2) *Papp H., Czifra G., Lázár J., Boczán J., Gönczi M., Csernoch L., Kovács L., and Bíró T. (2003): Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation of HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **12**:811-824. **IF: 1.707***
- 3) *Varga E., Nagy N., Lázár J., Czifra G., Bak I., Bíró T., and Tósaki Á. (2004): Inhibition of ischemia/reperfusion-induced damage by dexamethasone in isolated working rat hearts: the role of cytochrome c release. *Life Sci.* **75**:2411-2423. **IF: 2.158***
- 4) *Varga A., Czifra G., Tállai B., Németh T., Kovács I., Kovács L., and Bíró T. (2004): Tumor grade-dependent alterations in the protein kinase C isoform pattern in urinary bladder carcinomas. *Eur Urol.* **46**:462-465. **IF: 2.651***
- 5) *Papp H., Czifra G., Bodó E., Lázár J., Kovács I., Aleksza M., Juhász I., Ács P., Sipka S., Kovács L., Blumberg P.M., and Bíró T. (2004): Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation,*

- apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**:1095-1105. **IF: 4.812**
- 6) Zákány R., Szigyártó Z., Matta Cs., Juhász T., Csontos Cs., Szűcs K., Czifra G., Bíró T., Módis L., and Gergely P. (2005): Hydrogen peroxide inhibits formation of cartilage in chicken micromass cultures and decreases the activity of calcineurin: implication of ERK1/2 and Sox9 pathways. *Exp Cell Res.* **305**:190-199. **IF: 4.007**
- 7) Kovács I., Pocsai K., Czifra G., Sarkadi L., Szűcs G., Nemes Z., and Rusznák Z. (2005): TASK-3 immunoreactivity shows differential distribution in the human gastrointestinal tract. *Virchows Arch.* **446**:402-410. **IF: 2.227**
- 8) Bodó E., Bíró T., Telek A., Czifra G., Griger Z., Tóth I.B., Mescalchin A., Ito T., Bettermann A., Kovács L. and Paus R. (2005): A “hot” new twist to hair biology – involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am. J. Pathol.* **166**:985-998. **IF: 6.441**
- 9) Szabó G., Szentandrassy N., Bíró T., Tóth I.B., Czifra G., Magyar J., Bányász T., Varró A., Kovács L., and Nánási PP. (2005): Asymmetrical distribution of ion channels in canine and human left-ventricular wall: epicardium versus midmyocardium. *Pflügers Arch.* **450**:307-316. **IF: 2.260**

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

Idézhető kivonatok:

- 1) 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) 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**:13
- 5) 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**:348.
- 6) **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**:278.
 - 7) **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. No. 195
 - 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. Dermatol. Sci.* **32**(2):169. No. 195
 - 9) **Czifra G., Lázár J., Kern A., Juhász I., Kovács I., Kovács L., Blumberg P.M., 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):621-622.
 - 10) **Bodó E., Géczy T., Lázár J., Kovács I., Czifra G., Bettermann A., Kovács L., Paus R., and Bíró T.** (2003): The cutaneous vanilloid receptor 1 expression suggests multiple functions beyond sensory nerve signaling. *J. Invest. Dermatol.* **121**(1):218. No. 823
 - 11) **Bodó E., Géczy T., Lázár J., Kovács I., Czifra G., Bettermann A., Kovács L., Paus R., and Bíró T.** (2003): The cutaneous vanilloid receptor 1 expression suggests multiple functions beyond sensory nerve signaling. *J. Dermatol. Sci.* **32**:169. No. 823
 - 12) **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
 - 13) **Szegedi A., Czifra G., Schmidt E., Hunyadi J., and Bíró T.** (2004): Protein kinase C isoforms have different effect on the expression of desmoglein 1, 3 and P-cadherin in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **123**(2):011.
 - 14) **Bodó E., Bíró T., Telek A., Czifra G., Griger Z., Tóth I.B., Lázár J., Mescalchin A., Ito T., Bettermann A., Pertile P., Kovács L., and Paus R.** (2004): A “hot twist” to hair biology – Involvement of vanilloid receptor-1 (VR1) signalling in human hair growth control. *Exp. Dermatol.* **13**(9):581.
 - 15) **Matta C., Juhász T., Szigyártó Z., Szűcs K., Czifra G., Módis L., Gergely P., Zákány R.** (2004): Protein kinase C isoenzymes regulates chondrogenesis of mesenchymes. *Tissue Antigens* **64**(4):435-435.
 - 16) **Juhász T., Szigyártó Z., Matta C., Szűcs K., Czifra G., Bakó É., Zákány R., Módis L., Gergely P.** (2004): The role of calcineurin in the inhibitory

- effect of oxidative stress on cartilage formation *Tissue Antigens* **64(4)**:435-436.
- 17)** Tóth I.B., Géczy T., **Czifra G.**, Seltmann H., Paus R., Kovács L., Zouboulis C.C., Bíró T. (2005): The vanilloid receptor 1 (TRPV1) is expressed and functionally active on human SZ95 sebocytes. *J. Invest Dermatol.* **124(4)**:A68-A68. 405 Suppl. S
- 18)** Juhász T., Matta C., Szigyártó Z., **Czifra G.**, Bíró T., Gergely P., Módis L., Zákány R. (2005): Calcineurin regulates chondrogenesis via the modulation of ERK1/2 activity. *FEBS J.* **272**:307-307. Suppl. 1
- 19)** Matta C., Juhász T., Szigyártó Z., **Czifra G.**, Bíró T., Gergely P., Módis L., Zákány R. (2005): The role of protein kinase C isoenzymes chondrogenesis of micro-mass cell cultures. *FEBS J.* **272**:310-310. Suppl. 1
- 20)** Rusznák Z., Kovács I., Pocsai K., **Czifra G.**, Sarkadi L., Nemes Z., Szűcs G (2005): Distribution of TASK-3 channels in healthy and pathological human tissue samples *FASEB J.* **19(5)**:A1160-A1160. Part 2 Suppl. S