

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

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

Papp Helga



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS-ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET
DEBRECEN, 2004**

BEVEZETÉS

A jelátvitel, a proliferáció és a differenciálódás

A sejt folyamatok szabályozása különféle jelátviteli mechanizmusokon keresztül történik. Ez magában foglalja az agonista kölcsönhatását a receptorral, transzmembrán fehérjék és enzimek aktiválását, másodlagos hírvivő molekulák képződését, valamint intracelluláris enzimek aktiválását. Ezen enzimek közé tartoznak a fehérjék reverzibilis foszforilációját katalizáló protein kinázok, melyek a fehérjék különböző oldalláncain lévő hidroxilcsoportba építik be leggyakrabban az ATP terminális foszfátcsoportját. A fehérje foszforiláció a sejtek csaknem minden folyamatában szabályozó szerepet játszik, azaz a sejt ciklust, a proliferációt, a differenciálódást, a sejtek alakváltozását, kontraktilitását és migrációját, valamint csatorna, iontranszport és receptor fehérjék működését is szabályozzák.

A sejtek proliferációja és differenciálódása a szövetek fejlődésének, növekedésének, valamint a természetes és sérülést követő regenerációnak kulcslépése. A folyamatok komplex szabályozásában – többek között – a különféle protein kináz rendszerek, valamint az intracelluláris kalciumkoncentráció változása játszik meghatározó szerepet. Bebizonyosodott, hogy a sejtfehérjék foszforilációs szintjének kóros megváltozása, illetve az intracelluláris ionkoncentrációk patológiás módosulásai elsősorban a sejtek proliferációs és differenciálódási folyamataiban eredményeznek mélyreható változásokat, melynek egyik legsúlyosabb következménye a daganatos transzformáció. Ismervén a daganatos betegségek incidenciájának és főként mortalitásának riasztóan emelkedő adatait nem meglepő, hogy ezen jelenségek az intracelluláris jelátviteli folyamatok aktivitását szabályozó effektor molekulák kutatására irányították a figyelmet.

A keratinocyták

A proliferáció, a differenciálódás, az apoptózis, valamint a tumorgenezis és progresszió egyik leggyakrabban tanulmányozott modellsejtei a keratinocyták, melyek a bőr legkülső rétegének, az epidermisnek a létrehozásáért és fenntartásáért felelős sejtek. Feladatuk a külső környezet és a test belső része között egy olyan fiziko-kémiai barrier kialakítása, amely védelmet nyújt a külvilág káros hatásaival szemben. A keratinocyták ezen fiziko-kémiai barrier állandóságának biztosítása érdekében folyamatosan és fokozottan proliferálnak, majd differenciálódnak és kialakítják az epidermis öt, különböző proliferációs és differenciáltsági állapottal jellemezhető rétegét. Kimutatták, hogy amennyiben a proliferációs mechanizmusok szabályozásában vagy a mindenkori differenciáltsági fokban változás következik be, úgy hyperproliferatív transzformáció, illetve daganatos elváltozások alakulhatnak ki.

A keratinocyták proliferációját és differenciálódását, valamint az általuk beindított mediátor-termelő és immunológiai folyamatok lépéseit a szomszédos sejtek által termelt citokinek és növekedési faktorok befolyásolhatják. Mivel a keratinocytákban megtalálható ezen ágensek által beindított jelátviteli folyamatok legtöbbször receptora, így a sejtek az ezirányú vizsgálatok ideális célpontjainak tekinthetők.

A HaCaT keratinocyták

A humán dermatológiai kutatások során gyakran felmerül az a probléma, hogy a normál humán epidermális keratinocytákat (NHEK) nehéz hosszú ideig tenyészteni és passzálni, mivel a beinduló apoptózis folyamán elhalnak. Ezért a kutatások egyik célja olyan sejtvonal megalkotása volt, ami *in vitro* jól modellezi a NHEK sejtfolyamatait, ugyanakkor hosszú távon is fenntartható és tenyészthető. Erre az egyik alkalmas sejttípus a humán immortalizált HaCaT sejtvonal. A sejtek előállításuk során bizonyítottan nem szenvedtek daganatos transzformációt, ugyanakkor *in vitro* proliferációs, valamint *in vivo*

tumorgenikus potenciáljuk megnövekedett differenciálódási képességük rovására. Így manapság a NHEK egyik legjobb modelljének tekinthetők olyan keratinocyta-specifikus folyamatok, mint a proliferáció, immortalizáció, transzformáció, valamint a tumorprogresszió vonatkozásában.

A protein kináz C izoenzimek

A protein kináz C (PKC) izoenzimcsalád a szerin/treonin kinázok egyik jelentős képviselője. A mai napig legalább 11 különböző PKC izoenzimet azonosítottak, melyeket szerkezeti jellegzetességeik, valamint aktivációs mechanizmusaik alapján 4 nagyobb csoportba sorolhatunk. A “klasszikus” csoportba (cPKC) 4 izoenzim tartozik: a PKC α , β_I , β_{II} és γ . Ezen izoenzimek közös jellemzője, hogy kalcium- és diacil-glicerol- (DAG), illetve annak exogén megfelelőjeként működő forbol-észter-dependensek, vagyis aktiválódásukhoz ezen anyagokat kofaktorként igénylik. A második csoportba a nem kalcium-dependens PKC δ , ϵ , η és θ izoenzimek tartoznak, melyeket “novel” PKC-nek (nPKC) is szokás nevezni. Közös jellemzőjük, hogy kalcium nélkül, forbol-észterekkel (illetve DAG-lal) is maximálisan aktiválhatók. A harmadik csoportba az “atípusos” izoenzimek sorolhatók (aPKC), melyek közé a PKC ζ és λ/ι izoenzimek tartoznak; lényeges tulajdonságuk, hogy aktiválódásukhoz sem kalciumot, sem forbol-észtert nem igényelnek. Végezetül külön csoportba sorolható a PKC μ , mely mind aktivációját, mind struktúrális jegyeit tekintve rendhagyó izoformának tekinthető.

Szervezetünknek nincs olyan sejttípusa, amely ne rendelkezne valamely PKC izoformával, illetve izoformákkal! Fontos tény ugyanakkor, hogy nem mindegyik izoenzim található meg minden sejttípusban; azaz a PKC izoenzimek a szervezetben az adott speciesre, szövetre, valamint sejtre jellemző megoszlást és mintázatot hoznak létre. Ezen megoszlás gazdagságából fakad, hogy a PKC enzimek az élettani szabályozó folyamatok legszélesebb skáláját képesek

befolyásolni. Alapvető és központi szereppel bírnak (a teljesség igénye nélkül) például a sejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában, a programozott sejthalál (apoptózis) folyamatsorában, meghatározott sejttípusok által termelt mediátorok (vazoaktív anyagok, növekedési faktorok, citokinek) szintézisében, ingerlékeny szövetek elektrofiziológiai jellegzetességeinek (csatorna-aktivitás, akciós potenciál kódolás, izomkontrakció) optimális kialakításában, a központi idegrendszer integritásának és működésének fenntartásában, a szervezet védekező mechanizmusaiban (fagocitózis, immunglobulin termelés), stb.

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

A PKC izoenzimek szabályozó szerepét keratinocyták sejtfolyamatainak vonatkozásában is leírták. Az elsősorban egér keratinocytákon folyó vizsgálatok megállapították, hogy a különböző sejtfolyamatokban több izoenzimnek van/lehet szerepe (PKC α , δ , ϵ , η , ζ). Bebizonyították emellett azt is, hogy a PKC rendszer (főként a PKC α izoenzim) szerepet játszik a sejtek proliferációs és differenciálódási programjának szabályozásában.

A NHEK-ről sokkal kevesebb információval rendelkezünk; habár az előbb említett izoenzimeket (PKC α , δ , ϵ , η , ζ) itt is kimutatták, más izoenzimek jelenlétét sem vethetjük el (PKC β és μ). Bebizonyosodott, hogy a PKC izoformák kifejeződése és szubcelluláris lokalizációja jelesen megváltozott a

extracelluláris kalciumkoncentráció ($[Ca^{2+}]_e$) megemelése, illetve a nagy sejtdenzitás (konfluencia) által indukált differenciálódási program beindulásával párhuzamosan.

Egér és humán keratinocytákban vizsgálták emellett a PKC aktivátor forbol-észterek hatását is. Mindkét sejttípusban azt tapasztalták, hogy a forbol-észter kezelés (pl. forbol-12-mirisztát-13-acetát, PMA) meggátolta a proliferációt és terminális differenciálódást indukált. Kimutatták továbbá, hogy PKC gátlók, a proliferáció serkentése mellett, megváltoztatták a differenciálódási markerek megjelenését, rámutatva a PKC rendszer központi, endogén szerepére a keratinocyták fenti folyamatainak szabályozásában.

Hasonlóan az egér keratinocytákhoz, az utóbbi években a NHEK folyamatainak szabályozásában is beszámoltak számos PKC izoforma specifikus szerepéről. Kimutatták, a PKC α itt is központi szerepet játszik a terminális differenciálódási program beindításában és végrehajtásában. Adenovirus vektorok alkalmazásakor bebizonyosodott az is, hogy a PKC δ és η izoformák overexpressziója szintén meggátolta a sejtek proliferációját és differenciálódást váltott ki. Azt is leírták végezetül, hogy a fenti izoformák transzgenikus jelenléte, ellentétben a tumorgenezis fokozó PKC ϵ kifejeződésével, jelentősen csökkentette az egér bőrben kifejlődő daganatok növekedési ütemét.

PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Az egér és humán keratinocytákkal ellentétben meglehetősen szegényes adatokkal rendelkezünk a PKC izoenzimek szabályozó szerepéről HaCaT keratinocyták esetében. Az igen kisszámú korábbi kísérlet során kimutatták, hogy a PKC rendszer gátlása megváltoztatta a sejtek morfológiáját és az egyes differenciálódási markerek megjelenését. Ezen eredmények ugyanakkor nem

szolgáltattak közvetlen bizonyítékot a PKC rendszer szabályozó szerepéről a HaCaT keratinocyták sejtfolyamataiban, valamint hiányzott a PKC izoenzimek izoforma-specifikus funkcióinak pontos feltérképezése is.

Ennek megfelelően a tézisekben az alábbi célkitűzések kísérletes megvalósítását hajtottuk végre:

1. Elsődleges célunk volt a HaCaT keratinocyták PKC izoenzimintázatának meghatározása. Vizsgáltuk a PKC izoformák kifejeződését, valamint az abban megfigyelhető esetleges változásokat a sejtek proliferációjának és (a nagy sejtdenzitás által beindított) differenciálódásának előrehaladtával.
2. Elemeztük emellett egy általános PKC aktivátor, a PMA hatását a HaCaT keratinocyták folyamataira. Azonosítani kívántuk továbbá, hogy a PMA celluláris hatásának kifejlődésében mely PKC izoenzimek vesznek részt.
3. Az egyes PKC izoenzimek szerepének tisztázására különféle szelektív és specifikus gátlószereket alkalmaztunk, majd vizsgáltuk az alkalmazott anyagok hatását a sejtproliferációra és differenciálódásra.
4. Rekombináns technikákkal bizonyos PKC izoformákat stabilan overexpresszáló HaCaT keratinocytákat készítettünk, majd ezen molekuláris biológiailag megváltoztatott sejteken *in vitro* elemeztük az proliferáció, differenciálódás és apoptózis folyamatait, valamint a morfológiai jellegzetességeket.
5. Végezetül *in vivo* kísérleteinkben a rekombináns módszerekkel megváltoztatott PKC overexpresszor HaCaT sejteket immunhiányos (Severe Combined ImmunoDeficiency, SCID) egerekbe injektáltuk, majd a kifejlődött daganatokat elemezve vizsgáltuk a PKC izoenzimek szerepét a tumorgenezis folyamatainak szabályozásában.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

Az immortalizált humán HaCaT keratinocyta sejtvonalat termosztált körülmények között, 37 °C-on, 5 % CO₂-tartalmú atmoszférában DMEM tápoldatban tenyésztettük, amely 10 % főtális borjúsavót, 2 mM L-glutamint, valamint antibiotikumokat tartalmazott.

PKC vektorok készítése

A PKC vektorokat a korábban leírtak szerint állítottuk elő, melynek során a PKC α , β , δ és ϵ cDNS szekvenciáit egy metallothionein promoter-vezérelt eukarióta expressziós vektorba (MTH) klónoztuk. A vektor szekvenciája a C-terminálison a PKC ϵ 12 aminosavból álló, specifikus szekvenciáját kódoló szakaszát (ϵ -tag) is tartalmazza, melynek fehérjeterméke fúziós proteinként minden egyes rekombináns PKC izoenzim végéhez hozzákapcsolódik.

Rekombináns PKC overexpresszáló keratinocyták készítése

A HaCaT sejteket az üres p ϵ MTH vektorral (kontroll sejtek) vagy a PKC α , β , δ , illetve ϵ cDNS-ét kódoló vektorok egyikével transzfektáltuk Lipofectamine anionos detergens segítségével. A transzfektált sejteket ezután szérum-tartalmú, 750 μ g/ml G418 antibiotikummal (geneticin) kiegészített DMEM oldatban szelektáltuk, majd egyedi kolóniákat (klónok) izoláltunk és Western blot segítségével ellenőriztük a stabil transzfekció és overexpresszió hatékonyságát.

Az élő sejtek számának meghatározása

Az élő sejtek számának meghatározását kolorimetriás MTT assay alkalmazásával végeztük, melynek alapja, hogy az élő sejtek mitokondriális

dehidrogenáz enzimje az MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólium-bromid) tetrazolium gyűrűjét oldhatatlan színes formazánná alakítja, így annak mennyisége, jól korrelálva az élő sejtek számával, kolorimetriásan meghatározható.

A sejtproliferáció vizsgálata

A proliferáció pontos nyomonkövetésére egyrészt bróm-deoxi-uridint (BrDU) felhasználó kolorimetriás assayt végeztünk. A módszer lényege, hogy a timidin-analóg BrDU a proliferáló sejtek DNS-ébe épül be, melynek mértéke a timidin-analóg ellen termeltetett antitest Fab-fragmentjéhez kapcsolt peroxidáz enzim, valamint tetra-metil-benzidin szubsztrát alkalmazásával kolorimetriásan mérhető.

Kísérleteink másik részében a PKC overexpresszorok kettőződési idejének, valamint maximális sejtszámának megállapításához a sejteket tripszin alkalmazásával learattuk, majd a sejtszámot hemocitóméter segítségével határoztuk meg. A kettőződési idők kiszámításához a következő egyenletet használtuk: $\tau = D/\log_2(N/N_0)$, ahol τ a kettőződési idő, D a tenyésztési napok száma, N és N_0 a sejtek száma a kísérletek végén és az elején. A maximális sejtdenzitás megállapításához a sejteket a konfluencia eléréséig növesztettük, majd további három napig posztkonfluens állapotban tartottuk őket, végül a fenti módszer szerint sejtszámolást végeztünk.

Western (immuno)blot

A sejteket hideg foszfát-pufferrel (PBS) mostuk, majd lízis-pufferben homogenizáltuk és a proteintartalmat meghatároztuk. Ezután SDS poliakrilamid gélelektroforézissel mintánként 20-30 μ g proteint választottunk szét 7,5 %-os gélen, majd a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 5 % sovány tejport tartalmazó PBS-ben (5 % tej-PBS) 30 percig blokkoltuk, majd 5 %-os tej-PBS-ben hígított megfelelő elsődleges (a

PKC izoformákat, valamint a különféle differenciálódási markereket felismerő) antitestekkel inkubáltuk. A membránokat ezt követően megfelelő másodlagos, torma-peroxidázzal kapcsolt antitesttel inkubáltuk, végül az immunreakciók eredményét kemilumineszcens módszerrel tettük láthatóvá.

Immuncitokémia

A tenyésztett HaCaT sejteket hideg acetonnal fixáltuk, majd a fedőlemezeket borjú szérum albumint tartalmazó blokkoló oldattal blokkoltuk. A sejteket ezután PKC ellenes nyúlban termeltetett elsődleges antitesttel inkubáltuk, majd biotinilát, kecskében termeltetett nyúl ellenes antitesttel, végül streptavidin Texas Red komplex-szel végeztünk immunjelölést.

Intracelluláris kalciummérés

A fedőlemezre szélesztett sejteket 5 μM kalcium érzékeny fluoreszcens fura 2 festék acetoximetilészter formájával töltöttük fel, majd fluoreszcens mikroszkópon keresztül vizsgáltuk az intracelluláris kalciumkoncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) változását. Ehhez az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk kettős monokromátor, valamint on-line kapcsolt számítógép segítségével (PTI Deltascan készülék), majd a fluoreszcens emissziót 510 nm-en detektáltuk 10 Hz-es mintavételi frekvenciát használva fotoelektron-sokszorozó segítségével. Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban bekövetkezett változásokat a Grynkiewicz és mtsai (1985) által kidolgozott módszerrel vizsgáltuk. A kísérleteink során látóterenként 20 sejt nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ját határoztuk meg, majd az értékeket átlagoltuk és átlag $\pm$ SEM formában adtuk meg. A statisztikai analízist Student-féle t -próba alkalmazásával végeztük el.

A rekombináns PKC izoenzimek aktivitásának meghatározása (kinase assay)

A transzfektált HaCaT sejtek PKC aktivitásának megállapítása során a sejteket lízis-pufferben homogenizáltuk, majd a sejt-lizátumok kináz-aktivitását

hiszton III (H-III), valamint miozin könnyű-lánc-kináz 20 (MLCK 20) szubsztrátok segítségével vizsgáltuk, a [γ - 32 P]ATP beépülését mérve.

Az apoptózis meghatározása

Az egyes PKC izoformákkal, valamint az üres vektorral stabilan transzfektált HaCaT sejteket 10 μ M $1\alpha,25$ -dihidroxivitamin D_3 -mal ($1\alpha,25(OH)_2D_3$), illetve 50 nM tumor necrosis faktor- α -val (TNF α) kezeltük két napig. Ezután a sejteket fluorescein-izotiocianát (FITC)-konjugált annexin V-tel inkubáltuk, majd áramlási citométer segítségével meghatároztuk az apoptotikus sejtek számát az össz-sejtszámhoz viszonyítva.

A tumorigenezis vizsgálata SCID egerekben

A különböző PKC izoformákat overexpresszáló sejteket (a kontroll HaCaT sejtekkel egyetemben) $1-2 \times 10^6$ élő sejt/200 μ l denzitásban immunhiányos (SCID) egerekbe intradermálisan injektáltuk. Az állatokat 30 nap elteltével eutanizáltuk és vizsgáltuk a kialakult tumorok átlagos háromdimenziós méreteit, valamint hisztológiai jellegzetességeit.

Hisztológia és immunohisztokémia

A kialakult tumorok hisztológiai paramétereit hematoxin-eozin (HE)-festett metszeteken határoztuk meg. A sejtosztódások átlagos számának megállapításához fénymikroszkóp segítségével tíz különböző, nagy nagyítású látótérben megszámoltuk a mitózis látható jeleit mutató sejtmagvakat. Ezen túlmenően a proliferáló sejtek számának meghatározásához a metszeteket a proliferációs (nukleáris) marker Ki-67 ellen festettük meg egy háromlépéses streptavidin-biotin-komplex (SABC) alapú immunhisztokémiai eljárás segítségével.

EREDMÉNYEK

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

Kísérleteink során első lépésben immuncitokémia és Western blot technikák alkalmazása során megállapítottuk, hogy a HaCaT keratinocytákban 7 PKC izoforma expresszálódik: a “klasszikus” cPKC α és β ; a “novel” nPKC δ , ϵ , η , és θ ; illetve az atípusos aPKC ζ . Egyik módszerrel sem tudtuk ugyanakkor a cPKC γ és az aPKC $\lambda/1$ jelenlétét igazolni a sejtekben. Kimutattuk azt is, hogy az egyes izoenzimek szintje eltérő módon módosult a tenyésztés során. Voltak olyan izoformák (cPKC α és β ; az nPKC η és θ ; valamint az aPKC ζ), melyek szintje nem változott jelentősen a sejtek proliferációjának és (a nagy sejtdenzitás által beindított) differenciálódásának előrehaladtával. Ezzel szöges ellentétben, az nPKC δ jelentős (és folyamatosan növekvő) expressziót csak a differenciálódó kultúrákban mutatott, míg az ugyancsak “novel” nPKC ϵ szintje a proliferáló sejtekben növekedett, ugyanakkor a differenciálódó (posztkonfluens) tenyészetekben praktikusán nem volt kimutatható az izoforma. Konfokális mikroszkópia alkalmazásakor ugyanakkor kiderült, hogy egyik PKC enzim szubcelluláris lokalizációja sem változott meg a sejtek proliferációjának és differenciálódásának előrehaladtával.

2) A differenciálódási markerek kifejeződése, valamint a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ változik HaCaT keratinocyták proliferációja és differenciálódása során

Vizsgáltuk továbbá a HaCaT keratinocyták differenciálódási markereinek megjelenését. Megállapítottuk, hogy a keratin (K) 10 expressziója a maximumot a konfluencia utáni 1-2. napon érte el (korai differenciálódási marker), míg az involucrin (INV), filaggrin (FIL) és transzglutamináz-1 (TG) expressziós szintje a posztkonfluens kultúrákban volt a legnagyobb (késői-terminális

differentiálódási markerek). A hyperploriferatív asszociációs marker K17 szintje nem változott jelentősen a tenyésztés előrehaladtával. Kimutattuk emellett, hogy az ugyancsak differentiálódási markernek tekinthető nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ a prekonfluens kultúrákban folyamatosan csökkent a proliferációval párhuzamosan, ugyanakkor jelentősen megnövekedett a differentiálódás késői fázisaiban.

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

Következő kísérleteinkben a PMA hatását vizsgáltuk a HaCaT sejtek folyamataira. Prekonfluens (proliferáló) HaCaT keratinocytákat vizsgálva kimutattuk, hogy a PMA jellegzetes módon (“U-alakú” görbe) dózis-függően csökkentette a sejtek proliferációját (leghatásosabbnak a 10 és 100 nM dózisban alkalmazott PMA bizonyult). Ezen hatása PKC-specifikus volt, hiszen a szelektív PKC gátlószer, a GF109203X jelentősen kivédte a PMA által indukált proliferáció csökkenést. Differentiálódó sejteket elemezve megállapítottuk, hogy a forbol-észter kezelés csökkentette a K10 (korai marker) és K17 (hyperproliferatív marker) szintjét, ugyanakkor a késői és terminális differentiálódási markerek (INV, FIL és TG) expressziója fokozatosan és jelentősen növekedett PMA hatására. Kimutattuk emellett azt is, hogy a PMA prekonfluens kultúrákban jelentősen megnövelte a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -t, mely jelenség szintén a terminális differentiálódás indukciójára utal.

4) A PMA proliferációt és differentiálódást befolyásoló hatását eltérő PKC izoformák mediálhatják HaCaT sejtekben

Proliferáló HaCaT keratinocytákat vizsgálva bebizonyosodott, hogy a PMA kezelés a különböző izoenzimek szintjét eltérő módon változtatta meg. Habár általánosan elmondható volt, hogy az összes PMA-szenzitív (azaz cPKC és nPKC) izoforma szintje csökkent a kezelés hatására, a PMA-indukálta down-

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

Differenciálódó HaCaT sejtekben a PMA ugyancsak eltérő módon változtatta meg az egyes izoformák kifejeződését. Kimutattuk ugyanakkor, hogy a PMA-érzékeny PKC izoforma-populáció jelentősen eltért a differenciálódó és proliferáló keratinocytákban. Azaz, a forbol-észter alkalmazása, szöges elletétben a proliferáló sejtekben tapasztaltakkal, nem változtatta meg a proliferáló sejtekben down-regulálódott $\text{nPKC}\delta$ és η szintjét. Ezen túlmenően, habár a PMA a differenciálódó sejtekben is jelentősen csökkentette a $\text{PKC}\alpha$ és θ izoenzimek expresszióját, a forbol-észter eltérő dózis-hatás viszonyok mellett fejtette ki celluláris hatását a kétféle sejtpopuláción. Végezetül megállapítottuk azt is, hogy a PMA hasonló hatékonysággal csökkentette a $\text{cPKC}\beta$ expresszióját a differenciálódó keratinocytákban és a proliferáló sejtekben.

5) Különböző PKC inhibitorok hatása HaCaT keratinocyták proliferációjára és differenciálódására

Különféle PKC inhibitorok hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy a GF109203X, mely a cPKC és nPKC izoenzimek együttes gátlószere, jelentősen és dózis-függő módon szupresszála a késői differenciációs markerek (INV, FIL és TG) expresszióját. Bebizonyosodott ugyanakkor, hogy az inhibitor nem módosította a HaCaT keratinocyták proliferációját. Kimutattuk azt is, hogy Gö6976, mely a $\text{cPKC}\alpha$ és β gátlószere, jelentősen és dózis-függően gátolta a

sejtek proliferációját, ugyanakkor a GF109203X hatásához nagyon hasonlóan lecsökkentette az INV, a FIL és a TG expresszióját. Megállapítottuk emellett, hogy a nPKC δ specifikus inhibitora, a Rottlerin dózis-függő módon megnövelte a sejtek proliferációját, ugyanakkor – nagyon hasonlóan a GF109203X és Gö6976 gátlószerek hatásához – lecsökkentette a differenciálódási markerek (INV, FIL, TG) szintjét.

6) A PKC izoenzimek rekombináns overexpressziójának hatása HaCaT sejtek morfológiájára

Ezután különféle PKC izoformákat stabilan overexpresszáló sejteket készítettünk el rekombináns technikák segítségével. Megállapítottuk, hogy a PKC izoformák overexpressziója eltérően befolyásolta a HaCaT keratinocyták morfológiáját. A kontroll HaCaT sejtek megszokott, karakterisztikus macskakő rajzolata drámaian megváltozott az nPKC ε overexpressziójának hatására; a sejtek fibroblast-szerű, orsó alakú struktúrát kezdtek mutatni. Ezen felül a cPKC β -t overexpresszáló sejtek alakja is megnyúltabbá vált és sokkal nagyobb denzitású szigetecskéket formáltak a tenyésztés során. Az nPKC δ és cPKC α overexpresszója nem járt drámai morfológiai változásokkal, bár az nPKC δ -t overexpresszáló sejtek megjelenése mintha még jobban hasonlított volna a macskakő rajzolatára.

7) A PKC izoenzimek rekombináns overexpressziójának hatása HaCaT sejtek proliferációjára és differenciálódására

A sejtek *in vitro* sejtfolyamatait vizsgálva kiderült az is, hogy a PKC izoformák overexpressziója jelentősen megváltoztatta a HaCaT keratinocyták proliferációját. A cPKC α és az nPKC δ overexpressziója lecsökkentette a sejtek növekedését, osztódási ütemét, valamint a tenyészetekben megfigyelhető szaturációs denzitást. Ezzel ellentétben, a cPKC β -t és az nPKC ε -t

overexpresszáló keratinocyták a kontroll sejtekhez képest erőteljesebb proliferációt, felgyorsult osztódási ütemet, valamint megnövekedett szaturációs denzitást mutattak.

Kvantitatív Western blot alkalmazásával kimutattuk emellett, hogy a cPKC α -t és az nPKC δ -t overexpresszáló (azaz hipoproliferatív) sejtekben a késői-terminális differenciálódási markerek (INV, FIL, TG) szintje jelentősen megemelkedett, míg a cPKC β és az nPKC ϵ izoformát overexpresszáló (hiperproliferatív) keratinocytákban ezen molekulák szintje lecsökkent a kontroll HaCaT sejtekhez képest.

8) A PKC izoenzimek rekombináns overexpressziójának hatása HaCaT sejtek apoptózisára

Az apoptózis jelenségét annexin V-alapú áramlásos citometriás technikával elemezve kimutattuk, hogy nem volt szignifikáns eltérés a bazális apoptózis mértékében a kontroll, valamint a cPKC β -t és az nPKC ϵ -t overexpresszáló sejtek esetében. Ezzel szemben az nPKC δ izoenzimmel transzfektált sejtekben – és, bár kisebb mértékben, de a cPKC α -t overexpresszáló sejtekben is – a bazális apoptótikus ráta magasabb volt, mint a kontroll sejtek esetében. Ezen felül a cPKC α , valamint az nPKC δ overexpressziója a kontroll sejtekhez képest megnövelte a transzfektált sejtek érzékenységét a 10 μ M 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$, valamint az 50 nM TNF α indukálta apoptózis iránt, míg a cPKC β és az nPKC ϵ overexpresszorok ezen anyagok hatásával szemben kisebb szenzitivitást mutattak, mint a kontroll sejtek.

9) A PKC izoformák overexpressziójának hatása a tumorgenezisre SCID egerekben

Végezetül a tumorgenezisre, azaz az *in vivo* sejtproliferációra irányuló vizsgálatokban meghatároztuk az egyes PKC izoenzimeket overexpresszáló

sejtek viselkedését. A különböző PKC izoformákat overexpresszáló (valamint kontroll) HaCaT keratinocyták szuszpenzióját SCID egerekbe injektáltuk, majd 30 nap elteltével meghatároztuk a kialakult tumorok jellemzőit. Kimutattuk, hogy a kontroll HaCaT sejtek egy bazális sejtekben gazdag, a periférián expanszív növekedést mutató tumort formálnak, centrálisan élénk sejtéréssel és differenciálódással (keratin gyöngyök, dyskeratoticus sejtek, néha cisztaképződés). A proliferációt, valamint a differenciálódást mutató területek relatív nagysága megközelítőleg egyformának mutatkozott. Az eltérő PKC izoformákat overexpresszáló HaCaT sejtek egerekbe injektálása alapvetően nem változtatta meg a kialakult tumorok fő hisztológiai jellemzőit. Azaz minden egyes tumor megtartotta expanszív növekedési tulajdonságát (környezetét nem infiltrálva, benignusan növekedett), valamint azt a szövettani jellegzetességét, hogy a tumor centrumában a sejtek differenciálódása észlelhető, a periférián pedig erőteljes proliferáció.

Megállapítottuk ugyanakkor, hogy a különböző izoenzimek esetében a tumorok átlagos méretében, az osztódó sejtek számában, valamint (a szövettani metszeteken) a proliferációt és a differenciálódást mutató területek relatív arányában jelentős különbségeket tapasztaltunk. Az nPKC ϵ és a cPKC β overexpressziója jelentősen fokozta a tumorok növekedési ütemét (megnövekedett tumorméret és osztódó sejtek száma). Ezen túlmenően, a proliferáló területek relatív aránya a differenciálódó területekhez képest szintén megemelkedett ezen tumorok esetében. Ezzel szemben a cPKC α és az nPKC δ overexpresszorok által indukált tumorok esetén az átlagos tumorméret és a mitózisok száma is lecsökkent, valamint ezen daganatok esetében a differenciálódó területek domináltak. Mindezen adatainkat a Ki-67 pozitív (azaz proliferáló) sejtek számának meghatározása is alátámasztotta.

MEGBESZÉLÉS

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

Vizsgálataink során először a HaCaT keratinocyták PKC izoenzimmintázatát írtuk le. Kimutattuk, hogy a HaCaT sejtek számos PKC izoenzimet expresszálnak: a cPKC α -t és β -t; a nPKC δ -t, ϵ -t, η -t és θ -t; valamint az aPKC ζ -t. Általánosan elfogadott, hogy a NHEK a PKC α , δ , ϵ , η és ζ izoformákat expresszálják, ugyanakkor a PKC β , γ és μ jelenlétét is dokumentálták korábban. Mivel a nPKC θ volt az egyetlen izoenzim, melyet NHEK-ban nem találtak meg (ugyanakkor mi sikerrel mutattuk ki HaCaT sejtekben), eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a HaCaT keratinocyták PKC izoenzimintázata nagyon hasonló a NHEK-ben találhatóhoz.

Ugyanakkor amennyiben megvizsgáltuk az egyes izoenzimek kifejeződését, valamint szubcelluláris lokalizációját a sejtek proliferációja és differenciálódása során, néhány jelentős különbséget is találtunk. A HaCaT sejtekben esetében az egyes izoenzimek expressziója eltérő módon változott a tenyésztés során. Az nPKC δ expressziója növekedett a proliferációval és differenciálódással, míg az nPKC ϵ expressziója bifázisos mintázatot mutatott; azaz expressziója folyamatosan nőtt a proliferáló sejtekben, míg szintje folyamatosan csökkent (majd eltűnt) a differenciálódással párhuzamosan. A többi izoforma expressziója nem változott a tenyésztési idő előrehaladtával. Irodalmi adatokból kiderült, hogy NHEK-ban *in vitro* a PKC izoenzimek expressziójának szintje nem változott jelentősen a nagy sejtdenzitás által kiváltott differenciálódás során, ugyanakkor *in vivo* a nPKC η jelentős mértékben a differenciált rétegek keratinocytáiban expresszálódott. Ehhez nagyon hasonlóan, NHEK-ban és egér keratinocytákban a megnövelt $[Ca^{2+}]_e$

által beindított differenciálódási program során jelentősen megváltozott a PKC izoenzimek expressziója és aktivitása.

A HaCaT sejtek és a NHEK között az egyik legjelentősebb különbséget ugyanakkor akkor tudtunk kimutatni, amikor az egyes PKC izoenzimek szubcelluláris lokalizációját vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a HaCaT keratinocytákban a jelenlévő izoenzimek lokalizációja nem változott, ellentétben a humán és egér keratinocytákkal, melyekben bizonyos izoformák transzlokálódtak a differenciálódás során. Ez a különbség egyrészt adódhat a HaCaT sejtekben kifejeződő PKC izoformák jellegéből, másrészt az intracelluláris lokalizáció vizsgálatára használt eltérő kísérletes megközelítésekből is.

2) A PKC rendszer aktiválása PMA-val terminális differenciálódást indukál

Az általános PKC aktivátor PMA *in vitro* hatását tanulmányozva megállapítottuk, hogy a forbol-észter, specifikusan hatva az érzékeny PKC izoenzimekre (lásd alább), meggátolta a HaCaT sejtek proliferációját, valamint – hasonlóan a NHEK esetében leírtakhoz – terminális differenciálódást indított el. Megállapítottuk azt is, hogy a PMA eltérő izoenzimek különböző mértékű befolyásolása (azaz down-regulációja) révén fejtette ki celluláris hatásait a proliferáló (proliferáció gátlása) és a differenciálódó (terminális differenciálódás indukciója) HaCaT keratinocytákon. A proliferáló sejtekben a PMA praktikusán az összes szenzitív (cPKC és nPKC) izoenzimet down-regulálta, habár a down-reguláció mértéke, valamint a PKC izoformák PMA-val szemben mutatott érzékenysége meglehetősen eltérő volt az egyes PKC izoformák esetében. A differenciálódó sejtekben ugyanakkor – habár a PKC α , β és θ izoenzimeket a forbol-észter itt is down-regulálta – a nPKC δ és η színjét a PMA kezelés alig módosította. Ezen túlmenően azon izoenzimek közül, melyek mind a proliferáló, mind a differenciálódó sejtekben down-regulálódnak PMA hatására, a cPKC α

jobban down-regulálódott a differenciálódó sejtekben, míg a nPKC θ szintje inkább a proliferáló sejtekben csökkent. Úgy tűnik tehát, hogy a nagy sejtdenzitás által indukált differenciálódási program beindulásával a legtöbb PKC izoenzim PMA iránt mutatott érzékenysége megváltozott, mely az egyes PKC izoformák fenti folyamatokat szabályozó aktivitásában bekövetkező lehetséges változásokra utalhat.

Amennyiben feltételezzük, hogy egyes izoenzimek az adott sejtben különböző és gyakran ellentétes szereppel bírnak bizonyos sejtfolymatok szabályozásában, a PKC izoformák eltérő érzékenysége a PMA hatásával szemben magyarázatot adhat a különböző dózis-hatás viszonyok érvényesülésére a PMA által kifejtett a proliferáció-gátlásban, illetve az egyes differenciálódási markerek expressziójának befolyásolásában. Például, a proliferációs kísérletekben a PMA jellegzetes “U-alakú” görbe szerint fejtette ki gátló hatását; azaz, a 100 nM PMA hatásosabbnak bizonyult a proliferáció csökkentésében, mint a 1 μ M-os koncentráció. A fenti hipotézis tükrében ezt úgy (is) magyarázhatjuk, hogy a két PMA dózis más-más PKC izoenzim expressziós mintázatot hozott létre az izoformák eltérő down-regulációja révén. Így ha az 1 μ M PMA (ellentétben a 100 nM hatásával) olyan PKC izoenzim(ek) aktivitását csökkentette, mely(ek) gátolják(k) a proliferációt és/vagy olyan izoformá(k) aktivitását növelte, mely(ek) fokozzák a sejtnövekedést, akkor ez a magasabb koncentrációjú PMA kevésbé kifejezett proliferációt gátló hatásában nyilvánulhat(ott) meg.

3) A PKC izoenzimek specifikus szerepe a proliferáció, a differenciálódás, az apoptózis, valamint a tumorigenezis szabályozásában HaCaT sejtekben

Molekuláris biológiai kísérleteink további bizonyítékokat szolgáltatottak a PKC enzimek izoforma-specifikus szerepét illetően. A keratinocyták biológiai folyamatainak egyik leginkább tanulmányozott PKC izoenzimjéről, a cPKC α -

ról korábban már kimutatták, hogy központi szerepet játszik a terminális differenciálódási folyamatokban egér és humán keratinocytákban. Ezzel jó összhangban kísérleteinkben kimutattuk, hogy a cPKC α overexpressziója fokozta a differenciálódást és az apoptózist kiváltó ágensek iránt mutatott érzékenységet, ugyanakkor meggátolta a sejtproliferációt és a tumornövekedést. Ezen eredményeink tehát arra utalnak, hogy – hasonlóan az NHEK sejtekben betöltött szerepéhez – a cPKC α központi helyet foglal el HaCaT keratinocytákban is a proliferáció negatív, míg a differenciálódás pozitív szabályozásában.

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

A novel nPKC izoformák vizsgálata során drámaian hasonló jelenséget figyelhattunk meg. Az irodalmi adatok alapján a nPKC ϵ számos sejttypus estében bizonyult a sejtproliferáció kulcsfontosságú pozitív regulátorának. A nPKC ϵ overexpressziójának esetében kimutatták azt is, hogy az patológiás proliferációhoz vezet, míg az enzim down-regulációja, illetve domináns negatív

mutánsának overexpressziója a proliferáció gátlódását, valamint a differenciálódás indukcióját eredményezte. Ezenfelül a nPKC ϵ -ről nemrégiben bebizonyosodott, hogy szerepet játszik transzgenikus egerek bőrtumorainak kialakulásában is. Megállapítottuk, hogy – csakúgy mint az NHEK-ban – a nPKC ϵ a HaCaT sejtek esetében is kizárólag a proliferáló sejtekben expresszálódik és a differenciálódó sejtekben nincs jelen. Ezen túlmenően kimutattuk, hogy az nPKC ϵ -t overexpresszáló sejtek növekedési üteme és tumort indukáló hatása drámaian megnövekedett, míg differenciálódási és apoptotikus kapacitásuk lecsökkent. Adataink tehát egyértelműen azt sugallják, hogy ezen izoforma pozitívan regulálja mind az *in vitro*, mind az *in vivo* növekedési folyamatokat HaCaT keratinocytákban.

A nPKC δ tekintetében eredményeink ezzel ellentétesnek adódtak, ugyanis ezen izoforma a differenciálódás és az apoptózis pozitív regulátoraként működött, ezzel párhuzamosan pedig gátló hatást fejtett ki a sejtproliferációra és a tumornövekedésre. Számos kutatócsoport beszámolt arról, hogy NHEK-ban a nPKC δ aktivációja vagy overexpressziója meggátolta a sejtproliferációt, elősegítette a differenciálódási program beindulását, továbbá számos apoptózist indukáló anyag hatását mediálta. Ezen túlmenően HaCaT sejtekben kimutatták azt is, hogy a Ha-ras overexpresszió okozta malignus transzformáció (azaz megnövekedett proliferációs kapacitás és lecsökkent differenciálódási tendencia) esetében a nPKC δ izoenzim eltűnt a sejtekből, valamint, hogy a kontroll HaCaT sejtek Rottlerinnel való kezelése megváltozott (proliferáló) fenotípus kialakulásához vezetett. Ezen irodalmi adatokkal jó összhangban lévő eredményeink is arra utalnak, hogy az nPKC δ központi szerepet játszik a differenciálódás, valamint az apoptózis beindításában, illetve kifejlődésének elősegítésében.

Végezetül fontos megemlítenünk, hogy, legjobb tudomásunk szerint, a mi munkánk volt az irodalomban az első, amely a HaCaT sejtek tumort indukáló

hatásáról számoltak be SCID egerekben. Kimutattuk, hogy a „nude” egerek esetében kapott eredményekkel ellentétben – ahol a HaCaT sejtek jellegzetes, pár hét után regrediáló cisztikus granulumokat formáltak – SCID állatokban a HaCaT keratinocyták expanszívan növekedő, benignus tumorokat idéztek elő, melyek szövettanilag nagyon hasonlítottak a ras-transzfektált (de malignusan nem transzformált) HaCaT klónokkal beoltott egerek korábban leírt tumoraihoz. Ezen adatok alapján tehát elmondhatjuk, hogy – hasonlóan más tumort indukáló sejttípus növekedési tulajdonságaihoz – a HaCaT sejtek tumorigenikus képessége erőteljesebben érvényesül SCID egerekben, mint „nude” egerekben. Mindazonáltal, mivel egyik PKC izoforma overexpressziója sem okozott malignus átalakulást (még a hyperproliferatív cPKC β -é vagy az nPKC ϵ -é sem), szemben a bizonyos Ha-ras transzfektáció malignitásával, eredményeink arra utalnak, hogy habár bizonyos PKC izoformák *in vitro* és *in vivo* is stimulálják HaCaT keratinocyták növekedését, konstitutív kifejeződésük önmagában nem elegendő ezen sejtek malignus transzformációjához.

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

ÖSSZEFOGLALÁS

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

KÖZLEMÉNYEK

AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

- 1) **Papp H.**, Czifra G., Lázár J., Gönczi M., Csernoch L., Kovács L., and Bíró T. (2003): Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol.* **12**:811-824. **IF: 2,303**
- 2) **Papp H.**, Czifra G., Bodó E., Lázár J., Kovács I., Aleksza M., Juhász I., Ács P., Sipka S., Kovács L., Blumberg P.M., and Bíró T. (2003): Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**:1095-1105. **IF: 5,259**

TOVÁBBI IN EXTENSO KÖZLEMÉNYEK:

- 3) Boczán J., Bíró T., Czifra G., Lázár J., **Papp H.**, Bárdos H., Ádány R., Mechler F., and Kovács L. (2001): Phorbol ester treatment inhibits proliferation and differentiation of cultured human skeletal muscle satellite cells by differentially acting on protein kinase C isoforms. *Acta Neuropathol.* **102**:55-62. **IF: 2,283**
- 4) Gönczi M., **Papp H.**, Bíró T., Kovács L., and Csernoch L. (2002): Effect of protein kinase C on transmembrane calcium fluxes in HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **11**:25-33. **IF: 2,303**

IDÉZHETŐ ELŐADÁSKIVONATOK:

- 1) Bíró T., **Papp H.**, Lázár J., Czifra G., and Kovács L. (2000): Distinct roles of protein kinase C isozymes in regulating proliferation and differentiation of HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **115**(3):548
- 2) Bíró T., **Papp H.**, Czifra G., Lázár J., and Kovács L. (2001): Endogenous activation of protein kinase C regulates proliferation and differentiation in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **117**(2):502
- 3) Bíró T., **Papp H.**, Bodó E., Lázár J., Czifra G., and Kovács L. (2002): Modification of protein kinase C alters proliferation and differentiation of immortalized human keratinocytes. *Rev. Oncol.* **4**(1):82
- 4) Szentandrassy N., Gönczi M., **Papp H.**, Lázár J., Kovács L., Bíró T., and L. Csernoch (2002): Stretch activated channels and their regulation by protein kinase C in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **119**(3):746

- 5) Lázár J., Czifra G., **Papp H.**, Marincsák R., Papp L., Kovács L., and Bíró T. (2002): Protein kinase C regulates the sensitivity of recombinant rat vanilloid receptor-1 to capsaicin. *Acta Physiol. Hung.* **89(1-3)**:13
- 6) **Papp H.**, Bodó E., Lázár J., Czifra G., Kovács L., and Bíró T. (2002): Effects of pharmacological modification of protein kinase C on proliferation and differentiation of human HaCaT keratinocytes. *Acta Physiol. Hung.* **89(1-3)**:348
- 7) Czifra G., **Papp H.**, Lázár J., Kern A., Kovács L., and Bíró T. (2002): PKC δ mediates the growth promoting effect of IGF-I on cultured human skeletal muscle cells. *Acta Physiol. Hung.* **89(1-3)**:278
- 8) Bíró T., **Papp H.**, Bodó E., Lázár J., Czifra G., Kovács I., Gáspár K., Juhász I., and Kovács L. (2003): Opposite roles of protein kinase C isoforms in regulating human HaCaT keratinocyte proliferation, differentiation, and tumor genesis. *J. Invest. Dermatol.* **121(1)**:218
- 9) Czifra G., **Papp H.**, Lázár J., Kern A., Kovács L., and Bíró T. (2003): PKC δ mediates the growth promoting effect of IGF-I on cultured human skeletal muscle cells. *Neuromuscular Disord.* **13(7-8)**: 621
- 10) Bíró T., Czifra G., Bodó E., Lázár J., Tóth I.B., **Papp H.**, Kovács I., Juhász I., and Kovács L. (2004): Cell and isoform specific roles of protein kinase C isoenzymes in regulating in vitro and in vivo proliferation of keratinocytes and skeletal muscle cells. *J. Invest. Dermatol.* **122(3)**:A21