

***A PROTEIN KINÁZ C IZOENZIMEK SZEREPE SZISZTÉMÁS
LUPUS ERYTHEMATOSUSBAN ÉS A MONOMAC-6 SEJTEK
FOLYAMATAINAK SZABÁLYOZÁSÁBAN***

Dr. Griger Zoltán



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

**Debrecen
2007**

BEVEZETÉS

Szisztémás lupus erythematosus

A szisztémás lupus erythematosus (SLE) a poliszisztémás autoimmun betegségek egyik jelentős képviselője, ami a T- és B-sejtek, valamint az antigénprezentáló sejtek (APC) diszregulációjával jellemezhető. A megváltozott sejtműködés patológiás autoantitestek termelését indukálja, ami a legtöbb szerv (leggyakrabban az ízületek, savós hártyák, bőr, vese, központi idegrendszer) gyulladásos érintettségéhez vezet. A betegségre jellemző a női dominancia és, lefolyását tekintve, a váltakozó súlyosságú exacerbációk és remissziók megjelenése.

Az SLE-ben számos jellegzetes laboratóriumi abnormalitást igazoltak. A leggyakoribb eltérések közé tartozik a hiperszedimentáció, a leukopénia, a limfopénia, a trombocitopénia és az anaemia. A legfrekvenciáltabban előforduló immunszerológia változás a pozitív antinukleáris antitest, az emelkedett dsDNS elleni, illetve kardiolipin elleni antitest szint, a lupus antikoaguláns pozitivitás, az alacsony komplement fehérje koncentrációk és az összhemolítikus komplement aktivitás.

A betegség etiológiája és patogenezise multifaktoriális, a mai napig sem ismert minden részletében. Bebizonyosodott ugyanakkor, hogy a kórkép kialakulásában számos genetikai, hormonális és környezeti faktor játszik szerepet. A genetikai tényezők fontosságára utal például az autoimmun betegségek halmozódása az SLE-sek családjában, valamint az egypetéjű ikreken elvégzett konkordanciavizsgálatok. A hormonális tényezők szerepére hívja fel a figyelmet a kifejezett női dominancia, míg a környezeti faktorok közül a fertőző ágensek, ultraibolya sugárzás, valamint bizonyos gyógyszerek említhetők meg, amelyek hozzájárulhatnak a betegség exacerbációjához, súlyosbodásához. Az utóbbi időben egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a betegség patomechanizmusában alapvető szerepet játszik – illetve egyik legfontosabb

kezdeti és fenntartó tényező – az autoreaktív T-sejtek kialakulása, ami végeredményben patológiás autoantitesteket termelő B-sejtek keletkezéséhez vezet.

A T-sejt aktivációt a T-sejt receptornak (TCR) az antigénnel konjugált fő hisztokompatibilitási komplexszel (MHC/Ag) történő kontaktusa indítja be, ami biokémiai események sorozatát mediálja, átjuttatva ezzel a szignált a T-sejt felszínéről a sejtmagba. Ennek hatására számos gén transzkripciója változik meg, elősegítve a T-sejtek proliferációját és differenciációját. A fokozott T-sejt aktivitás hozzájárul a B-sejtek autoantitest termeléséhez és ezzel az autoimmun folyamat fellángolásához. A TCR MHC/Ag komplexszel történő kapcsolódása a TCR alegységek különböző kinázok általi foszforilációjához vezet, amelyek serkentik a T-sejt specifikus ζ -asszociált protein 70 (ZAP-70) működését. A ZAP-70 egy tirozin-kináz aktivitással bíró fehérje, amely foszforilálni képes a T-sejtek aktiválásában részt vevő adapter molekulákat (linker for activation of T cells, LAT), beindítva ezzel egy foszforilációs kaszkád eseménysort, ami kalciumbeáramláshoz, a mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) aktiválásához és a sejtmagban történő géntranszkripció módosításához vezet.

A protein kináz C izoenzimek

A protein kináz C (PKC) izoenzimeszalád a szerin-threonin kinázok egyik jelentős képviselője. A mai napig 11 különböző PKC izoenzimet különböztettek meg, melyeket aktivációs mechanizmusaik és szerkezeti jellegük 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 diacil-glicerol (DAG) és kalcium-dependensek, vagyis aktiválásukhoz ezen anyagokat kofaktorként igénylik. A második csoportba a kalcium-független, de DAG-függő „novel” nPKC δ , ϵ , η és θ izoenzimek tartoznak. Közös tulajdonságuk, hogy kalcium nélkül, diacil-glicerollal (illetve annak exogén megfelelőjeként bizonyos forbol-észterekkel) is maximálisan aktiválhatók. A

harmadik csoportba az „atípusos” izoenzimek sorolhatók (aPKC), melyek közé az aPKC ζ és λ/ι tartoznak. Jellemzőjük, hogy aktiválódásukhoz sem kalciumot, sem phorbol-észtert nem igényelnek. A negyedik csoportot egyetlen enzim alkotja, a PKC μ (újabb nevén a PKD), mely mind aktivációját, mind struktúráját tekintve rendhagyó izoformának tekinthető.

A humán szervezet minden sejtípusa rendelkezik valamely PKC izoformával, illetve izoformákkal. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy nem mindegyik izoenzim található meg minden sejtípusban; azaz a PKC izoenzimek a szervezetben az adott szövetre, valamint sejtre jellemző megoszlást és mintázatot mutatnak. 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 sejtípusok által termelt mediátorok (vazoaktív anyagok, növekedési faktorok, citokinek) szintézisének szabályozásában, valamint a szervezet védekező mechanizmusainak regulációjában (fagocitózis, immunglobulintermelés).

Az utóbbi időben egyre több bizonyíték szól amellett is, hogy a PKC izoenzimek nemcsak szerkezeti, aktivációs és megoszlási heterogenitást mutatnak, hanem regulációjuk és biológiai szerepük is jelentősen különbözhet egymástól. Bebizonyosodott emellett az is, hogy egy adott sejtválasz (különös tekintettel a proliferáció és a differenciálódás) kialakításában a különböző izoenzimek nemcsak eltérő aktivitással vehetnek részt, de hatásuk gyakran ellentétesnek adódik.

A PKC izoenzimek szerepe egészséges és SLE-s humán limfocitákban

Számos tanulmány igazolta, hogy a PKC izoenzimek központi szerepet töltenek be a limfociták sejtfolyamatainak szabályozásában is. Korábban igazolták, hogy az SLE-s betegek T-sejtjeiben csökkent PKC aktivitás mutatható

ki. Ismert emellett az is, hogy az SLE-s T-sejtek csökkent TCR ζ lánc expresszióval rendelkeznek. Ezen változás egy sokkal potensebb 1-es típusú FcR γ lánc kapcsolódását eredményezi a receptorhoz, megváltoztatva ezzel a további szignáltranszdukciós kaszkád működését, ezáltal fokozott kalciumbeáramlást, abnormális cAMP regulációt és facilitált intracelluláris foszforilációt eredményezve. A megváltozott TCR ζ lánc expresszió hátterében a gén csökkent transzkripciója áll, aminek szabályozásában az Elf-1 (E-74-like faktor) transzkripciós faktor, az Ets (E-26-specifikus) transzkripciós család tagja játszik központi szerepet. Ismert emellett az is, hogy SLE-s T-sejtekben az Elf-1 transzkripciós faktor aktív formájának molekuláris defektusa jön létre, ami a molekula abnormis poszttranszlációs modifikálásának következménye. Több hipotézis szól amellett, hogy az Elf-1 transzkripciós faktor defektusának (és ezáltal a csökkent TCR ζ lánc expressziójának) hátterében a molekula csökkent foszforilációja áll, ami az SLE-s T-sejtek szuprimált PKC aktivitásának következménye.

A T-sejtek ezen jelátviteli abnormalitásainak egyik következménye SLE-ben a megváltozott citokintermelés, melyek közül alapvető jelentőséggel bír a T-sejtek csökkent interleukin-2 (IL-2) produkciója. Ezzel párhuzamban kimutatták, hogy a cPKC α és a nPKC θ serkenti az egészséges humán T-sejtek IL-2 receptor expresszióját, ugyanakkor a cPKC β , valamint nPKC δ és ϵ fokozza a sejtek IL-2 szintézisét. A nPKC θ központi szerepére hívja fel a figyelmet, hogy a T-sejt aktiváció során ezen izoforma az immunológiai szinapszisokban található lipid raftokba transzlokálódik. Szintén ezt a hipotézist erősíti meg, hogy Jurkat T-sejtekben a nPKC θ transzfekciója jelentősen növelte az IL-2 termelést.

A PKC izoenzimek szerepe egészséges és SLE-s humán monocitákban

A monociták esetében a sejtek aktivációja szintén számos jelátviteli útvonal indukcióját eredményezi. A PKC enzimes család esetleges szerepével

kapcsolatban azonban már kevesebb adat áll rendelkezésre az irodalomban. Bebizonyosodott, hogy a PKC izoenzimek központi, egymással ellentétes szerepet töltenek be a humán monociták FC-gamma receptor mediált intracelluláris ölü mechanizmusainak szabályozásában (cPKC β fokozta, míg a cPKC α és a nPKC ϵ gátolta azt). Kimutatták azt is, hogy különböző PKC izoenzimek, úgymint a cPKC α és β , valamint nPKC δ és ϵ funkciója elengedhetelen a monociták proinflammatorikus citokintermeléséhez (TNF α , IL-1 β , IL-6). Ezzel ellentétben a bakteriális lipopoliszacharidok (LPS) által aktivált humán monociták sejtválasza (nevezetesen a TNF α , IL-1 és IL-6 termelés) az aPKC ζ aktiválódásán keresztül valósul meg.

Fontos eközben megjegyezni, hogy a sejtek fagocitotikus aktivitása és gyulladásoz mediátortermelése nagymértékben függ a foszfolipáz A₂ enzimcsalád működésétől, így az arachidonsav (AA) termelésétől. Ismeretes, hogy az AA szintézisben központi szerepet játszó PLA₂ enzimek – úgymint a citoszolikus foszfolipáz A₂ (cPLA₂), a kalcium-független foszfolipáz A₂ (iPLA₂) és a diacilglicerol (DAG) lipáz – „down-stream” targetjei lehetnek a különböző PKC izoenzimeknek. Azt is igazolták, hogy egy humán monocitoid sejt vonal, a MonoMac-6 sejtek esetében, a PKC-nak (habár nem írták le, hogy mely izoformáknak) van alapvető szerepe a sejtek IgG mediált fagocitózisának kialakításában, aktiválva a monocitáknál is ismert PKC→PLA₂→AA→fagocitózis jelátviteli útvonalat. Ezt a teóriát erősítette meg az a dolgozat, amiben izoformaspecifikus antiszensz oligonukleotidok felhasználásával igazolták, hogy a cPKC α szabályozza a cPLA₂ foszforilációját és enzimátikus aktivációját humán perifériás monocitákban. Végezetül laboratóriumunk korábban kimutatta, hogy az SLE-s betegek monocitáiban jelentősen csökkent az AA termelés az egészséges kontrollhoz viszonyítva. Igazoltuk továbbá azt is, hogy az alkalmazott kortikoszteroid kezelés megemeli (normalizálja) a sejtek AA felszabadulását.

A MonoMac-6 sejtek

A különböző szövetekből izolált és immortalizált sejtvonalak értékes modelleket jelentenek a sejtek jelátviteli folyamatainak tanulmányozása kapcsán, különösen olyan sejtek esetén, melyeket nehéz elegendő mennyiségben izolálni. Ezek közé a sejtek közé tartoznak a primer humán monociták is, melyek relatíve (a limfocitákhoz képest) alacsony százalékban találhatóak meg a perifériás mononukleáris sejtseparátumban. Bár a jelenlegi molekuláris biológiai technikák fejlődése révén mind kevesebb kiindulási sejtmenyiségből is egyre több információhoz lehet jutni, a sejtvonalakkal végzett kísérletek az alapjai a későbbi primer kultúrákból nyert eredményeknek. A mielo-monocitoid differenciációban érintett számos sejtvonal (ideértve az U937 és a THP-1 sejteket) fő jellegzetességeit korábban leírták az irodalomban. Ezek a sejtek a monocita fejlődési vonal korai stádiumait reprezentálják, azaz a sejtek valamilyen ágenssel történő (forbol-észter, IFN- γ) differenciáltatása szükséges ahhoz, hogy rendelkezzenek olyan, főként az érett monocitákra jellemző tulajdonságokkal, mint például a fagocitózis vagy az antitest-dependens celluláris citotoxicitás. Zeigler-Heitbrock és mtsai hozták létre a MonoMac-6 sejtvonalat, amely az érett humán monociták számos funkcionális és fenotípusos jellemzőit hordozza. Nevezetesen, expresszálják (ellentétben az U937 és THP-1 sejtekkel) a CD14 molekulát, fagocitálják az IgG-opszonizált partikulumokat, reaktív oxigén gyököket termelnek és nonspecifikus észteráz aktivitással rendelkeznek. Ezen adatokra alapozva elmondható, hogy a MonoMac-6 sejtek az egyik legdifferenciáltabb monocitoid sejtvonalak közé tartoznak, így kitűnő modellként szolgálnak a monocita sejtfunkciók tanulmányozásához.

A PKC izoenzimek szerepével kapcsolatban a MonoMac-6 sejtek esetében igen szegényes adatokkal rendelkezünk. Mint már korábban említettük, ismeretes, hogy a PKC izoenzimcsaládnak alapvető szerepe van a MonoMac-6 sejtek fagocitózisának és AA termelésének szabályozásában. Nem történt meg ugyanakkor a sejtek PKC izoforma-mintázatának karakterizálása,

összehasonlítása normál humán monocitákéval, valamint nincs információnk a PKC izoenzimek proliferációban betöltött szerepével kapcsolatban sem.

CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink során az alábbi célkitűzések kísérletes megvalósítását hajtottuk végre:

1. Először meg kívántuk határozni az egészséges humán limfocitákban és monocitákban jelen lévő PKC izoenzimek expressziós mintázatát.
2. Következő lépésként az így kapott eredményeket akartuk összehasonlítani különböző autoimmun betegségben szenvedők hasonló sejtpopulációinak PKC profiljával.
3. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy befolyásolja-e a PKC izoformák kifejeződési szintjét az immunbetegek kezelésében gyakran alkalmazott szteroid terápia, majd meghatároztuk a kortikoszteroid kezelés szerepét a sejtek AA termelésében (mind egészséges humán, mind SLE-s betegek esetében).
4. Kísérleteink második részében a MonoMac-6 sejtek PKC izoenzimjeinek mRNS és protein szintű expressziós mintázatát tanulmányoztuk.
5. Ezután különböző PKC aktivátorok és szelektív gátlószerek, valamint molekuláris biológiai technikák (a jelen lévő izoformák transziens overexpressziója, illetve RNS interferencia) felhasználásával elemeztük a proliferáció és az AA felszabadulás változását.
6. Végezetül vizsgáltuk a MonoMac-6 sejtek az AA termelésében szerepet játszó enzimek és a PKC izoformák kapcsolatát.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgált betegek

A tanulmány során vizsgált egészséges önkéntesek, valamint a betegek a mintavétel előtt mindannyian részletes tájékoztatásban részesültek az Intézeti Etikai Bizottság protokollja szerint, és ezt követően beleegyezésüket adták a vizsgálatok elvégzésére. Az SLE-s populáció 22 betegből (20 nőből és 2 férfiból) állt, mindannyian rendelkeztek az Amerikai Reumatológiai Társaság (ACR) által meghatározott klasszifikációs kritériumtünetek közül legalább négyvel. Tizenegy beteg nem részesült kortikoszteroid kezelésben, míg szintén 11 beteg napi 2-40 mg kortikoszteroid terápiát kapott. Egy nőbeteg, akinek betegségét az első akut fellángolás során frissen diagnosztizáltunk, mind a pulzus szteroid kezelés (4x500 mg metilprednizolon/nap, majd 1x250 mg iv.) előtt, majd 8 nappal a terápia megkezdését követően is résztvett a vizsgálatban. A vizsgálatban 9 Sjögren-szindrómás (SS) nőbeteg vett részt, akik alternáló, 8 mg-os másnapenkénti kortikoszteroid kezelésben részesültek. A hat kevert kötőszöveti betegségben (MCTD) szenvedő beteg mindegyike nő volt, két beteg nem részesült szteroid kezelésben, két beteg napi 4 mg metilprednizolont kapott, mialatt 4 beteg másnaponta 8 mg metilprednizolon-t és naponta 100 mg Cytoxant kapott. A kontroll populációt 21 egészséges kaukázusi személy alkotta (12 nő és 9 férfi).

A tisztított T-sejtek és monociták preparálása

A humán perifériás mononukleáris sejtek szeparálása az SLE-s betegek és egészséges önkéntesek heparinnal alvadásgátolt perifériás véréből történt Boyum metódusát alkalmazva Ficoll gradiens centrifugálással. A T-sejtek és a monociták preparálásához Magnetic Cell Sorting (MACS) technikát alkalmaztunk. A sejteket mágneselesen jelzett CD3, illetve CD14 MACS Microbeads antitestekkel inkubáltuk 4 °C-on 15 percig, majd ismételt mosást

követően a sejtszuspenziót MACS szeparátorba helyeztük és a pozitív sejtpopulációt használtuk a további kísérletekhez. A szeparálás hatékonyságát a CD3, illetve a CD14 sejtfelszíni markerekre alapozva áramlási citométerrel ellenőriztük, amely során az átlagos monocita tisztaság >85 %-osnak, míg a T-sejtek tisztasága >95 %-osnak mutatkozott.

A MonoMac-6 sejtek tenyésztése

A MonoMac-6 sejteket 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú atmoszférában, LPS-mentes környezetben tenyésztettük RPMI-1640 tápoldatban. A médium 15% főtájis borjúsavót, 2 mM L-glutamint, 1 mM nátrium-piruvátot, 0.1 mM nem-esszenciális aminosavakat, 200 U/ml penicillint és 200 µg/ml streptomicint tartalmazott. A sejteket mindig szubkonfluens állapotban, 8x10⁵ sejt/ml denzitás elérésekor passzáltuk.

A PKC izoformák tranziens transzfekciója

A MonoMac-6 sejtek transzfekciója az Amaxa nukleofekciós technika használatával történt. A sejteket (3,5x10⁶ sejt/nukleofekció) centrifugálást követően 100 µl nukleofektor oldatban szuszpendáltuk fel, majd az oldathoz 4 µg zöld fluoreszcens protein (eGFP) konjugált cDNS vektort (amely tartalmazta a különböző PKC izoformákat kódoló szekvenciákat, illetve a kontrollként használt üres eGFP vektort) adtunk. Ezt követően a sejtszuspenziót a gyártól rendelt küvettába helyeztük és az Amaxa Nukleofektor készülékben U1 pulzusparamétert használva végeztük el a nukleofekciót. A procedúrát követően a sejteket azonnal előmelegített 37 °C-os tápoldatba helyeztük, majd 48 órán keresztül 12-lyukú tenyésztőedényekben tenyésztettük. A transzfekciós hatékonyságot fluoreszcens mikroszkóppal, áramlási citométerrel, valamint Western blot technikával ellenőriztük (lásd alább).

Áramlási citometria

A szeparációs és transzfecció hatékonyág, valamint a sejtpusztulás meghatározása áramlási citométer (Coulter Epics XL) használatával történt. A szeparáció effektívitasának vizsgálata során a tisztított T-sejt, illetve monocita sejtpopulációkat fluoreszcens festékkal konjugáltatott monoklonális anti-CD3, illetve anti-CD14 ellenanyagokkal 25 percig inkubáltunk, majd a sejteket 1 %-os paraformaldehiddel fixáltuk. A sejtpopuláció tisztaságának megállapítása a fluoreszcensen jelzett sejtek százalékos arányának mérésével történt. A MonoMac-6 sejtek esetében a transzfecciót követően a sejteket 12-lyukú tenyésztőedényekben növeltük, majd 24, illetve 48 órával az overexpresszió után végeztük a vizsgálatokat. A transzfecció hatékonyágának ellenőrzése az eGFP konjugált PKC vektorokat expresszáló sejtek fluoreszcencia intenzitásának meghatározásával, míg az elpusztult sejtek százalékos aránya az előre és oldalra irányuló fényszórás (forward és side scatter paraméterek) vizsgálatával történt.

RNS interferencia (siRNS)

A MonoMac-6 sejteket 6-lyukú tenyésztőedényekben, szérumot tartalmazó, de antibiotikum-mentes RPMI-1640 oldatban tenyésztettük, majd 5×10^5 sejt/ml denzitásban végeztük el a transzfecciót. Elsőként transzfecciónként 0,5 μ g fluoreszceinnel jelölt üres kontroll, illetve a megfelelő PKC izoformák (cPKC α és β , nPKC δ) elleni siRNS-próbákat 100 μ l transzfecció médiummal hígítottuk, majd a szintén transzfecció médiummal hígított transzfecció reagenssel 25 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az így elkészített oldatot ezt követően a sejtekhez pipettáztuk, majd a kultúrát 6 órán keresztül 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú atmoszférában inkubáltuk. A transzfecció hatékonyágot fluoreszcens mikroszkóppal, míg az siRNS hatékonyágát naponta végzett Western blot segítségével ellenőriztük (lásd alább).

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 antitesttek felhasználásával immunfestést végeztünk. Az immunjelek rögzítése 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.

Kvantitatív „real-time” PCR (Q-PCR)

A kvantitatív-polimeráz láncreakciót az ABI PRISM 7000 Sequence Detection System segítségével, 5' nukleáz assay használatával végeztük. A szeparált sejtszuszpenziókból, illetve a MonoMac-6 sejtekből a teljes RNS-t TRIzol-lal izoláltuk (homogenizálás, RNS szeparálás, RNS precipitáció, RNS mosás, majd az RNS feloldása nukleáz-mentes vízben). Ezt követően 1 µg teljes RNS-ből cDNS-t készítettünk AMV reverz-transzkriptáz és random primer felhasználásával. A PCR amplifikációs reakciót TaqMan primerek és próbákkal végeztük a TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol-t követve. Belső kontrollnak a glicerin aldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) expresszióját határoztuk meg, majd a génexpressziók megállapításához az eredményeket a Δ CT, illetve a $\Delta\Delta$ CT módszert alkalmazva prezentáltuk.

A sejtproliferáció vizsgálata

A proliferáció vizsgálatokor kolorimetriás MTT assay-t alkalmaztunk, aminek alapja a sárga színű tetrazolium MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) lila színű formazán kristállyá alakulása az élő sejtek mitokondriumában. A sejteket 96-lyukú tenyésztőedényekben szélesztettük

5×10^5 sejt/ml denzitásban, majd a megfelelő ideig alkalmazott reagensek különböző koncentrációival kezeltük. Ezt követően minden lyukba 5 mg/ml MTT oldatot pipettáztunk, majd a keletkező formazán kristályok koncentrációját kolorimetriás úton határoztuk meg. Minden kezelést 3-5-szörös ismétléssel végeztünk, az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg.

Arachidonsavfelszabadulás vizsgálata

A sejteket 10^5 sejt/ml denzitásban [^3H]AA-val 37 °C-on 20 órán keresztül inkubáltuk. Többszöri mosást követően a sejteket 4 órán át tovább inkubáltuk tápoldattal (ez reprezentálta a bazális AA termelést), illetve különböző anyagokkal. Ezután a sejtekről azonos mennyiségű felülúszót eltávolítva meghatároztuk a minták percenkénti szcintillációs aktivitását (cpm).

EREDMÉNYEK

A PKC izoenzimek kvantitatív expressziója különböző autoimmun betegekből és egészséges önkéntesekből származó T-limfocitákban

Kísérleteink első részében Western blot technikával meghatároztuk a különböző T-sejt populációk PKC expressziós mintázatát. Kimutattuk, hogy az egészséges egyének T-limfocitáiban 7 PKC izoforma található meg, nevezetesen a klasszikus cPKC α és β , a novel nPKC δ , ϵ , η és θ , valamint az atípusos aPKC ζ . Nem tudtuk ugyanakkor kimutatni a cPKC γ , aPKC λ és a PKC μ jelenlétét.

Ezt követően, az SLE-s betegek esetében, különféle alcsoportok létrehozása mellett döntöttünk. Az izoenzimek kvantitatív expresszióját tanulmányozva bebizonyosodott, hogy azon SLE-s betegek limfocitáiban, akik szteroid kezelésben nem részesültek, a cPKC β , valamint a nPKC δ , ϵ , η és θ expressziója (különböző mértékben) jelentősen és szignifikánsan csökkent, míg

az aPKC ζ szintje mérsékelt, még szignifikáns szupressziót mutatott. Ezzel ellentétben a cPKC α kifejeződése nem változott a kontrollhoz viszonyítva.

Összehasonlítva ezen eredményeket a kortikoszteroid kezelésben részesülő SLE-s betegek hasonló sejtpopulációival azt találtuk, hogy a legtöbb izoenzim expressziója részlegesen, de csaknem teljes mértékben normalizálódott, ugyanakkor a nPKC θ , valamint az aPKC ζ kifejeződése nem különbözött a szteroid kezelésben nem részesülő csoporthoz viszonyítva. Úgy tűnik, hogy mindezen változások SLE-re specifikusnak voltak mondhatók, hiszen az MCTD-s, illetve SS-s betegek limfocitáit tanulmányozva a PKC izoformák szignifikáns mértékű változását nem tudtuk kimutatni.

Változások a PKC izoenzimek expressziójában szteroid kezelésben részesült, illetve nem részesült SLE-s betegek monocitáiban

A következő lépésben megvizsgáltuk a PKC izoformamintázatot az SLE-s betegek monocita sejtpopulációiban is. A limfocitákkal összehasonlítva a monociták expresszálták a cPKC α és β -t, a nPKC δ , ϵ és η -t, valamint az aPKC ζ -t. Az izoenzimek kifejeződését tanulmányozva megállapítottuk, hogy a szteroid kezelésben nem részesült SLE-s betegek monocitáiban néhány izoforma szintje nem változott (cPKC α és β , nPKC η), míg a nPKC δ és ϵ expressziója jelentős, az aPKC ζ szintje mérsékelt, de még szignifikáns mértékű csökkenést mutatott az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva.

Hasonlóan a T-sejtekben kapott eredményekhez, a kortikoszteroid terápiában részesülő SLE-s betegek monocitáiban a különféle (csökkent szintű) PKC izoformák expressziója különböző mértékben tért vissza a kontrollhoz közeli szintre. Nevezetesen, mialatt a nPKC δ és ϵ szintje jelentősen és szignifikánsan megemelkedett (összevetve a szteroid nélküli csoporttal), addig az aPKC ζ szintje továbbra is az egészséges monocitáké alatt marad. Végezetül ezen monocitákban kimutatott változások szintén SLE-specificitást mutattak,

hiszen a SS-s betegek hasonló sejtpopulációjában nem tudtuk a PKC mintázat szignifikáns változását kimutatni.

In vitro kortikoszteroid kezelés hatása a PKC rendszer expressziójára és az AA termelésre

Kísérleteink következő lépéseként megvizsgáltuk az *in vitro* kortikoszteroid (10 μ M hidrokortizon) kezelés hatását a PKC expressziós profilra SLE-ben, valamint egészséges önkéntesek monocitáiban. Kvantitatív „real-time” Q-PCR technikát alkalmazva kimutattuk, hogy egészséges kontrollokban a szteroid adása szelektíven és szignifikáns mértékben növelte az nPKC ϵ mRNS szintjét, ugyanakkor SLE-s monocitákban az *in vitro* kortikoszteroid kezelés hatására mind a nPKC δ , mind a nPKC ϵ mRNS expressziója jelentősen növekedett.

Munkacsoportunk korábbi kísérletei során kimutatta, hogy SLE-s betegek perifériás monocitáiban csökkent az AA termelés az egészséges kontrollhoz viszonyítva, ugyanakkor ezen csökkent produkció nem volt igazolható a szteroid kezelésben részesülő betegek sejteinek vizsgálatakor. Ezért kísérleteinkben elvégeztük az egészséges egyének monocitáinak kortikoszteroid kezelését is. Meglepetésünkre azt tapasztaltuk, hogy a hidrokortizon terápia a nPKC ϵ mRNS overexpressziójának ellenére sem befolyásolta szignifikáns mértékben az AA termelést.

A MonoMac-6 sejtvonal PKC rendszere

Mint korábban bemutattuk, az SLE nagyon gyakran súlyos mono- és limfopeniával társul, illetve a betegség kezelése nagymértékben befolyásolhatja az általunk vizsgálni kívánt rendszer expresszióját, működését. Ezért kísérleteink második részében a MonoMac-6 monocitoid sejtvonalat, mint monocita modellt, alkalmazva kívántuk meghatározni a PKC izoenzimek differenciált szerepét a sejtproliferációban és az AA termelés szabályozásában.

Western blot technikát alkalmazva megállapítottuk, hogy a MonoMac-6 sejtek expresszálják a klasszikus cPKC α és β -t, a novel nPKC δ és ϵ -t, valamint az atípusos aPKC ζ -t; nem tudtuk ugyanakkor kimutatni a nPKC η – ami perifériás humán monocitákban megtalálható – és más PKC izoenzimek (cPKC γ , nPKC θ , aPKC λ , és PKC μ) jelenlétét. Ezen eredményeket megerősítették a Q-PCR-ral kapott adatok, amelyek arról is informáltak, hogy az egyes PKC izoenzimek relatív kifejeződési szintjei különböznek. Nevezetesen, bizonyos PKC izoformák relatív magas (nPKC δ >>>>cPKC β >aPKC ζ), míg mások alacsony (cPKC α >nPKC ϵ) expressziós szinttel bírnak az endogén kontroll GAPDH-hoz viszonyítva.

A PMA hatása a MonoMac-6 sejtek proliferációjára és AA-termelésére

Ezt követően az általános PKC aktivátor forbol 12-mirisztát 13-acetát (PMA) hatását tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy a PMA két napig történő alkalmazása a sejtproliferáció szignifikáns és dóziszfüggő csökkenését eredményezte. Mindezzel párhuzamban Western blottal kimutattuk, hogy a cPKC β és nPKC δ expressziója nagymértékben csökkent (feltehetőleg az izoformák down-regulációja miatt), míg a cPKC α és aPKC ζ szintjei nem változtak. Érdekes módon a nPKC ϵ kifejeződése növekedett a PMA kezelést követően.

Az AA termelés tekintetében azt tapasztaltuk, hogy a forbol-észter jelentős növekedést okozott a sejtek AA felszabadulásban. Annak kiderítésére, hogy mely PKC izoformák játszhatnak szerepet a PMA ezen hatásának kiváltásában, kísérleteinket elvégeztük különböző PKC inhibitorok preinkubációját követően is. Igazoltuk, hogy a Gö6976 (20 nM), a klasszikus (esetünkben tehát a cPKC α és β) gátlószere, valamint a Rottlerint (100 nM) (az nPKC δ specifikus inhibitora) sikeresen (szignifikánsan) kivédte a forbol-észter AA termelést fokozó hatását.

Következő lépésként az előbbi inhibitorokat alkalmazva megváltoztattuk az izoenzimek endogén aktivitását és megvizsgáltuk, hogy ezen beavatkozás hogyan befolyásolja a sejtek nyugalmi, „bazális” proliferációját és AA termelését. A Gö6976, a klasszikus izoformák gátlószerét alkalmazva megállapítottuk, hogy a sejtproliferáció jelentős mértékben és dóziszfüggő módon csökkent. Hasonló eredményt kaptunk az nPKC δ inhibitor Rottlerin esetében is, így az adatok arra utalnak, hogy a „klasszikus” izoformák valamelyike, valamint a nPKC δ endogén aktivitása alapvetően szükséges a MonoMac-6 sejtek „nyugalmi” proliferációjához. Az AA termelés tekintetében azt tapasztaltuk, hogy sem a Gö6976, sem a Rottlerin önmagában alkalmazva nem volt képes befolyásolni a bazális AA felszabadulást.

A cPKC β és a nPKC δ overexpressziója fokozza a MonoMac-6 sejtek bazális, míg a cPKC α transzfekciója gátolja a PMA-indukált AA felszabadulást

A PKC izoenzimek differenciált szerepének további tanulmányozása végett, kísérleteink következő fázisában különböző molekuláris biológiai módszereket alkalmaztunk. Első lépésként nukleofekciós technikát használva elvégeztük a MonoMac-6 sejtekben a jelenlévő PKC izoenzimek rekombináns overexpresszióját. A tranziens overexpressziót követően összehasonlítottuk a kontroll, üres eGFP vektorral transzfektált, illetve minden egyes PKC overexpresszor bazális, valamint PMA indukált AA termelését. Kimutattuk, hogy az üres eGFP vektorral történő transzfekció semmilyen aspektusban nem változtatta meg a sejtek AA felszabadulását. Emellett a cPKC α , nPKC ϵ és az aPKC ζ overexpressziója sem eredményezett változást a sejtek bazális AA termelésében. Ezzel ellentétben a cPKC β és nPKC δ overexpressziója szignifikáns mértékben növelte a bazális AA felszabadulást. Mindazonáltal megállapítottuk azt is, hogy a cPKC α -val történő overexpressziót követően (ellentétben a többi izoformával), a PMA-indukált AA termelés szignifikáns

mértékben csökkent, azaz a konstitutívan aktív cPKC α -val rendelkező sejtek részlegesen „kivédtek” a PMA AA termelést fokozó hatását.

A cPKC β és a nPKC δ AA termelést fokozó hatását a kalcium-independens PLA₂ és DAG lipáz enzimeken keresztül fejt(het)i ki

Következő lépésként, hogy megállapítsuk, hogy a cPKC β és nPKC δ által mediált AA termelés mely PLA₂ enzim aktiválásán keresztül történik, megvizsgáltuk a MonoMac-6 sejtek bazális AA termelését különböző PLA₂ inhibitorok – nevezetesen a cPLA₂-t gátló AACOCF₃ (100 μ M), az iPLA₂ inhibitor PACOCF₃ (10 μ M), valamint a DAG lipázt specifikusan gátló RHC-80267 (10 μ M) anyagok – jelenlétében. A kontroll, nem transzfektált sejtekben a cPLA₂ gátlószer alkalmazása nem befolyásolta, ugyanakkor az iPLA₂, valamint DAG lipáz inhibíciója azonos mértékben és szignifikánsan csökkentette a bazális AA felszabadulást. Fontos hangsúlyozni, hogy ugyanezen jelenséget tapasztaltuk a két overexpresszor (cPKC β és nPKC δ) esetében is.

A cPKC β és a nPKC δ serkenti, míg a cPKC α (kismértékben) gátolja a MonoMac-6 sejtek proliferációját

A tranziens overexpressziós módszer sajnálatos módon több okból kifolyólag sem tette lehetővé a sejtek proliferációjának vizsgálatát. Ezért másik molekuláris biológiai módszert (nevezetesen az siRNS technikát) alkalmaztunk, hogy megállapítsuk az előbbi három izoforma (cPKC α és β , valamint nPKC δ) specifikus, endogén szerepét a MonoMac-6 monocitoid sejtvonal proliferációjának szabályozásában. Western blot technikát alkalmazva igazolódott, hogy az siRNS transzfekciót követően a megfelelő PKC izoformák kifejeződési szintjei jelentősen lecsökkentek a kísérletsorozat 2. napján. Kimutattuk, hogy – a PKC inhibitorokkal kapott adatokhoz hasonlóan – a cPKC β és nPKC δ „knock-down”-ja csökkentette (a 2. napon szignifikáns

mértékben) a sejtek növekedési ütemét. Fontos emellett megjegyezni azt is, hogy az siRNS technológiával „kiütött” cPKC β és nPKC δ eredményeképpen a 2. napon létrejött hatást összeadva pontosan a 2 napig önmagában alkalmazott 10-1000 nM PMA által kiváltott növekedést gátló hatással megegyezőt kapunk. Mindezekkel ellentétben a cPKC α siRNS-vezérelt „down-regulációjának” következtében a proliferáció kismértékben növekedett. Összességében ezek az adatok arra utalnak, hogy a cPKC β és nPKC δ fokozza, míg a cPKC α inkább gátolja a MonoMac-6 sejtek proliferációját.

Kortikoszteroid kezelés a MonoMac-6 sejtekben kizárólag a nPKC ϵ „up-regulációját” eredményezi

Ezt követően, ismerve a PKC izoenzimek pontos szerepét a MonoMac-6 sejtek proliferációjának és AA termelésének szabályozásában, megvizsgáltuk az *in vitro* szteroid kezelés hatását a sejtek PKC expressziós mintázatára és az AA termelésére. Megismételve fent bemutatott kísérletünket kimutattuk, hogy a MonoMac-6 sejtek esetében 10 μ M hidrokortizon két napig történő alkalmazása (az egészséges kontroll monocitákhoz hasonlóan) mind protein, mind mRNS szinten szelektíven csak a nPKC ϵ „up-regulációját” okozza. Emellett azt is megfigyeltük, hogy a hidrokortizon kezelést követően a sejtek AA felszabadulása semmiben nem különbözött a kezeltlen sejtekéhez viszonyítva, ami további bizonyítékkal szolgált azon feltevésünkre, miszerint az nPKC ϵ (feltehetően) nem játszik szerepet a monocitoid sejtek AA termelésének szabályozásában.

MEGBESZÉLÉS

Számos PKC izoenzim expressziós szintje csökkent az SLE-s betegek T-limfocitáiban az egészséges kontrollhoz viszonyítva

Kísérleteink első részében összehasonlítottuk az SLE-s betegek T-limfocitái PKC rendszerének kifejeződési mintázatát egészséges kontrollok T-sejtjeivel, illetve más poliszisztémás autoimmun betegségben szenvedők hasonló sejtpopulációival. Megállapítottuk, hogy az irodalomban korábban leírt csökkent általános PKC aktivitás háttérben sejt- és izoformaspecifikus változások állnak, amelyeket számos tényező, köztük a betegek kortikoszteroid kezelése befolyásol. Kimutattuk, hogy a szteroid terápiaiban nem részesülő SLE-s betegek limfocitáiban a legtöbb PKC izoforma expressziója drámaian csökkent, míg a cPKC α kifejeződése nem változott. Ezzel ellentétben azon betegek, akik szisztémás kortikoszteroid kezelésben részesültek, a legtöbb – de nem az összes – izoforma expressziós szintje javult. Fontos hangsúlyozni, hogy mindezen változások kizárólag az SLE-s betegek T-sejtjeiben voltak kimutathatóak.

Összességében a limfocitákban nyert adataink a következő megfontolásokat vetik fel: (1) ismerte a PKC rendszer központi szerepét a T-sejtek jelátviteli folyamataiban, jelen felfedezésünk részlegesen magyarázhatja az SLE-ben látott komplex abnormalitásokat; (2) mivel ezen változások kizárólag SLE-ben voltak láthatóak, a PKC izoformaprofil poliszisztémás autoimmun betegségekben történő meghatározása (a számos immunológiai és biokémiai paraméter mellett) további differenciáldiagnosztikai segítséget nyújthat, illetve rávilágíthat a betegségek eltérő patomechanizmusára; végezetül (3) a szteroid kezelés hatása megmutatja, hogy a PKC izoformák megváltozott expressziója SLE-ben feltehetőleg egy tranziens állapotnak felel meg.

A T-sejtek szignáltranszdukciós változásai közül SLE-ben központi szereppel bír a TCR ζ -láncának csökkent expressziója, hiszen a TCR aktiváció

(és az ennek következtében kialakuló jelátviteli kaszkád) vezet az autoreaktív T-sejtek kialakulásához és végeredményben a patológiás autoantitestek termeléséhez. A szuppresszió hátterében felmerült az Elf-1 transzkripciós faktor defektusa, amit a molekula foszforilált állapotának megváltozása okoz. Az is ismert emellett, hogy a nPKC θ fokozza az Elf-1 foszforilációját, így a molekula transzlokációját a magba és kapcsolódását a TCR ζ -lánc promóteréhez. Azon eredményünk, miszerint a nPKC θ expressziója jelentősen csökkent SLE-ben és ezt a kortikoszteroid kezelés sem javította, megerősítheti a nPKC θ központi szerepét az SLE-s T-sejtek csökkent szintű TCR ζ -láncának kifejeződésében, a megváltozott jelátviteli kaszkádban, valamint a patológiás autoantitestek termelésében. Ezen adatok ugyanakkor felhívják a figyelmet a betegség terápiájában leggyakrabban alkalmazott kortikoszteroid kezelés limitáltságára is.

Csökkent nPKC δ és ϵ expresszió az SLE-s betegek monocitáiban, melyeket a szteroid kezelés normalizál

Hasonlóan a T-sejtekhez, az SLE-s betegek monocitáiban is megvizsgáltuk a PKC izoenzimek expressziós mintázatát. Elsőként mutattuk ki, hogy SLE-ben a szteroid kezeléstől függő, izoformaspecifikus PKC defektusok vannak jelen, amely egyik oka lehet az SLE-ben látott megváltozott monocita funkcióknak. Jelen munkánkban protein szinten Western blot technikával kimutattuk, hogy az *in vivo* kortikoszteroid kezelésben részesülő SLE-s betegek monocitáiban – ellentétben a nem kezelt esetekkel – az nPKC δ és ϵ expressziója (csaknem teljes mértékben) normalizálódik. Hasonló eredményt kaptunk mRNS szintű vizsgálataink elvégzésekor, amikor szintén azt tapasztaltuk, hogy az *in vitro* szteroid kezelés során kizárólag az eredetileg is jelentősen csökkent nPKC δ és ϵ mRNS szintje „up-regulálódik”, míg a többi izoformáé változatlan marad. Ezen túlmenően érdekes volt megfigyelnünk, hogy egészséges önkéntesek monocitáiban az *in vitro* szteroid terápia más hatást eredményezett; itt ugyanis a hidrokortizon hatására kizárólag az nPKC ϵ mRNS expresszió

kizárólagos fokozódását találtuk. Ezen adatok feltételezik a szteroidok hatásának különbözőségét az egészséges és beteg emberek monocitáiban.

A nPKC δ és a cPKC β központi szereppel bír a MonoMac-6 sejtek proliferációjának és AA termelésének serkentésében

Kísérleteink második részében részletesen megvizsgáltuk egy monocita modellként alkalmazott sejt vonal, a MonoMac-6 sejtek PKC rendszerének szerepét számos sejt folyamat szabályozásában. Többféle molekuláris biológiai és biokémiai módszert igénybe véve kimutattuk, hogy ezen sejtek, hasonlóan a normál humán monocitákhoz, funkcionálisan működő PKC izoformákkal rendelkeznek, nevezetesen expresszálják a klasszikus cPKC α és β -t, a novel nPKC δ és ϵ -t, valamint az atípusos aPKC ζ -t. Kísérleteink során elsőként mutattuk ki, hogy a nPKC δ (ami legnagyobb mértékben van jelen a MonoMac-6 sejtekben) pozitív módon befolyásolja a sejtek proliferációját és AA termelését. Ezen megállapításunkat a következő bizonyítékokkal támasztjuk alá: (1) a kétnapos PMA kezelést követően az izoforma jelentős mértékben „down-regulálódott” – azaz alacsonyabb szinten expresszálódott –, párhuzamban a forbol-észter celluláris proliferációt gátló hatásával; (2) az nPKC δ specifikus, farmakológiai inhibíciója gátolta a sejtproliferációt; (3) az izoenzim szelektív inhibitora csökkentette a PMA indukált AA felszabadulást; (4) az izoformát siRNS technológiával „kiütve” a proliferáció szignifikáns mértékben csökkent. Mindemellett fontos megjegyezni, hogy az nPKC δ inhibitor Rottlerin nem befolyásolta a sejtek bazális AA termelését, ami arra utal, hogy – ellentétben a proliferáció szabályozásában betöltött szerepével – az izoforma endogén, bazális (meglehetősen magas) expressziója és aktivitása nagy valószínűség szerint nem vesz részt a sejtek bazális AA termelésében. Ezzel ellentétben azt tapasztaltuk, hogy az nPKC δ rekombináns overexpressziója (tovább emelve az izoforma aktivitását) szignifikánsan növelte a sejtek bazális AA termelését, azt sugallva ezzel, hogy az izoenzim, az exogén aktivációt követően, már szerepet játszhat

számos olyan ágens hatásának kifejlődésében, melyek serkentik az AA termelést.

Hasonló következtetéseket sikerült levonnunk a másik magasan expresszálandó izoforma, a cPKC β MonoMac-6 sejtek funkcióiban betöltött szerepének vizsgálatakor. Nevezetesen, az izoenzim kifejeződési szintje szintén csökkent a PMA proliferációt gátló hatásával párhuzamban, azonfelül az endogén aktivitás farmakológiai inhibíciója, illetve az izoforma siRNS-vezérelt „eltüntetése” egyaránt szignifikánsan gátolta a sejtek növekedési ütemét. Az AA termelést vizsgálva bebizonyosodott, hogy a cPKC β overexpressziója szintén a bazális AA termelés fokozódásához vezetett, mialatt a cPKC β Gö6976 anyaggal történő gátlása kivédte a PMA AA termelést serkentő hatását. Ezen túlmenően, szintén hasonlóan az nPKC δ -hoz, a cPKC β endogén aktivitásának csökkentése nem befolyásolta a bazális AA termelést.

Végezetül szintén fontos megjegyezni, hogy a cPKC β és az nPKC δ overexpresszorokban megnövekedett AA felszabadulás teljes mértékben megszüntethető volt (hasonlóan a kontroll sejtekéhez) az iPLA $_2$ és DAG lipáz inhibitorok alkalmazásakor. Mindezen adataink arra utalnak, hogy a MonoMac-6 sejtekben a cPKC β és nPKC δ izoformák AA termelést fokozó hatásukat a kalcium-független PLA $_2$ enzimek – mint a PKC izoenzimek potenciális „downstream” célpontjainak – aktiválásán keresztül fejt(het)ik ki.

A cPKC α kismértékben gátolja, míg a nPKC ϵ és az aPKC ζ nem befolyásolja a MonoMac-6 sejtek proliferációját és AA termelését

A cPKC α -val kapott adataink azt sugallták, hogy ez az izoforma (amely nagyon alacsony expressziós szinttel bír) minor és (feltehetően) ellentétes szerepet játszik a MonoMac-6 sejtvonal folyamatainak szabályozásában, amennyiben összehasonlítjuk a cPKC β és a nPKC δ izoenzimek funkcióival. Az egyetlen szignifikáns változás, amit az izoenzim vizsgálatakor megfigyeltünk az volt, hogy a cPKC α overexpressziója sikeresen megakadályozta a PMA AA

termelést fokozó hatását. Érdekes módon az izoforma tranziens transzfekcióját követően sem változott meg a sejtek bazális AA termelése, ami arra utal, hogy az izoenzim nem játszik szerepet ezen sejtfolyamat szabályozásában. Ha figyelembe vesszük továbbá, hogy az alacsony kifejeződési szinttel rendelkező cPKC α siRNS-vezérelt „kiütése” kismértékben növelte a sejtek növekedési ütemét, megállapíthatjuk, hogy az izoenzim negatív szabályozó szereppel bírhat a MonoMac-6 sejtek proliferációjának szabályozásában. Végezetül a cPKC α alacsony endogén expressziós szintje, valamint relatíve kis, de nem elhanyagolható, negatív funkciója a proliferáció szabályozásában megmagyarázza a cPKC inhibitor Gö6976 anyaggal kapott „meglepő” adatunkat. Feltételezésünk szerint a klasszikus (esetünkben cPKC α és β) izoformákat gátló Gö6976 hatását leginkább a sejtosztódást fokozó azon cPKC β gátlásán keresztül fejthette ki, melynek expressziós szintje több mint 7-szer meghaladja a cPKC α -ét, s ezzel összességében proliferációt gátló effektust eredményezett.

Kísérletes adataink szerint a nPKC ϵ és aPKC ζ feltehetően nem vesz részt az előbb említett sejtfolyamatok szabályozásában. Először is ezen izoenzimek tranziens overexpressziója nem változtatta meg a sejtek bazális vagy PMA indukálta AA termelését. Ezen túlmenően a kétnapos PMA kezelés nem befolyásolta az aPKC ζ kifejeződési szintjét. Érdekes módon az nPKC ϵ szintje úgy tűnt, hogy megduplázódott a PMA adását követően, mindazonáltal fontos megjegyezni, hogy ennek az izoformának az expressziója messze a legalacsonyabb (kevesebb, mint 1/20-a) a cPKC β -hoz viszonyítva. Összességében ez arra engedtetett következtetni, hogy a protein szint ilyen mértékű változása elhanyagolható szereppel bír, különösen, ha összevetjük azt a PMA cPKC β és nPKC δ expressziójára kifejtett hatásával.

Kísérleteink klinikai jelentőségei, eredményeink potenciális hasznosítása

A disszertációban eddig bemutatott MonoMac-6 sejtekből és SLE-s, valamint egészséges egyének monocitáiból kapott adataink (reményeink szerint) a klinikai gyakorlatban is relevanciával bírhatnak. Korábban munkacsoportunk kimutatta, hogy szteroid kezelésben nem részesülő „frissen diagnosztizált” SLE-s betegek monocitái csökkent AA termeléssel rendelkeznek. Jelen kísérleteinkben megállapítottuk, hogy ugyanezen sejtpopulációban az nPKC δ és ϵ expressziója meglehetősen alacsony. Hozzáteve ehhez, hogy mind a betegek klinikailag hatásos *in vivo*, mind az izolált monociták *in vitro* kortikoszteroid kezelése normalizálta (a sejtek AA termelése) mellett mindkét izoforma expressziós szintjét (mRNS és protein szinten egyaránt) arra enged következtetni, hogy az SLE-s betegek monocitáinak megváltozott AA termelésének hátterében a patológiás szintű nPKC δ és/vagy ϵ állhat. Ezen túlmenően korábbi eredményeink szintén azt sugallják, hogy a monociták AA termelésének normalizálódása az SLE-s betegek szteroid kezelésekor az iPLA₂ útvonal „re-aktiválódásának” köszönhető. Mindezen adatokat kiegészítve a disszertációban bemutatott eredményekkel, miszerint: (1) egészséges egyének monocitáiban és a MonoMac-6 sejtekben a szteroid kezelés szelektíven csak az nPKC ϵ „up regulációját” eredményezte, mialatt a sejtek AA termelése nem változott; (2) a MonoMac-6 sejtekben az nPKC δ overexpressziója növelte meg jelentősen az AA termelést, míg az nPKC ϵ nem befolyásolta azt; (3) az nPKC δ overexpressziója által bekövetkezett AA termelés fokozódás kivédhető volt az iPLA₂ inhibitor alkalmazásával; egy érdekes hipotézisre hívja fel a figyelmet. Ennek alapján feltételezhető, hogy az SLE-s betegek monocitáiban mért csökkent AA termelés hátterében az nPKC δ mennyiségi és funkcionális defektje áll, ami előre vetíti, hogy az izoforma sejtspecifikus szelektív aktivációja jó terápiás lehetőséget jelenthet az SLE-hez kapcsolt monocitafunkció zavarok megoldására.

Sokkal nehezkesebb feladatnak tűnik ugyanakkor a különböző izoformák egyértelmű szerepének megállapítása és ezeknek megfelelő módon történő korrekciója a limfociták esetében. Eddigi eredményeink arra utalnak, hogy a limfocitáknál tapasztalt általános PKC aktivitás-mérséklődés alapja a (majdhogynem) összes izoforma expressziójának csökkenése, így az egyes izoformák közvetlen aktiválása, a jelenleg elérhető módszerek ismeretében, meglehetősen bonyolultnak tűnik. Kísérletes adataink azonban azt sugallják, hogy az nPKC θ (amely expresszióját a szteroid kezelés sem befolyásolta) különleges szerepének további részletes tanulmányozását követően szóba jön ezen izoforma aktivitásának szelektív fokozása az SLE-ben látott komplex limfocita abnormalitások korrigálására.

Fontos mindemellett hangsúlyozni, hogy ezen változtatásoknak egyelőre csak teoretikus értékei vannak. Fel kell hívnunk a figyelmet arra, hogy a PKC izoformák eltérő sejt- és szövetspecifitású expressziós- és funkcionális profillal rendelkeznek. Ennek megfelelően alapvető jelentőségű, hogy az izoformák aktiválása, vagy szupressziója csak a megfelelő célsejtben jöjjön létre. Nem kívánatos hatást válthat ki egy olyan izoforma aktivitásának fokozása, amely egy másik sejttypusban például a proliferáció serkentésében játszik szerepet, s így akár malignus tumorok létrejöttét eredményezi. További nehézségeket okozhat, hogy – az nPKC δ -t példaként véve – egy izoforma ugyanazon sejtben több funkciót is szabályoz, és az aktiválás során nemcsak az AA termelés, hanem a proliferáció is növekszik. Ennek jótékony (pl. az SLE-ben tapasztalt súlyos monocitopéniát ellensúlyozó) avagy káros (pl. leukémiát eredményező) hatásainak feltérképezése azonban további intenzív kísérletes munkát igényel.

ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során a protein kináz C (PKC) izoenzimek expressziós mintázatát és funkcióját tanulmányoztuk szisztémás lupus erythematosus (SLE) betegek T-sejtjeiben és monocitáiban, valamint a MonoMac-6 sejtekben. Igazoltuk, hogy az SLE-s betegek limfocitáiban a klasszikus cPKC β , novel nPKC δ , ϵ , η és atípusos aPKC ζ expressziója, míg az SLE-s betegek monocitáiban az nPKC δ , ϵ és aPKC ζ szintje csökkent, ugyanakkor a többi izoforma kifejeződése nem változott. Kimutattuk, hogy mind az *in vivo*, mind az *in vitro* kortikoszteroid kezelés (különböző mértékben ugyan, de) csaknem az összes PKC izoforma expresszióját normalizálta. Bebizonyosodott, hogy ezen változások kizárólag az SLE-s betegek esetében mutathatóak ki, azaz Sjögren-szindrómás és Kevert Kötőszöveti Betegségben (MCTD) szenvedők sejtjeiben a PKC izoformák kifejeződése nem változott a kontrollhoz viszonyítva. A MonoMac-6 sejteket vizsgálva igazoltuk, hogy két dominánsan expresszálandó izoforma, a cPKC β és a nPKC δ serkenti a sejtek AA termelését és proliferációját. Bebizonyosodott továbbá, hogy az AA felszabadulás növelésében a kalcium independens foszfolipáz A₂ (iPLA₂) és a diacilglicerol (DAG) lipáz játszik szerepet. Kimutattuk ugyanakkor, hogy a cPKC α kisebb mértékben expresszálandó a sejtekben, és antagonisztikus, gátló funkciót tölt(het) be az AA termelés és proliferáció szabályozásában. Összességében megállapítottuk, hogy a különböző PKC izoenzimek sejt-, szövet- és betegség-specifikus, valamint kortikoszteroid kezeléstől függő expressziós mintázattal rendelkeznek; valamint, hogy specifikus és egymással ellentétes szereppel bírnak a monocitoid sejtek proliferációjának és AA termelésének szabályozásában.

KÖZLEMÉNYEK

A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

In extenso tudományos közlemények:

1. **Griger Z., Páyer E., Kovács I., Tóth I.B., Kovács L., Sipka S., Bíró T.** (2007): Protein kinase C- β and δ isoenzymes promote arachidonic acid production and proliferation of MonoMac-6 cells. *J Mol Med.* 85(9):1031-42. **IF: 5.157**
2. **Biro T, Griger Z, Kiss E, Papp H, Aleksza M, Kovacs I, Zeher M, Bodolay E, Csepany T, Szucs K, Gergely P, Kovacs L, Szegedi G, Sipka S.** (2004): Abnormal cell-specific expressions of certain protein kinase C isoenzymes in peripheral mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: effect of corticosteroid application. *Scand J Immunol.* 60(4):421-8. **IF: 1.912**

Idézhető kivonatok:

1. **Griger Z, Biro T, Papp H, Aleksza M, Kiss E, Zeher M, Bodolay E, Szegedi G, Sipka S** (2004): Effect of corticosteroid treatment on the protein kinase C system in monocytes of patients with systemic lupus erythematosus and in model cell lines *Tissue Antigens* 64 (4): 408-409.

Előadások, poszterek:

1. **Z. Griger, T. Bíró, E. Kiss, S. Baráth, M. Zeher, G. Szegedi, S. Sipka** (2006): Corticosteroid dependent PKC abnormalities both at mRNA and protein level in the mononuclear cells of patients with SLE. *International Congress of Immunogenomics and Immunomics 2006.* oct. 8-12, Budapest, (P 2-24, absztraktkötet 360. o.) poszter.
2. **Griger Z, Bíró T, Kiss E, Baráth S, Zeher M, Szegedi G, Sipka S.** (2006): Corticosteroid dependent PKC isoform abnormalities both at mRNA and protein level in the mononuclear cells of patient with SLE. *1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, 16th European Congress of Immunology, 2006.* sept. 6-9, Paris, (PC-1712, absztraktkötet, 162.o.) poszter.
3. **Sipka S, Griger Z, Bíró T, Aleksza M, Kiss E, Kovács I, Baráth S, Bodolay E, Zeher M, Szegedi G.** (2006): The central role of PKC delta in the impaired production of arachidonic acid in the monocytes of SLE patients. *1st Joint Meeting of European National Societies of*

- Immunology, 16th European Congress of Immunology, 2006. sept. 6-9, Paris, (PC-1713, absztraktkötet, 162.o.) poszter.
4. **Zoltán Griger, Sándor Sipka, Tamás Biró, Magdolna Aleksza, Emese Kiss, Edit Bodolay, Margit Zeher and Gyula Szegedi** (2005): The role of PKC delta in the impaired production of arachidonic acid in the monocytes of SLE patients. MIT, 2005. okt. 19-22, Sopron, előadás.
 5. **Griger Zoltán, Bíró Tamás, Sipka Sándor** (2005): A protein Kináz C rendszer vizsgálata a MonoMac-6 sejtek folyamatainak szabályozásában. Tavaszi Szél, 2005. máj. 5-8. Debrecen (Absztraktkötet, 128-31. o.) előadás.
 6. **Sándor Sipka, Zoltán Griger, Tamás Biró, Helga Papp, Magdolna Aleksza, Emese Kiss, Margit Zeher, Edit Bodolay, and Gyula Szegedi** (2004): The examination of the protein kinase C system in the mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus and in a model cell line. International Congress of Immunogenomics and Immunomics 2004 oct. 3-7., Budapest, P 12-14, poszter.
 7. **Griger Z, Biro T, Papp H, Aleksza M, Kiss E, Zeher M, Bodolay E, Szegedi G, Sipka S** (2004): Effect of corticosteroid treatment on the protein kinase C system in monocytes of patients with systemic lupus erythematosus and in model cell lines. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montreal, Canada, 2004. jul. 18-23. (előadás és poszter).
 8. **Griger Zoltán, Aleksza Magdolna, Kiss Emese, Sipka Sándor, Bíró Tamás** (2004): A kortikoszteroid kezelés hatása a protein kináz C izoenzimre szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegek mononukleáris sejtjeiben, valamint modell sejtvonalakban MÉT LXVIII. vándorgyűlése 2004, jún. 7-9. Debrecen (Absztraktkötet 155. o.) poszter
 9. **Griger Zoltán, Papp Helga, Aleksza Magdolna, Sipka Sándor, Bíró Tamás** (2003) A protein kináz C rendszer vizsgálata szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegek mononukleáris sejtjeiben, valamint modell sejtvonalon MÉT LXVII. vándorgyűlése 2003, jún. 2-4. Pécs (Absztraktkötet 72. o.) poszter

A tézisekben fel nem használt tudományos munkák jegyzéke

In extenso tudományos közlemények:

1. **Bodo E, Biro T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Toth BI, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Kovacs L, 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(4):985-98. **IF: 5.796**
2. **Szántó A, Weisz R, Krenács L, Csiki Z, Griger Z, Zeher M.** (2006): Korai fázisban felismert Takayasu-arteritis. LAM 16(8-9):762-7.

Idézhető kivonatok:

1. *Bodo E, Biro T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Toth IB, Lazar J, Meschalchin A, Ito T, Bettermann A, Pertile P, Kovacs L, Paus R (2004): A 'hot' new twist to hair biology - involvement of vanilloid receptor-1 signaling in human hair growth control. Exp Dermatol 13 (9): 581-581*

Előadások és poszterek

1. **Griger Z, Szántó A, Zeher M** (2007): Súlyos nekrotizáló primer vasculitis egy eset kapcsán. MAKIT, 2007 máj. 17-19, Balatonalmádi, előadás.
2. **Tóth I. Balázs, Géczy Tamás, Telek Andrea, Bodó Enikő, Griger Zoltán, Kovács László, Bíró Tamás** (2005): A vanilloid receptor-1 (TRPV1) szerepe humán faggyúmirigy eredetű sebocyták folyamatainak szabályozásában LXIV vándorgyűlés 2005, Budapest, előadás.
3. **Páyer Edit, Griger Zoltán, Tóth I. Balázs, Bíró Tamás** (2004): A protein kináz C rendszer vizsgálata humán myeloid leukémia sejtvonalakon, MÉT LXVIII vándorgyűlés 2004, jún. 7-9. Debrecen (Absztraktkötet 160. o.), poszter.
4. **Dajnoki Angéla, Nyeste Katalin, Bodó Enikő, Griger Zoltán, Tóth I. Balázs, Bíró Tamás** (2004): A vanilloid receptor-1 (VR1) funkcionális vizsgálata humán szőrtüszőeredetű külső gyökérhüvely keratinocytákban, MÉT LXVIII vándorgyűlés 2004, jún. 7-9. Debrecen (Absztraktkötet 152. o.) poszter.
5. **Dajnoki Angéla, Nyeste Katalin, Bodó Enikő, Griger Zoltán, Tóth I. Balázs, Bíró Tamás** (2004): A vanilloid receptor-1 (VR1) funkcionális vizsgálata humán szőrtüszőeredetű külső gyökérhüvely keratinocytákban, MÉT LXVIII vándorgyűlés 2004, jún. 7-9. Debrecen (Absztraktkötet 152. o.), poszter.
6. **Nyeste Katalin, Dajnoki Angéla, Griger Zoltán, Tóth I. Balázs, Czifra Gabriella, Varga Attila, Kovács Judit, Kovács Ilona, Bíró Tamás** (2004): A vanilloid receptor-1 (VR1) kifejeződésének vizsgálata benignus prostata hyperplasiában és prostata carcinomában, MÉT LXVIII vándorgyűlés 2004, jún. 7-9. Debrecen (Absztraktkötet 159. o.), poszter.

A közlemények összesített impakt faktora: 12,865.