

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Dr. Géczy Tamás

**A diacil-glicerol útvonal intracelluláris effektorainak
jelátviteli folyamatokban betöltött funkcionális szerepe és
farmakológiai befolyásolásuk új lehetőségei**

Témavezető: Dr. Bíró Tamás



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2013

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	1
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
BEVEZETÉS.....	6
A diacil-glicerol (DAG) és a C1 domén.....	6
A protein kináz C család.....	10
A PKC izoenzimek felépítése és aktivációs mechanizmusa	10
A PKC rendszer biológiai funkciói.....	13
A PKC rendszer és a bőr.....	15
A faggyúmirigy és sejtjei, a sebocyták.....	18
A faggyúmirigy biológiai funkciója	18
A faggyúmirigyek patogenetikai szerepe	20
Az atípusos C1 doménnel rendelkező szignál-proteinek.....	22
A Vav1 molekula.....	26
A Vav1 biológiai funkciója	26
A Vav1 molekula szerkezete és az enzimaktivitás szabályozása.....	28
A Vav1 molekula C1 doménja	31
CÉLKITŰZÉSEK.....	34
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	36
Felhasznált anyagok.....	36
Sejtenyészítés.....	37
Western immunoblot.....	37
A PKC rendszer vizsgálata immuncitokémia és konfokális mikroszkópia segítségével.....	38
Kvantitatív „real-time” PCR (Q-PCR).....	39
Az intracelluláris lipidtartalom meghatározása	39
Az élősejt-szám meghatározása.....	40
Az apoptotikus folyamatok vizsgálata.....	41
A citotoxicitás/sejtmekrózis vizsgálata	42
RNS interferencia (RNSi)	43
GST-fúziós C1 domének létrehozása	44
Irányított mutagenézis (site-directed mutagenesis).....	45
GFP- fúziós C1 domének létrehozása.....	45
A teljes Vav1 molekula GFP-fúziós formájának létrehozása (vad típus, tripla mutáns, ötszörös mutáns).....	46
A GST-fúziós C1 domén fehérjefragmentumok termeltetése E. coli-ban; fehérjetisztítás	47
A GFP-jelölt proteinek intracelluláris transzlokációja.....	48
A konfokális mikroszkópia kvantifikálása.....	48
DAG laktonok kémiai szintézise.....	49
Radiotív ligandkötődés (³ H]PDBu-kötés) vizsgálata.....	49
A molekulászerkezet modellezése	51
Statisztikai analízis.....	51
EREDMÉNYEK	52
A humán SZ95 sebocyták jellegzetes PKC izoenzim mintázata.....	52
A PKC rendszer farmakológiai modulációja megváltoztatja az SZ95 sejtek lipidtermelését, ugyanakkor nem befolyásolja életképességüket	53
A PMA lipidszintézis-stimuláló hatása a cPKCα és az nPKCδ aktiválásán keresztül valósul meg SZ95 sebocytákban.....	57
A PMA kezelés a cPKCα és az nPKCδ transzlokációját és down-regulációját okozza	57
A cPKCα és az nPKCδ izoformák részt vesznek a PMA okozta lipidtermelés-fokozódás jelátviteli útvonalában, az aPKCζ ugyanakkor gátolja a lipidszintézist és az apoptotikus folyamatokat.....	59
Az AA celluláris hatása az nPKCδ aktiválásán keresztül valósul meg SZ95 sebocytákban.....	64
A GF109203X és a Rottlerin kivédi az AA által indukált lipidtermelést és apoptózist.....	64
Az AA kezelés az nPKCδ szelektív transzlokációját és down-regulációját okozza	66
Az nPKCδ részt vesz az AA celluláris hatásainak szignáltranszdukciós útvonalában.....	67

<i>Az izolált Vav1 C1 domén a megfelelő szerkezetű kötőhely birtokában sem köt forbol-észtert.....</i>	68
A Vav1 C1 domén összehasonlító szekvenciaanalízise több nem-szokványos aminosav jelenétére derített fényt a kötőhely környékén.....	71
A Vav1-re jellemző aminosavakat tartalmazó PKCδ C1b mutánsok ligandaffinitása	75
<i>Az egyszeres PKCδ C1b mutánsok ligandaffinitása enyhén csökkent a vad típushoz képest.....</i>	<i>75</i>
<i>Az öt Vav1-szerű mutáció kombinációja drasztikusan lecsökkenti a PKCδ C1b domén PDBu iránti affinitását.....</i>	<i>78</i>
<i>A transzlokációs kísérletek a radioaktív ligandkötési vizsgálatokhoz hasonló ligandaffinitás-csökkenést mutatnak a PKCδ C1b mutánsoknál</i>	<i>79</i>
A PKCδ-szerű mutációkat tartalmazó izolált Vav1 C1 ligandszenzitivitásának jellemzése.....	83
<i>Az öt PKCδ-szerű mutáció hatására a Vav1 C1 nagy affinitású forbol-receptorra „vált”</i>	<i>83</i>
<i>A nem-szokványos aminosavak ligandaffinitásra gyakorolt hatásának további részletes elemzése a Vav1 C1 doménben létrehozott dupla, tripla és négyszeres mutációk segítségével</i>	<i>86</i>
A „molekuláris lipofilicitás” korrelációja a forbol-észter szenzitivitással	90
Az ötszörös mutáció hatására a Vav1 C1 doménje a teljes fehérjemolekulán belül is képes forbol-észter kötésre és a membránba történő áthelyeződés indukciójára	95
A Vav1 C1 különleges struktúráját célzó DAG-laktonok szelektivitásának összehasonlítása.....	98
DISZKUSSZIÓ	104
<i>Egyes PKC izoenzimek specifikus szerepe a humán sebocyták biológiai folyamatainak szabályozásában.....</i>	<i>104</i>
<i>A protein kináz C és egyéb (lehetséges) DAG-effektor proteinek farmakológiai befolyásolásának lehetőségei a C1 domén targettálásán keresztül</i>	<i>112</i>
<i>Az „atípusos” C1 doménnel rendelkező Vav1 DAG/forbol-észter „érzékletlenségét” meghatározó molekuláris jellegzetességek</i>	<i>119</i>
<i>Konklúzió</i>	<i>127</i>
ÖSSZEFOGLALÁS.....	130
SUMMARY	131
IRODALOMJEGYZÉK.....	132
DR. GÉCZY TAMÁS KÖZLEMÉNYEINEK JEGYZÉKE.....	132
TÁRGYSZAVAK	144
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	147
FÜGGELÉK.....	149

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

[³ H]PDBu	Tríciummal jelölt forbol-12,13-dibutirát
2-AG	2-arachidonoil-glicerol
AA	Arachidonsav
ACh	Acetil-kolin
ACTH	Adrenokortikotróp hormon
AEA	Anandamid (N-arachidonoiletanolamin)
AP-1	Aktivátor protein 1
aPKC	Atípusos protein kináz C
ATP	Adenozin-trifoszfát
BCA	Bicinchoninsav
BCR	B-sejt receptor (B-cell receptor)
CAMK	Ca ²⁺ /kalmodulin-dependens protein kináz
CB2	Kannabinoid receptor-2
CCCP	Karbonil-cianid-3-klorofenilhidrazon
CD36	Differenciációs klaszter 36 (cluster of differentiation 36)
CD4	Differenciációs klaszter 4 (cluster of differentiation 4)
Cdc42 protein	Cell Division Cycle 42 protein
cDNS	Komplementer dezoxiribonukleinsav
CH domén	Calponin homology domén
CMF PBS	Kalcium- és magnéziummentes foszfát puffer
cPKC	Klasszikus protein kináz C
CRH	Kortikotropint felszabadító hormon (corticotropin-releasing hormone)
CXCL-8/IL-8	Kemokin (C-X-C motívum) ligand 8 / interleukin-8
DAG	Diacil-glicerol
DGK	Diacil-glicerol kináz
DH domén	Dbl homology domén
DiIC ₁ (5)	1,1',3,3,3',3'-hexametilindodicarbocianin-jodid
DNS	Dezoxiribonukleinsav
ECS	Endokannabinoid rendszer (endocannabinoid system)
EGF	Epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
EGTA	Etilénglikol-tetraecetsav
ER	Endoplazmatikus retikulum
Erk	Extracelluláris szignál által szabályzott kináz (extracellular signal-regulated kinase)
FBS	Fötális borjú szérum
FcRI	Fc (fragment crystallizable) régiót kötő receptor I
FITC	Fluoreszcein-izotiocianát
FLIPR	Fluorescence Image microPlate Reader
GAPDH	Gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
GDP	Guanozin-difoszfát
GEF	Guanin nukleotid kicserélő faktor (guanine nucleotide exchange factor)
GFP	Zöld fluoreszcens protein (green fluorescent protein)
GH	Növekedési hormon
GNE	Guanin nukleotid csere (guanine nucleotide exchange)
GST	Glutation-S-transzferáz

GTP	Guanozin-trifoszfát
HCl	Sósav
HRP	Tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)
IGF-1	Inzulinszerű növekedési faktor-1
IL	Interleukin
IP ₃	Inozitol-1,4,5-triszfoszfát
K _d	Disszociációs konstans
K _i	Inhibitorikus disszociációs konstans
KSR	Kinase suppressor of Ras
LDL	Low-density lipoprotein
LTB ₄	Leukotrién-B ₄
LXR	Liver X receptor
MLP	Molekuláris lipofilicitási potenciál
MAP-kináz	Mitogén aktivált protein kináz
MRCK	Myotonic Dystrophy Kinase-related Cdc42 Binding Kináz
mRNS	Messenger ribonukleinsav
α-MSH	α-melanocitastimuláló hormon
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium bromid
NFAT	Aktivált T-sejtek nukleáris faktora (Nuclear factor of activated T cells)
NF-κB	Aktivált B-sejtek kappa-könnyűlánc-enhancerhez kötődő nukleáris faktora (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NK sejt	Natural Killer sejt
nPKC	Novel protein kináz C
PAF	Vérlemezke aktiváló faktor (Platelet Activating Factor)
PB1 domén	Phox and Bem1 domén
PBS	Foszfát puffer
PBST	1% Tween-20-at tartalmazó PBS
PC	Foszfatidil-kolin
PCR	Polimeráz láncreakció
PDBu	Forbol-12,13-dibutirát
PDGF	Vérlemezke eredetű növekedési faktor (Platelet-derived growth factor)
PDK-1	Foszfoinozitol-dependens protein kináz-1
PGE ₂	Prostaglandin-E ₂
PH domén	Pleckstrin homology domén
PI3K	Foszfatidilinozitol-3-kináz
PIP ₂	Foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát
PIP ₃	Foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfát
PKC	Protein kináz C
PKD	Protein kináz D
PLC	Fosfolipáz C
PMA	Forbol-12-mirisztát-13-acetát
PPAR	Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor
PS	Foszfatidil-szerin
Q-PCR	Kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció
Rac-1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rac-GAP	Rac-GTPáz-aktiváló protein
Rap1	Ras-related protein-1
RasGRP	Ras guanin-nucleotide-releasing protein

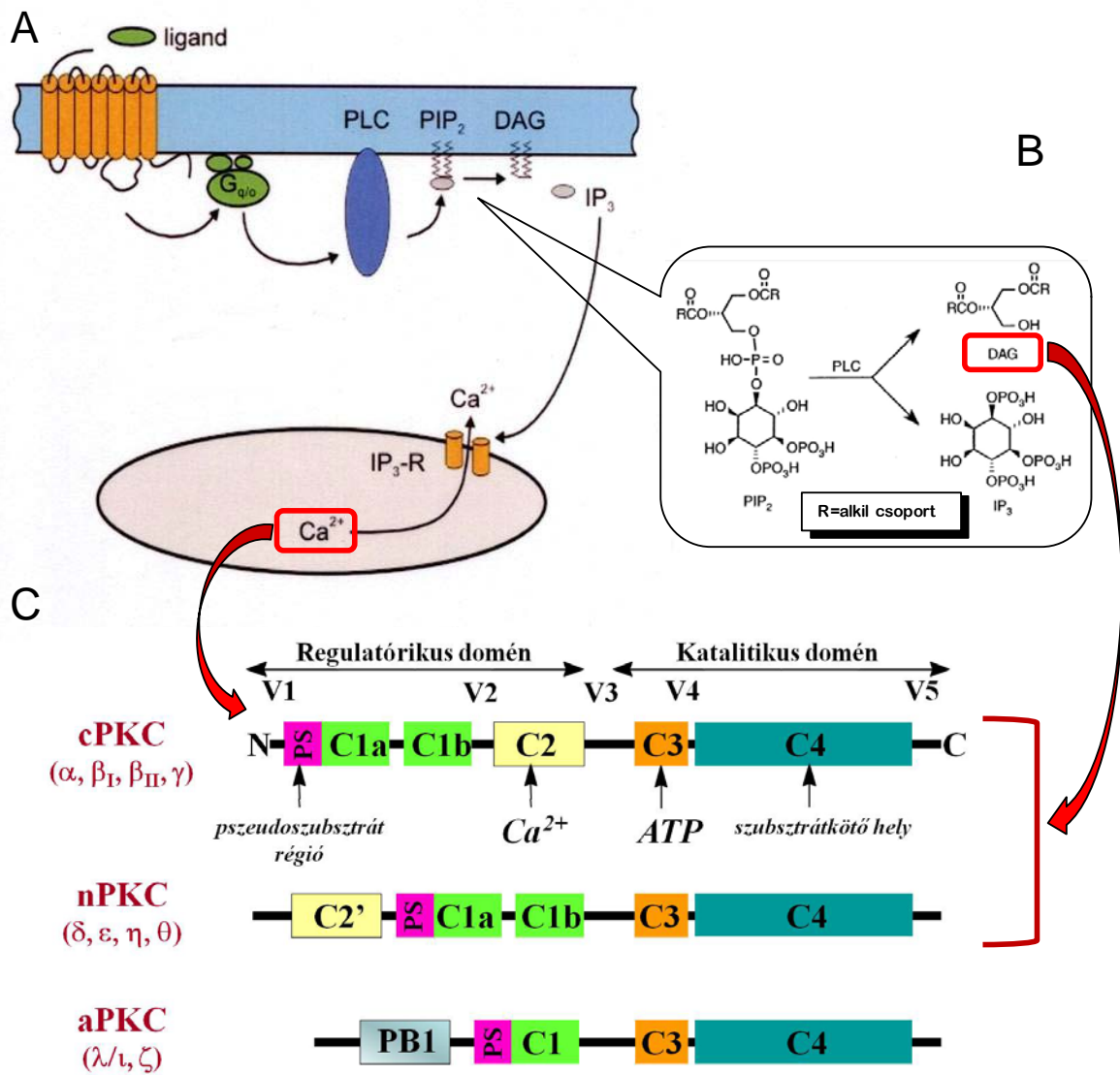
RFU	Relatív fluoreszcencia egység
RhoA	Ras homolog gene family member A
RNS	Ribonukleinsav
RNSi	RNS interferencia
RPMI médium	Roswell Park Memorial Institute médium
RXR	Retinoid X receptor
SDS	Nátrium-dodecyl-szulfát
SDS-PAGE	SDS-poliakrilamid gélelektroforézis
SH2	Src homology domén 2
SH3	Src homology domén 3
siRNS	Kis interferáló RNS (small interfering RNA)
SP	P-anyag (substance-P)
TCR	T-sejt receptor (T-cell receptor)
TNF α	Tumornekrózis faktor- α
TRPV	Tranziens receptor potenciál ioncsatorna szupercsalád vanilloid alcsaládja

BEVEZETÉS

A diacil-glicerol (DAG) és a C1 domén

Az intracelluláris lipidmediátor *sn*-1,2-diacil-glicerol (DAG), másodlagos messengerként, központi szerepet játszik számos membránreceptor (G-protein-kapcsolt receptorok, receptor-tirozin-kinázok) aktivációs szignáljának közvetítésében. A DAG-felszabadulást kiváltó enzimátikus kaszkárendszer meghatározó eleme, többek között, jónéhány hormon (angiotenzin, vazopresszin, kolecisztokinin), neurotranszmitter (acetilkolin, noradrenalin, glutaminsav) és növekedési faktor (PDGF: trombocita eredetű növekedési faktor; EGF: epidermális növekedési faktor) szignáltranszdukciós mechanizmusának. Ezen extracelluláris mediátorok bekötődésének hatására (1.A ábra) a sejtfelszíni receptorok különböző foszfolipáz C (PLC) izoenzimeket aktiválnak (a G-protein-kapcsolt receptorok a PLC β izoformákat, a receptor-tirozin-kinázok pedig a PLC γ izoformákat), amelyek a membránban elhelyezkedő foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP $_2$) lipidmolekulából DAG-ot és inozitol-1,4,5-triszfoszfátot (IP $_3$) hasítanak ki (1.B ábra). Alternatív lehetőségként a DAG egy másik membránlipidből, a foszfatidil-kolinból is keletkezhet a foszfolipáz D és a foszfatidsav-hidroláz szekvenciális enzimaktivitásának hatására, azonban ezen útvonal jelentősége alárendeltebbnek tűnik a PLC enzimen keresztül történő felszabaduláshoz képest. A keletkező IP $_3$ az intracelluláris raktárakból kalciumot szabadít fel az IP $_3$ -vezérelt kalciumcsatornák aktiválásán keresztül. Az megemelkedett ic. Ca $^{2+}$ koncentráció ezután egy sor Ca $^{2+}$ -szenzitív jelátviteli folyamatot indíthat el a sejten belül [1-5]. A PIP $_2$ molekula hidrolízisének másik végterméke, a DAG pedig olyan szignál-proteinek aktiválását (és szubsztrátokhoz való targetálását) indukálja, amelyek rendelkeznek a DAG felismerésére szolgáló intramolekuláris receptor alegységgel, az ún. C1 doménnel [6-8]. Ezen downstream effektor molekulák C1 doménon keresztüli aktivációja meghatározó szerepet játszik olyan alapvető sejt folyamatok jelátvitelében, mint például a sejtproliferáció, a differenciálódás, az apoptózis, az angiogenezis és a gyógyszer-rezisztencia [9]. Mindezek alapján tehát nem meglepő, hogy az utóbbi időben jelentős figyelem irányul a C1 doménnel rendelkező szignalizációs molekulák jelátviteli rendszerekben betöltött szerepének kutatására, hiszen ideális molekuláris támadáspontjai lehetnek, többek között, a tumorelles farmakoterápiás fejlesztéseknek is [10,11].

A DAG-specifikus felismerő alegységként funkcionáló C1 domén egy ciszteinben gazdag, cink-ujj-szerű szerkezettel bíró peptiddomén, amely két cink ionnal alkot komplexet, koordinatív kötés segítségével (lásd 15.A ábra).

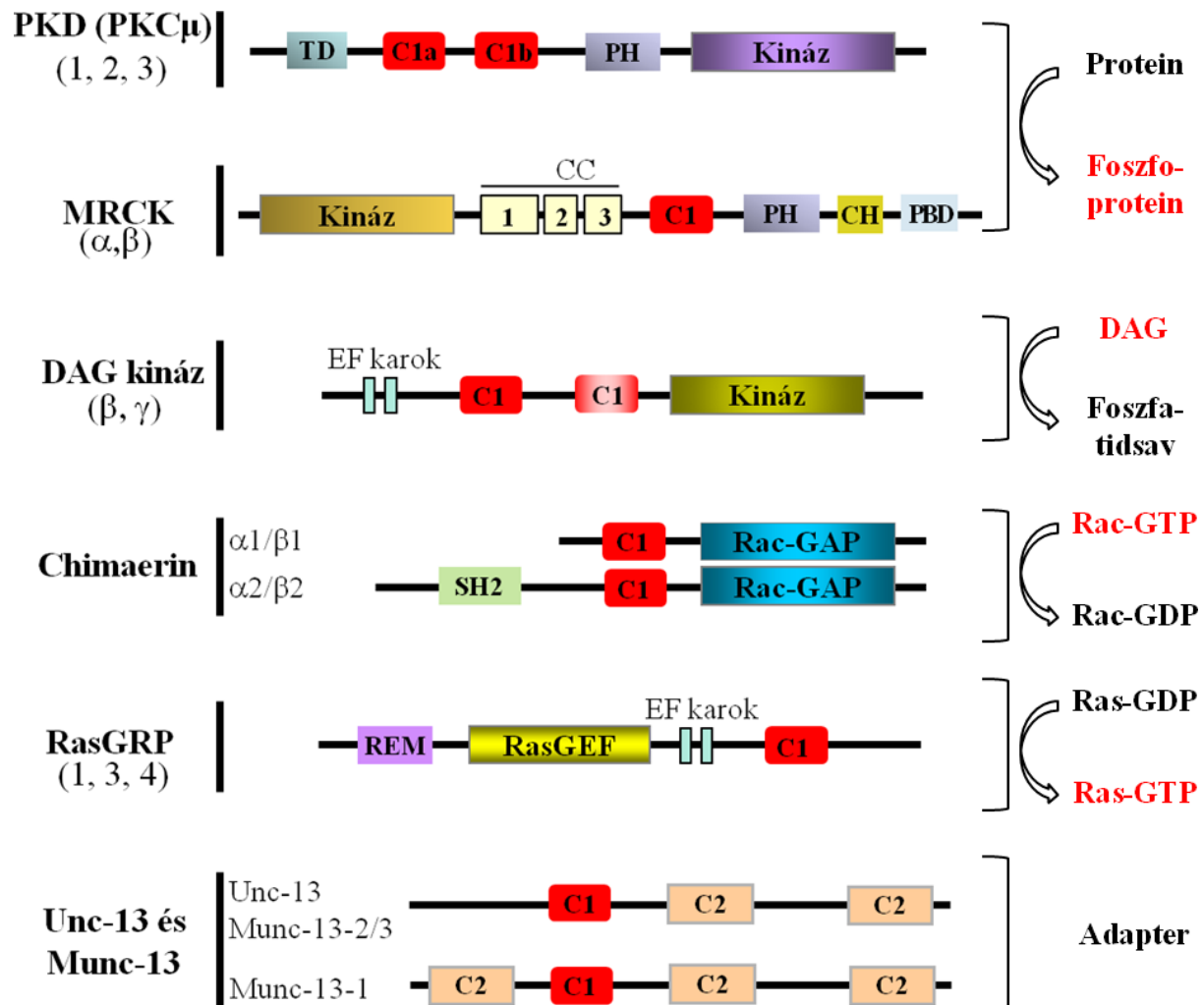


1. ábra: A DAG felszabadulással járó jelátviteli útvonal molekuláris mechanizmusa, valamint a legjelentősebb DAG-effektor enzimsalád, a protein kináz C (PKC) rendszer tagjainak elsődleges szerkezete. **A:** Különböző sejtfelszíni receptorok ligandkötésének hatására aktiválódik a PLC enzim, amely **B:** a sejtmembránban elhelyezkedő PIP₂ molekulából IP₃-at és DAG-ot hasít ki. Az IP₃ az endoplazmatikus retikulum külső membránján található receptorához (IP₃-R) kapcsolódva ic. Ca²⁺ emelkedést vált ki. A felszabaduló DAG a Ca²⁺-mal együtt részt vesz a klasszikus (cPKC) izoformák aktivációjában. A novel izoformák (nPKC) aktivációja kizárólag DAG hatására megy végbe. Az atípusos izoformák (aPKC) sem DAG-ra, sem pedig Ca²⁺-ra nem érzékenyek. **C:** A PKC-k szerkezete sematikusán. PS: pszeudoszubsztrát régió, C1-4: konzervált domének, C1a/b: DAG kötő domén, C2: Ca²⁺-ot kötő domén, C2': C2-szerű domén (Ca²⁺ kötésre alkalmatlan) C3: ATP-kötő domén, C4: kináz domén, V1-5: variábilis régiók, PB1: "Phox and Bem1" domén (protein-protein interakciók) (Marquez és Blumberg, 2003 alapján).

Az átlagosan 50 aminosavból álló, erősen konzervált aminosav-összetételű peptidmotívumra az alábbi jellegzetes szekvencia jellemző: $HX_{12}CX_2CX_nCX_2CX_4HX_2CX_7C$, ahol H a hisztidint, a C a ciszteint jelöli, az X bármely aminosav lehet, az n értéke pedig 13 vagy 14 (lásd 16. ábra legfelső sora) [12,13]. A rendhagyó szerkezetű domén jelenlétét elsőként a protein kináz C (PKC) izoenzimek esetében írták le [14]. A szerin/treonin kinázként funkcionáló enzimes család tagjainak aktivációs mechanizmusait kutató vizsgálatok kimutatták, hogy a DAG molekula C1 domén általi megkötése kulcsfontosságú a kinázok sejtmembránba (és egyéb intracelluláris membránstruktúrákba) irányuló transzlokációja során [6,15-17]. (A PKC enzimek aktivációs mechanizmusát a következő alfejezet tárgyalja részletesen.) A kutatások alapján ugyanakkor arra is fény derült, hogy a C1 domén (a sejtekben termelődő endogén PKC aktivátor, DAG molekulán kívül) számos, növényekből izolált, lipofil természetű vegyület megkötésére képes, amelyek ezáltal, a DAG-hoz hasonlóan (illetve annál permanensebb módon), képesek aktiválni a C1 doménnel rendelkező enzimeket. Ilyen vegyületek például a forbol-észterek családjába tartozó anyagok (legismertebb és egyik lepotensebb tagjuk a forbol-12-mirisztát-13-acetát; PMA), amelyek tumor promóter tulajdonságait (egér bőr karcinogenezis modell segítségével) már a PKC enzimek azonosítása előtt leírták. A forbol-észtereken kívül, még jónéhány olyan természetes, növényi anyagot (bryostatin, indolactam, ingenol-3-angelate) azonosítottak, amelyekről bebizonyosodott, hogy szintén nagy affinitással kötődnek a C1 doménhez; emiatt jelenleg is intenzív kutatások folynak biológiai funkcióik részletes feltérképezésére. A bryostatin 1 és az ingenol-3-angelate tumorelles farmakonként való használatának potenciális lehetőségeit jelenleg számos klinikai fázisban lévő vizsgálat kutatja [8,11,18-20].

Bár a DAG felismerésére szolgáló C1 domént elsőként a PKC enzimek esetében írták le [14], a későbbi vizsgálatok rávilágítottak, hogy nem a PKC az egyetlen enzimes család, amely rendelkezik a jellegzetes C1-doménstruktúrával. Számos egyéb szignáltranszdukciós molekula esetében sikerült ugyanis kimutatni homológ C1 domének jelenlétét. Ezen C1 doménnel rendelkező proteineket DAG/forbol-észter-szenzitivitásuk alapján az alábbi két csoportba sorolták: *i*) „típusos” C1 doménnel rendelkező szignál-proteinek, melyek bizonyítottan képesek ezen ligandok megkötésére; *ii*) „atípusos” C1 doménnel rendelkező proteinek, melyek nem mutatnak DAG/forbol-észter-szenzitivitást. A (klasszikus és novel csoportba tartozó) PKC izoenzimeken kívül hat másik enzimes család tagjairól bizonyosodott be, hogy tartalmaznak DAG/forbol-észter megkötésére alkalmas, típusos C1 domént (2. ábra). Ezek közül két család tagjai rendelkeznek (a PKC-khoz hasonlóan) kináz aktivitással.

Az egyik, a korábban PKC enzimesaláddhoz, ma már inkább különálló csoportba sorolt PKC μ /protein kináz D (PKD) enzimesalád, amelynek tagjai eltérő szubsztrátspecifitással és katalitikus domén szerkezettel bírnak, mint a PKC enzimek; ebben a vonatkozásban leginkább a kalcium-kalmodulin dependens kinázokhoz (CAMK) hasonlítanak.



2. ábra: Típusos C1 doménnel rendelkező jelátviteli fehérjék szerkezete és funkciója. C1: DAG/forbol-észter-szenzitív C1 domén; PS: pszeudoszubsztrát domén; TD: transzmembrán domén; PH: „pleckstrin homology” domén; SH2: „Src homology” 2 domén; Rac-GAP: „Rac GTPase-activating protein” domén; REM: „Ras exchange motif”; GEF: „guanine nucleotide exchange factor”; CC: „coiled-coil” domén; CH: „citron homology” domén; PBD: „p21 GTPase binding” domén. Az egyes fehérjék jelátviteli folyamatokban betöltött funkcióját részletesen lásd a szövegben (Blumberg és Kedei, 2008, valamint Griner és Kazanietz, 2007 alapján).

Egy további kináz aktivitással bíró család a DAG kinázok csoportja, amelynek tagjai a sejtekben keletkezett DAG foszforilálásával terminálják a DAG-szenzitív szignáltranszdukciós útvonalak aktivitását. Ezen két molekulacsalád tagjai mindannyian két,

tandem elhelyezkedésű C1 doménnel rendelkeznek (2. ábra). A másik négy családot alkotó szignál-proteinek szerkezetében csak egy C1 domén található meg. A chimaerin-ek GTP-áz aktiváló proteinként funkcionálnak a Rac protein számára (Rac-GAP). A RasGRP család tagjai guanin nukleotid kicserelő (GNE) aktivitással rendelkeznek, és a Ras/Rap1 fehérjékhez kapcsolódó GDP/GTP cseréjét katalizálják. A Munc-13 családba tartozó molekulák a kémiai ingerületátvitel során a szinaptikus vezikulumok kiürülésének szabályozásában vesznek részt, adapter (scaffold) fehérjeként. Végül pedig az MRCK enzimek a Rho családba tartozó (Cdc42 jelölésű) kis GTP-áz molekula downstream effektoraiként szerepet játszanak a migráló sejtek filopodiumainak létrehozásában és mozgásának szabályozásában [7,8,13].

A protein kináz C család

A PKC enzimesalád az ún. AGC kinázok (protein kináz **A**, protein kináz **G**, protein kináz **C**) csoportjába tartozik, amelynek tagjai szerin/treonin kináz aktivitással bírnak, és alapvető strukturális tulajdonságaikat tekintve nagyfokban hasonlítanak egymásra. A csoport minden tagjára jellemző, hogy rendelkezik egy erősen konzervált katalitikus alegységgel/doménnel, amely a szubsztrát megkötéséért és foszforilációjáért felelős, valamint egy regulatórikus alegységgel/doménnel, amely aktiválatlan állapotban az enzim inaktív konformációjának fenntartásáért felelős. A PKC családba tartozó izoenzimek szerkezeti felépítésüket és funkcionális sajátosságukat tekintve három fő csoportba sorolhatóak (1.C ábra). Az első, ún. „klasszikus” (vagy konvencionális) csoportba az α , a β I, a β II (a β I splice-variánsa, amely az N terminálison 43 aminosav molekulával nagyobb, mint a β I variáns) és a γ jelzésű izoformák tartoznak (cPKC-k). Közös jellemzőjük, hogy aktivációjukhoz kalciumot és DAG-ot egyaránt igényelnek. A második, ún. „novel” csoport tagjai a δ , az ϵ , az η és a θ izoenzimek, amelyek teljes aktiválásához csupán diacil-glicerol szükséges, kalcium nem (nPKC-k). A harmadik, ún. „atípusos” csoportba tartozó ζ és λ 1 izoformák aktivációja független mind a kalciumtól, mind pedig a DAG-tól (aPKC-k) [16,17].

A PKC izoenzimek felépítése és aktivációs mechanizmusa

Az enzimesalád tagjainak strukturális felépítésére (1.C ábra) és az enzimaktiváció mechanizmusára az alábbiak jellemzők: az erősen konzerválódott szerkezetű katalitikus domén a molekula N-terminálisán helyezkedik el valamennyi izoformánál. Ez az egység felelős az enzim szubsztrátjainak (szerin/treonin oldalláncokon történő) foszforilációjáért. Az

itt található C3 domén az ATP, a C4 jelzésű pedig a szubsztrát molekulák megkötését végzi. A domén katalitikus aktivitásának hatására a szerin és a treonin oldalláncok hidroxil csoportjaihoz kapcsolódik a nukleozid trifoszfátról (ATP) lehasított terminális foszfát molekula. A C-terminálison elhelyezkedő regulatórikus domén pedig az alábbi alapvető funkciókat látja el: *i*) Enzimaktivátor mediátorok hiányában a pszeudoszubsztrát rész révén a katalitikus alegység szubsztrátkötő doménjához (C4) kapcsolódik, ezáltal fenntartja az enzimműködés szempontjából inaktív konformációt (autoinhibíció). *ii*) Az aktiváció során segít az enzim megfelelő celluláris struktúrához történő transzlokációjában, és ezáltal a megfelelő szubsztrátmolekulák (citoszkeletális fehérjék, ioncsatornák, receptorok, transzkripciós faktorok) targetálásában. *iii*) Szerepet játszhat protein-protein interakciókban is. A PKC aktiváció mechanizmusa során a PLC útvonalon keletkező intracelluláris mediátorok (DAG és Ca^{2+}) az enzimek regulatórikus egységén található C1 és C2 doménekhez kapcsolódnak. Az aktivátor bekötődése kettős következménnyel jár: *i*) A C1 és a C2 doméneken keresztül az enzimek a megfelelő intracelluláris membránstruktúrához (sejtmembrán, Golgi-komplex, maghártya, citoszkeletális komponensek) transzlokálódnak. *ii*) A kötődés olyan konformációváltást indukál, amelynek hatására a pszeudoszubsztrát régió eltávolodik a katalitikus rész szubsztrátkötő doménjétől, így az szabadabbá válik a foszforilálható szubsztrát számára. A katalitikus domén ezután foszforilálja az enzimre specifikus szubsztrátot, majd pedig (a tartós enzimaktivitás elkerülése érdekében) intracelluláris proteolitikus enzimek hasítják és bontják le az aktivált PKC enzimeket (down-reguláció). (Az aktivátorok hatására bekövetkező intracelluláris transzlokáció és a tartós aktiváció hatására fellépő down-reguláció tehát kiváló indirekt markere az enzimaktivációnak; ezért ezen folyamatok detektálása segítségével fontos kísérletes következtetéseket vonhatunk le az egyes izoformák jelátviteli folyamatokban betöltött funkcionális szerepéről [6,16,21,22].)

A PKC alcsoportok közötti funkcionális különbségek a regulatórikus (főként C1 és C2) doménjeik szerkezeti felépítésében rejlő eltérésekből adódnak. Bár mind a klasszikus, mind pedig a novel csoportba tartozó izoformák tartalmaznak C2 domént, csak a klasszikus izoformák C2 doménja képes Ca^{2+} -ot kötni. A novel izoformákban lévő C2 domén szerkezete nem alkalmas Ca^{2+} -kötésre, mivel hiányoznak belőle azon savas karakterű aminosav oldalláncok, amelyek a Ca^{2+} -kötés szempontjából alapvető jelentőséggel bírnak. Az atípusos izoformák regulatórikus alegysége pedig egyáltalán nem tartalmaz C2 domént, ennek megfelelően természetesen nem aktiválható Ca^{2+} -mal. A cPKC izoformák a C2 domén által megkötött Ca^{2+} -on keresztül kezdetben egy lazább interakciót alakítanak ki a membránnal (pontosabban a membrán anionos foszfolipid molekuláival), amely kapcsolat önmagában

még nem alkalmas az enzim stabil kihorgonyzására az adott membránterülethez. Ez a kis affinitású elektrosztatikus kapcsolat nem teszi lehetővé az enzimaktivációhoz szükséges konformációváltozást sem, ugyanakkor elősegíti, hogy a membrán közelében lévő enzim a C1 doménon keresztül kapcsolatba kerüljön a megfelelő membránrégiókban keletkező DAG molekulákkal. A C1 domén által közvetített DAG kötődés önmagában szintén gyenge membránasszociációra adna csak módot, viszont a C1 és C2 domének (agonistáik megkötése után) együttesen már képesek nagy affinitással kihorgonyozni az enzimmolekulát a membrán adott régiójához. A mindkét domént érintő receptor-ligand-membránlipid interakciók kiépülése ugyanakkor már elegendő szabadenergia-változással jár ahhoz is, hogy az aktiváció kulcslépéseként leírt konformációváltozást elősegítse, így az enzimaktivitást az autoinhibíció alól felszabadítsa.

Mivel a novel PKC izoformák nem rendelkeznek funkcionális C2 doménnel, ezért aktivációjuk során Ca^{2+} -on keresztüli laza membránasszociációra nincs lehetőség. Ugyanakkor a novel izoformák C1 doménja egy nagyságrenddel nagyobb affinitással köti a DAG molekulákat tartalmazó membránszakaszokat. Mivel ez az erős kötődés önmagában is elégséges az előbb említett konformációváltozás kiváltására (és a PKC molekula stabil kihorgonyzására), ezért a novel izoformák aktivációja Ca^{2+} -tól függetlenül is végbemehet, kizárólag a C1-domén-DAG-membrán interakció hatására.

Az atípusos PKC izoformák ugyanakkor a DAG molekulával szemben sem mutatnak szenzitivitást, annak ellenére, hogy rendelkeznek C1 doménnel. Az aPKC izoformákban megtalálható C1 domén ugyanis nem alkalmas DAG kötésre, bár a ligandkötőhely geometriája nem mutat jelentős strukturális torzulást a klasszikus és novel csoport tagjainak C1 doménjához képest. Laboratóriumunk korábbi vizsgálatai rámutattak, hogy az atípusos PKC izoformák C1 doménjának csökkent ligandaffinitásáért a kötőzseb peremén elhelyezkedő (csak az atípusos PKC-kra jellemző) nem-szokványos aminosavak (pozitívan töltött arginin molekulák) jelenléte tehető felelőssé. Az atípusos izoformák aktivációjában tehát sem a Ca^{2+} , sem pedig a DAG nem játszik szerepet. A csoportba tartozó izoenzimek aktivációs mechanizmusának pontos feltérképezése még további vizsgálatokat igényel, de esetükben az enzimaktivitás legfontosabb szabályozói valószínűleg a foszfoinozitol-dependens protein kináz-1 (PDK-1) általi foszforiláció, valamint a különböző protein-protein interakciók lehetnek. (Az utóbbiról árulkodik a kizárólag atípusos PKC-k szerkeztében megtalálható PB1 jelölésű domén, amelyen keresztül az aPKC-k egyéb PB1 doménnel rendelkező „scaffold” proteinekkel léphetnek interakcióba [16,17,21-24].)

A PKC rendszer biológiai funkciói

A PKC enzimes család képviselői gyakorlatilag az emberi szervezet összes sejtfeleségében megtalálhatók, ugyanakkor az egyes szövetek jellegzetes és egymástól eltérő izoenzim mintázattal rendelkeznek. Egyes izoformák, például a cPKC α , az nPKC δ és ϵ vagy az aPKC ζ , csaknem minden sejtfeleségben expresszálódnak, ubikviternek tekinthetők. Más izoformák, így a cPKC γ vagy az nPKC θ és az aPKC $\lambda/1$, expresszióját sokkal kevesebb sejtfeleségben írták le [3,25-28]. A cPKC γ -t szinte kizárólag az agyban és egyéb neuronális szövetekben mutatták ki [29,30], az nPKC θ -t jellemzően harántcsikolt izomban és T-sejtekben, az aPKC ι -t pedig a testisben és az inzulin-szekretáló sejtekben [31-35]. Az utóbbi két izoforma kifejeződését később az epidermisben is sikerült detektálni [36].

Az enzimes család rendkívül sokrétű szabályozó szereppel bír, többek között, olyan alapvető sejt folyamatok regulációjában, mint a sejtproliferáció, a differenciálódás, valamint az apoptózis és a sejt migráció. Ezek alapján tehát nem meglepő, hogy a PKC funkció szabályozásának rendellenességei fontos patogenetikai faktorként szerepelhetnek a tumorigenezis folyamatának számos pontján [20,37-39]. A PKC izoenzimek az 1980-as években kerültek először a daganatkutatás fókuszába. Meggyőző kísérletes bizonyítékokkal sikerült ugyanis alátámasztani, hogy az egérbőr-karcinogenezis modellben tumor promóterként viselkedő [19,40] forbol-észter molekulák képesek közvetlenül a PKC család tagjaihoz kötődni, és azok enzimatis funkcióit aktiválni [41-43]. A PKC funkció karcinogenezisben betöltött szerepének ezen első kísérletes leírása óta számos bizonyíték látott napvilágot az enzimes család neoplastikus folyamatokban való részvételére vonatkozólag. Az ezt követő évtizedekben ezért rendkívül intenzív kutatás indult a PKC-k által kontrollált szignáltranszdukciós útvonalak pontos feltérképezésére, valamint azok farmakológiai befolyásolhatóságának lehetőségeire. Az enzimes család tagjainak kezdetben egyértelműen proliferációt serkentő funkciót tulajdonítottak. A későbbi kutatások ugyanakkor rávilágítottak, hogy a PKC rendszer szerepe ennél jóval összetettebb, és a proliferációt serkentő hatásokon kívül a PKC enzimek növekedést gátló, proapoptotikus szignálokat is közvetíthetnek [20,22]. Az egyes izoformák specifikus szerepét vizsgáló kutatásokból nyilvánvalóvá vált, hogy azok, akár ugyanazon sejt típus esetében is, különböző és gyakran egymással ellentétes módon befolyásolhatják a sejtproliferációt, a differenciálódást és az apoptózist. A legmarkánsabb példa ezen izoforma-antagonizmusra, a novel csoportba tartozó két (a legtöbb sejt típusban jelentős expressziós szintet mutató) izoenzim, az nPKC ϵ és az nPKC δ ellentétes sejthatásokat közvetítő szerepe. Míg az nPKC ϵ a legtöbb sejtfeleség

esetében proliferációs szignálokat közvetít és elősegíti a sejtek túléléséért felelős jelátviteli útvonalak érvényre jutását, addig az nPKC δ izoforma proapoptotikus és antiproliferatív aktivitással bír, ezáltal gátolva a sejtnövekedést [20]. NIH 3T3 fibroblaszt sejtvonal felhasználásával kimutatták például, hogy míg az nPKC δ overexpresszió gátolta a sejtenyészetek proliferációját, addig az nPKC ϵ overexpresszió fokozta azt [39]. A két izoforma antagonisztikus funkcióját támasztják alá azon transzgenikus állatmodellek is, amelyekben az nPKC δ overexpresszió hatására az adott egértörzs rezisztenssé vált a forbol-észter által indukált tumor-promócióval szemben; míg az nPKC ϵ -t overexpresszáló társaikban, ugyanezen kezelés nagy metasztatikus potenciállal bír, alacsonyan differenciált laphámcarcinomák kifejlődését eredményezte [44-46]. Ezen eredményekkel összhangban, számos humán tumorban (húgyhólyag, emlő, prosztata, agy) találtak emelkedettnek az nPKC ϵ expressziós szintjét; ezzel ellentétben az nPKC δ expresszió kifejezett csökkenést mutatott jónéhány szövet (húgyhólyag, agy, endometrium, bőr) malignus elváltozásaiban. Ráadásul az expressziós szintek gyakran mutattak korrelációt a tumor grádusával is, ezáltal prognosztikus markerként is felhasználhatók [20,22]. Az nPKC δ és az nPKC ϵ izoformák funkcionális antagonizmusán kívül egyéb izoformák esetében is leírtak egymással ellentétes szerepeket, azonos sejtféleségek jelátviteli folyamatainak szabályozásában. Így például kiderült, hogy K-562 erythroleukémia sejtekben a cPKC α a felelős a forbol-észter által indukált cytostasis kialakulásáért, míg a cPKC β_{II} izoforma ezen sejtek proliferációját segíti elő [37].

Tovább árnyalja a PKC rendszer biológiai szerepét az a tény, hogy egyes izoformák eltérő sejttípusokban ellentétes módon befolyásolhatják ugyanazon sejtfolyamatot; vagyis az egyes izoformák funkciója sejt-, illetve szövetspecifitást mutat. Így például, az előbb említett, proapoptotikus és antiproliferatív funkciókkal bíró nPKC δ izoforma egyes sejttípusokban (pl. emlőtumor) akár elő is segítheti a sejtproliferációt, mely hatás feltehetően az ERK-stimuláción keresztül valósult meg [47,48]. Ezen eredményekkel összhangban C2C12 myoblast sejtek vizsgálata során laboratóriumunk kimutatta, hogy az nPKC δ -aktiváció részt vesz az inzulin-szerű növekedési faktor-I (IGF-I) növekedést serkentő celluláris hatásának szignáltranszdukciós útvonalában. Ezen felül, a vad típusú nPKC δ overexpressziója fokozta a sejtproliferációt (utánozván ezáltal az IGF-I által kiváltott sejthatásokat), ugyanakkor a domináns negatív nPKC δ mutáns overexpressziója gátolta a sejtosztódást (és megakadályozta az IGF-I által indukált proliferációfokozódást) [49]. Mindezek alapján tehát elmondható, hogy a PKC család tagjainak izoforma-specifikus

sejtfunkcióin túl, a rendszer komplexitását még tovább fokozza az a kísérletes tény, hogy az egyes izoformák különböző sejtféleségekben heterogén módon befolyásolhatják ugyanazt a sejtfolyamatot. Ez pedig egyértelműen felhívja a figyelmet az egyes izoforma-specifikus funkciók pontos feltérképezésének szükségességére a különböző sejt- és szövetféleségek biológiai folyamatainak szabályozásában.

A PKC rendszer és a bőr

A bőr létfontosságú barrier funkciójának ellátásához a keratinocyták egy komplex, jól összehangolt sejtprogramot hajtanak végre. A folyamat során az állandó proliferáció által megújuló bazális réteg sejtjei (kilépve ezen rétegből) a külső felszín felé kezdenek haladni, mialatt a terminális differenciálódás útjára lépve morfológiai és biokémiai változások egész során mennek keresztül; ezek végeredményeként végül élettelen sejtekként a mechanikai és fiziko-kémiai hatásoknak, valamint a kórokozók szervezetbe való behatolásának ellenálló, elszarusodott *stratum corneum* rétegét alkotják [55-58].

Nagyszámú kísérletes adat támasztja alá a PKC enzimrendszer központi szerepét a bőr biológiai folyamatainak szabályozásában. A keratinocyták PKC expressziós mintázatát feltáró vizsgálatok általában öt izoforma (cPKC α , nPKC δ , nPKC ϵ , nPKC η és aPKC ζ) kifejeződéséről számolnak be, de az irodalomban akadnak kísérletes bizonyítékok a cPKC β , a cPKC γ , az nPKC θ és az aPKC λ/ι izoformák expressziójára is [36,50-54].

A PKC rendszer a bőrbarrier kialakításának eseménysorában is meghatározó szerepet játszik. A folyamat regulációjában elsőként a cPKC α szerepét ismerték fel; bebizonyosodott ugyanis, hogy szerepe van az extracelluláris Ca²⁺ emelkedés hatására indukálódó differenciálódási program szabályozásában [51,59,60]. A későbbi kutatások rámutattak, hogy a cPKC α mellett az nPKC δ , az nPKC ϵ , az nPKC η , az aPKC ζ és az aPKC ι is meghatározó (és gyakran antagonisztikus) szereppel bír a keratinocyták olyan alapvető sejtfolyamatainak szabályozásában, mint a sejtadhézió, a migráció, a basális sejtek proliferációja, a sejtciklus szabályozása, a terminális differenciálódás és az apoptotikus folyamatok kontrollja, valamint számos citokin és növekedési faktor celluláris hatásának közvetítése [36,50,61-65]. Nem meglepő tehát, hogy a PKC izoenzimek aktivitásában bekövetkező változások fontos patogenetikai faktorként szerepelhetnek a bőr neoplasztikus burjánzással járó kórképeiben, hiszen az epidermis folyamatos megújulását biztosító proliferáció és a *stratum corneum* létrehozásáért felelős terminális differenciálódási program finom egyensúlyának

megbomlását egyaránt okozhatja a sejtosztódást serkentő izoformák túlműködése, illetve a differenciálódást elősegítő izoenzimek csökkent aktivitása is.

Jól bizonyítják ezt a következő kísérletes megfigyelések. Az nPKC ϵ -t overexpresszáló transzgenikus egerekben epidermális hyperproliferációt figyeltek meg. Ezenfelül, az epidermális karcinogenezisre irányuló vizsgálatok során (kémiai karcinogén + tumorpromóter forbol-észter topikális alkalmazása az egerek bőrén) jóval nagyobb arányban fordult elő ezen törzseknél nagy metasztatikus potenciállal bíró malignus laphámcarcinoma, míg a kontroll csoportban leginkább benignus papillomákat figyeltek meg [45,66]. Ezzel szöges ellentétben, az nPKC δ -t overexpresszáló transzgenikus egerekben drámaian lecsökkent mind a benignus papillomák kialakulása, mind pedig a malignus transzformáció incidenciája [44]. Ugyanakkor nPKC δ „knock-out” egerekben az apoptotikus folyamatok csökkenését figyelték meg, amely a tumorgenezis fokozódását eredményezheti [67]. Az nPKC δ -ról ugyanis kimutatták, hogy részt vesz például az UV-sugárzás hatására indukálódó apoptotikus folyamatok jelátviteli útvonalában, amely, a malignusan transzformálódott keratinocyták eltávolításával, fontos védő mechanizmust jelenthet a karcinogenezissel szemben [68]. Ezen eredményekkel összhangban, humán laphámcarcinómákban csökkent nPKC δ expressziós szinteket írtak le [69]. Mindezeket összevetve tehát elmondhatjuk, hogy az nPKC δ (az nPKC ϵ -nal ellentétben) proapoptotikus és antiproliferatív hatásai révén fontos tumorszupresszor funkciókkal bír keratinocytákban.

Ezen felül úgy tűnik, hogy az epidermis sejteiben az nPKC δ mellett az nPKC η is fontos szerepet játszhat a tumorgenezis megfékezésében, hiszen *i*) az nPKC η -deficiens egerekről kiderült, hogy nagyobb fogékonyságot mutatnak a forbol-észterek által indukált bőrtumorok kialakulása iránt [70]; és *ii*) az nPKC δ -hoz hasonlóan az nPKC η kifejeződése is lecsökkent malignus laphámcarcinómák esetében [50].

Bár a cPKC α aktivitásnak szintén fontos regulatórikus szerepet tulajdonítanak a keratinocyták differenciációs/proliferációs folyamataiban, az α izoenzimet overexpresszáló transzgenikus egerek bőrén nem találtak változást a tumorgenezis vonatkozásában [46,51,71]. Ugyanakkor a cPKC α expresszió fokozódása jelentős intraepidermális gyulladást okozott ezen egerek bőrén (topikális forbol-észter kezelés hatására), amely azt sugallja, hogy az α izoenzim aktivációja fontos szabályozó szereppel bírhat a kórokozók elleni immunvédelem folyamatában. A cPKC α overexpresszió fokozta továbbá a forbol-észterek által indukált apoptotikus folyamatokat mind *in vivo*, mind pedig a transzgenikus keratinocyták primer tenyészeinek esetében [64]. Ezenfelül a cPKC α izoforma csökkent expressziót mutat a bőr bazálsejtes carcinómájában, amely összhangban van azzal a

megfigyeléssel, hogy a cPKC α a normál epidermis felsőbb, differenciált rétegeiben mutat jelentős expressziót [72,73]. Ezen kísérletes megfigyelések alapján tehát úgy tűnik, hogy az epidermis immunválaszában betöltött kulcsfontosságú szerepe mellett a cPKC α antiproliferatív és proapoptotikus funkciókkal bír keratinocytákban.

A fenti kísérletekkel összhangban, laboratóriumunk korábban, immortalizált HaCaT sejtvonal segítségével bebizonyította, hogy a PKC rendszer meghatározó szerepet játszik a humán bőrből származó keratinocyták alapvető sejtfolymatainak szabályozásában (proliferáció, terminális differenciálódás, apoptózis). Kimutattuk továbbá, hogy az egyes izoformák specifikus, ugyanakkor gyakran egymással ellentétes módon befolyásolják ezen sejtfolymatokat; hiszen amíg a cPKC α és az nPKC δ izoformák overexpressziója a HaCaT keratinocyták terminális differenciálódását és apoptotikus folymatainak indukálódását segítette elő, addig a cPKC β és az nPKC ϵ emelkedett szintje a proliferációs folymatoknak kedvezett mind *in vitro* (HaCaT sejt kultúrák), mind *in vivo* (tumor növekedés immundeficiens egerekben) [52,63]. További kísérleteink során meghatároztuk az egyes PKC izoformák specifikus szerepét a HaCaT keratinocyták differenciálódási markereinek (adhéziós molekulák, pl. dezmoглеinek, kadherine) expresszióját szabályozó jelátviteli folymatokban. Kimutattuk, hogy a differenciálódó keratinocytákra jellemző dezmoглеin-1 expresszióját az nPKC δ izoforma fokozza, az nPKC ϵ pedig csökkenti. A proliferáló keratinocyták meghatározó adhéziós molekulájának, a dezmoглеin-3-nak az expresszióját ezen izoenzyme a fentiekkel ellentétes módon befolyásolja (az nPKC δ csökkenti, az nPKC ϵ fokozza); emellett a molekula kifejeződését a cPKC α aktivitás is gátolja. A proliferáló keratinocyták másik markerének, a P-kadherinnek a kifejeződését szintén antagonisztikusan befolyásolja a differenciálódást elősegítő cPKC α / nPKC δ izoformák, valamint a proliferációt indukáló cPKC β /nPKC δ izoformák [74].

A PKC rendszernek a bőr biológiai folymataiban betöltött funkcióját az epidermis hámsejtjein kívül egyes bőrfüggelékek esetében is vizsgálták. A szőrtüsző esetében bebizonyosodott, hogy az enzimes család egyes tagjai központi szerepet játszanak a szőrszál növekedés és a szőrtüsző életciklusának (az ún. hajciklusnak) szabályozásában [75-77]. Több izoforma specifikus expresszióját sikerült kimutatni a szőrtüsző felépítésében részt vevő különböző rétegekben és sejtcsoportokban. A dermális papillát alkotó sejtekben az alábbi izoformák expresszióját bizonyították: cPKC α , cPKC γ , nPKC δ , nPKC ϵ és aPKC ι [78]. Ezen felül a külső gyökérhüvely sejtjein leírták a cPKC α és az nPKC η izoformák expresszióját, az nPKC δ kifejeződését pedig a belső gyökérhüvelyt alkotó sejteken sikerült

kimutatni [72,75,79]. Különböző egérmodellekben emellett azt találták, hogy egyes izoformák expressziója változik a hajciklus bizonyos fázisaiban, és ezen expresszióváltozás szoros korrelációt mutat a szőrszálnövekedés ütemével. Kimutták például, hogy a cPKC α expresszió a hajciklus ún. anagén fázisában a legkifejezettebb, amely ciklusra az intenzív szőr/hajszál-növekedés jellemző; az izoforma ugyanakkor egyáltalán nem mutatható ki a hajciklus utolsó, ún. telogén (vagy nyugalmi), fázisában, amelyben további szőrszálnövekedés nem következik be. Ezek alapján tehát felmerül a cPKC α izoforma specifikus szerepe a szőrszálnövekedést indukáló folyamatok szignáltranszdukciós útvonalában [75,76]. Ezzel ellentétben úgy tűnik, hogy a nPKC δ aktivitása gátolja a kontrollálatlan szőrszálnövekedést [76]. Mindezekon túl a PKC enzimeknek a szőrtüsző biológiai folyamataiban betöltött központi szerepét támasztják alá azon kísérletes megfigyelések is, melyek szerint a PKC rendszer aktivitásának szelektív farmakológiai modulációja (PKC aktivátorok és inhibitorok felhasználásával) képes befolyásolni a szőrszálnövekedés intenzitását és a szőrtüsző egyes sejtcsoportjainak (pl. dermalis papilla fibroblastjai) sejtenyészetben való túlélését és proliferációs képességét [77,80].

A faggyúmirigy és sejtjei, a sebocyták

Bár a PKC rendszer központi szerepéről nagyszámú adat áll rendelkezésre az epidermist alkotó keratinocyták és a szőrtüszők esetében, egyre több olyan kutatási eredmény lát napvilágot, amely aláhúzza a PKC rendszer fontosságát a bőrfüggelékek biológiai folyamataiban is; ennek ellenére a pilosebaceous egységet alkotó másik szervecske, a faggyúmirigy esetében az enzimes család lehetséges funkcionális szerepét mindeztáig nem vizsgálták.

A faggyúmirigy biológiai funkciója

A faggyúmirigyek (*glandulae sebaceae*) a bőr irha rétegében található, holokrin szekrécióra képes alveolaris mirigyek. Az esetek döntő többségében szőrtüszőkhöz kapcsoltn helyezkednek el, így alkotva az ún. pilosebaceus egységet. A faggyúmirigyek fő feladata a változatos lipidösszetételű faggyú (sebum) termelése, amely főként neutrális lipideket (di- és triglicerideket, szabad zsírsavakat, koleszterint, viaszésztereket és, a sebocytákra különösen jellemző, szkvalént) tartalmaz [81-83]. A faggyú a felszínen szétterülve vízhatlan védőréteget képez a bőrön, hozzájárulva a bőr víztartalmának

konzerválásához. Állatokban, a kültakaró impregnációja által, szerepet játszik a nedvesség elleni védekezésben és a hőszigetelésben [84]. Ezenfelül, egyes fajok faggyúmirigyei a társas viselkedésben fontos feromonok kiválasztására specializálódtak. Mivel emberben ezen funkciók jórészt csökevényesek, ezért az emberi faggyúmirigyet sokáig evolúciós maradványnak tartották, amelynek valódi élettani szerepe kérdésesnek tűnt [85]. Az utóbbi idők kutatásai azonban kétséget kizáróan igazolták, hogy a mirigyek szerepe nem korlátozódik csupán a bőr „passzív” barrier funkciójának kialakítására. A sebocyták ugyanis számos endokrin és parakrin mechanizmusban vesznek részt, amelyeken keresztül hozzájárulnak a bőr fiziológiás homeosztázisának fenntartásához. Továbbá fontos immunológiai funkciókat is betöltenek, amelyek segítenek a kórokozók bőrben való elszaporodását megfékezni [86-89].

A mirigyek felépítésére jellemző, hogy a sejtek végkamrákba, ún. acinusokba csoportosulnak, amelyek széli részén található bazális sejtsor folyamatos proliferáció révén gondoskodik a sejtek utánpótlásáról. A bazális sejtsor proliferáló sebocytáiból származó utódsejtek egy része megőrzi nagy osztódási potenciálját (fenntartva ezáltal a bazális sejtsor állományát), az utódsejtek másik csoportja viszont a differenciálódás irányába válik elkötelezetté. A differenciálódási folyamat útjára lépő sebocyták folyamatosan az acinus középpontja felé nyomulnak, miközben citoplazmájukban nagy mennyiségű neutrális lipidet halmoznak fel. A folyamat végén a sejtmembránok feltöredeznek, a sejtek szétesnek, majd a citoplazmájukban lévő lipidek (egyéb sejtörmelékkel együtt) a kivezetőcsövekbe kerülnek, a sebum alapanyagát alkotva. Ezt az eseménysort, amely a mirigysejtek teljes destrukciójával jár, nevezzük holokrin szekréciónak. A sebocyták terminális differenciálódási programját irányító komplex szabályozási folyamatok, valamint a proliferáció és a sejthalál egyensúlyát meghatározó faktorok részletes feltérképezése intenzív kutatás tárgyát képezi napjainkban is [90,91].

Az elmúlt években számos endokrin és parakrin mediátorról bizonyosodott be, hogy a sebocyták komplex proliferációs/differenciálódási programjának befolyásolásán keresztül, fontos szerepet játszhatnak a faggyúmirigyek biológiai folyamatainak szabályozásában [89]. Ezek közül az egyik legjelentősebb csoportot az androgének alkotják, amelyekről régóta ismert, hogy serkentik a faggyúmirigyek működését és a sebum termelését [81,85]. Az androgénreceptor-expresszió túl mára már az is egyértelműen bebizonyosodott, hogy a sebocyták maguk is rendelkeznek a szteroid hormonok szintéziséhez szükséges enzimaparátussal [92,93], valamint, hogy képesek az androgének metabolizálására is [94,95]. Az androgén hatás kifejlődéséhez a peroxiszóma proliferátor aktivált receptorok (PPAR-ok)

aktivitása is kulcsfontosságúnak tűnik [96,97]. A nukleáris receptorok közé tartozó PPAR-okról kimutatták, hogy fokozzák a sebocyták terminális differenciálódását és az ezt kísérő lipidszintézist [98-100]. Az androgének és a PPAR ligandok mellett számos egyéb (neuro)endokrin és parakrin mediátor szerepét írták le a sebocyták differenciálódásának szabályozásában [89]. Ide tartozik például a növekedési hormon, az inzulin és az IGF-I, amelyek egyaránt szerepet játszanak a differenciálódás és a proliferáció szabályozásában [101]. Ezen felül a hipotalamusz-hipofízis rendszer mediátorai közül a kortikotropin „releasing” hormonról (CRH), az α -melanocitastimuláló hormonnól (α -MSH) és a β -endorfinról is bebizonyosodott, hogy képes fokozni a sejtek lipidszintézisét. Fontos megemlíteni, hogy az összes említett mediátor molekula receptorát sikerült azonosítani sebocytákban [87,89,102-105]; hangsúlyozandó továbbá, hogy közülük számos anyag esetében felmerült a PKC rendszer potenciális szabályozó szerepe a receptoraktivációt kísérő jelátviteli mechanizmusokban.

A faggyúmirigyek patogenetikai szerepe

A faggyúmirigy sebocytáinak megváltozott proliferációs és differenciációs képessége számos bőrbetegség (seborrhoea, *acne vulgaris*, rosacea, rhinophyma, sebaceous carcinoma) etiológiájában játszhat központi szerepet [106-111].

Incidenziája és prevalenciája alapján kiemelkedik ezen betegségek közül az *acne*, amely a leggyakoribb dermatológiai kórkép, és, bár a legtöbb esetben nem jár súlyos tünetekkel, jelentős mértékben befolyásolja (főként) a fiatal populáció életminőségét [107]. A betegség patogenezise rendkívül komplex, ugyanis számos faktor kóroki szerepe került leírásra a több évtizedes kutatómunkának köszönhetően. Ezen vizsgálatok alapján mára már egyértelmű, hogy a kóros faggyúmirigy-funkció a patogenezis egyik központi elemét jelenti, hiszen a legtöbb *acne* forma (hyper)seborrhoea talaján alakul ki. A seborrhoea örökletes faktorok által meghatározott kóros állapot, melyre a fokozott sebumtermelés (a mirigyek sebocytáinak fokozott lipidszintézise) miatt kialakuló zsíros fénylő arcbőr jellemző. Az örökletes tényezőkön kívül az *acne* kialakulásának nagyon jellegzetes életkorfüggése (jellemzően a pubertás körül a legkifejezettebb a fokozott sebumtermelés) felhívja a figyelmet az androgén hormonális státusz fontosságára. A bőr felszínén lévő, nagy mennyiségű sebum kiváló táptalajt nyújt olyan, az *acne* patogenezisében jelentős baktériumok számára, mint pl. a *Propionibacterium acnes* és a *Staphylococcus epidermidis*. Ezen mikroorganizmusok lipáz enzimei a sebum di- és trigliceridjeiből szabad zsírsavakat hasítanak ki. A szabad zsírsavak

elősegítik az ún. *comedo*-k (a faggyúmirigy kivezetőcsöveinek eltömődését okozó szarucsapok következtében létrejövő kóros faggyúfelhalmozódás) kialakulását azáltal, hogy keratinocita-hyperproliferációt és következményes hyperkeratosist indukálnak a kivezetőcsövek területén. A *comedo*-ban felhalmozódó (kiürülni nem tudó) faggyú azután még több baktérium számára nyújt ideális „táptalajt”, melyek aktiválják az immunrendszer sejtjeit, míg végül kialakulnak a betegségre jellemző gyulladással papulák és pustulák [112].

Az *acne*-s tünetek kialakulásához vezető eseménysorozat lépéseinek pontos sorrendjére azonban a mai napig nem sikerült fényt deríteni. Magyarázatot igényel például, hogy az emberi bőr felszínén gyakorlatilag ubikviternek tekinthető baktériumok miért okoznak egyes embereken súlyos acnés tüneteket, míg más betegek bőrén jelenlétük semmilyen kóros elváltozással nem jár. Ezen felül az sem tisztázott, hogy a seborrhoeás tüneteket mutató egyéneknél egyes esetekben miért nem alakulnak ki az *acne*-ra jellemző elváltozások. A legújabb kutatások a lokális gyulladással folyamatok egyensúlyának megbomlását, valamint a krónikus gyulladással állapot fenntartásához vezető kóros immunológiai válaszok patogenetikai szerepének elsődlegességét hangsúlyozzák; ennek megfelelően az *acne* tünetegyüttesének kialakulását akár bakteriális kolonizáció hiányában is elképzelhetőnek tartják [106,107,112,113]. A faggyúmirigy sebocytái a kóros gyulladással válaszok kialakításában és fenntartásában is kulcsszerepet játszhatnak. Különböző gyulladássalinduktor szignálok (pl. UV sugárzás, mikrobiális fertőzések, substance-P és arachidonsav) hatására a sejtek számos gyulladással lipidmediátort (leukotrién-B₄ (LTB₄), prosztaglandin-E₂ (PGE₂)) és egyéb proinflammatorikus citokint (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8/CXCL8, TNF α) képesek termelni [114-117]). Ezen molekulák (valamint a keratinocyták által termelt hasonló mediátorok) hatására ezután limphocyták (CD4 + T-sejtek), neutrophil granulocyták és macrophagok infiltrálják az adott bőrterületet, amelyek fenntartják a lokális gyulladással állapotot.

A fent említett gyulladássalinduktor szignálok közül kiemelt figyelmet érdemel a prosztaglandin és leukotrién lipidmediátorok prekursora, az arachidonsav (AA). Az AA-ról bebizonyosodott, hogy parakrin faktorként képes indukálni a sebocyták terminális differenciálódását elősegítő jelátviteli folyamatokat, amelynek eredményeképpen fokozódik lipidtermelésük és, ezzel párhuzamosan, apoptotikus folyamataik [115,118]. Ezek alapján tehát elmondható, hogy az AA részt vesz mindkét, az *acne* patogenezisének alappilléreként számontartott kulcsfontosságú folyamatban: a (hyper)seborrhoeához vezető lipidszintézis, valamint a sebocyták által termelt gyulladással mediátorok termelésének fokozásában is; ezáltal fontos összekötő kapcsolatot jelenthet a patogenezis eme két kulcstényezője között.

A faggyúmirigyek biológiai folyamatait vizsgáló kutatások területén a különböző állatmodellek használata után (pl. rágsálók preputionális mirigyéből származó sejtek [119,120] vagy hörcsög fülének faggyúmirigyei [121]) egyre nagyobb teret nyertek a humán sebocyták *in vitro* tenyésztései [122,123]. Ennek oka, hogy az olyan kórállapotok, mint például az *acne*, kizárólag emberekben fordulnak elő; valamint, hogy a faggyúmirigyek szekréciós kapacitása jelentős fajspecifitást mutat. A primer sebocytá tenyésztetek fenntarthatóságát ugyanakkor jelentősen korlátozza a sejtek terminális differenciálódása [124,125], ezért a további kutatásokat nagyban elősegítették a humán faggyúmirigyből létrehozott immortalizált sejtvonalak, így a SEB1 [93], az SZ95 [126], vagy a legújabban kifejlesztett Seb-E6E7 [127] előállítás. A humán SZ95 sebocyták gyakorlatilag korlátlan ideig fenntarthatók, ugyanakkor jól használhatók a normál humán sebocyták biológiai folyamatainak modellezésére, mivel megőrzik a faggyúmirigy sejtekre jellemző alapvető fenotípusos sajátosságokat (sebocytákra specifikus lipidösszetétel, citokeratin expresszió, antigén kifejeződés, funkcionális androgén receptor expresszió, androgén metabolizmus enzimeinek jelenléte). Mindezek miatt, a PKC rendszernek a faggyúmirigy biológiai folyamataiban betöltött szerepét vizsgáló kutatásainkban az SZ95 sejtvonalat választottuk modellünknek [126].

Az atípusos C1 doménnel rendelkező szignál-proteinek

Ahogy azt fentebb már említettük, az elsőként azonosított DAG/forbol-észter-effektor molekulákon, a PKC enzimeken kívül [41,42,128] számos egyéb jelátviteli molekuláról (PKD, RasGRP, DGK, chimaerin stb.; lásd 2. ábra) bizonyosodott be, hogy rendelkezik ezen ligandok megkötésére alkalmas típusos C1 doménnel. Ezért mára már egyértelművé vált, hogy a különböző extracelluláris mediátorok receptoraktivációjának hatására felszabaduló másodlagos messenger, a DAG molekula, a szignáltranszdukciós útvonalak jóval szélesebb spektrumát képes aktiválni, mint ahogyan azt korábban gondolták. A DAG-szenzitív molekulák nagycsaládjába sorolt újabb szignálproteinek az enzimatis funkciók széles skálájával rendelkeznek, hiszen találhatók köztük, többek között, protein és lipid kinázok (PKD, DGK), valamint kis GTP-ázok (Ras, Rac stb.) aktivitását szabályzó jelátviteli fehérjék is (RasGRP, chimaerin stb.). Enzimatis funkcióikon keresztül ezen molekulák számos alapvető fontosságú sejt folyamat szabályozásában vehetnek részt, mint pl. a sejtek

osztódásának és differenciálódásának, valamint a sejtmotilitásnak és a sejtek túlélésének regulációja [2,7,8,13].

A típusos C1 domént tartalmazó, nagyszámú DAG-effektor molekula mellett jelentős számban írtak le olyan proteineket is (lásd részletesen felsorolva itt: [13]), amelyek rendelkeznek ugyan C1 doménnel, de a kísérletes bizonyítékok alapján azok nem mutatnak DAG/forbol-észter-szenzitivitást. Ide tartoznak például (a teljesség igénye nélkül) az atípusos PKC izoenzimek (aPKC ζ és aPKC $\lambda/1$); a fent említett RasGRP család 2-es izoformája (RasGRP2); a MAP kináz útvonalban részt vevő protoonkogén, c-Raf molekula; a Ras szignalizációban részt vevő KSR (Kinase Suppressor of Ras); valamint a guanin nukleotid cserélő faktorként (GEF) funkcionáló Vav molekulák. A ligandkötés hiánya miatt ezen proteinek C1 doménjét „atípusos” C1 doméneknek nevezték el. Laboratóriumunk korábbi, az aPKC izoenzimek DAG/forbol-észter-szenzitivitására irányuló kísérletei alapján ugyanakkor felvetődött, hogy ezen atípusos csoportot két további alcsoportra lehet bontani [24].

Az első alcsoportba tartozó C1 domének esetében a ligandkötés hiánya a kötőzseb geometriai felépítésének nagyfokú torzulásával magyarázható. Az ide sorolható c-Raf és KSR molekulák esetében például (számos kulcsfontosságú aminosavat érintő) deléció következtében a ligandkötőhely egyik oldalát alkotó, C-terminális peptidhurok „csőkevényes” felépítésű, ezáltal a domén alkalmatlanná válik a ligand stabil megkötésére [129,130].

A másik alcsoportba tartozó proteinek C1 doménjainak geometriai felépítése azonban nem mutat ilyen nyilvánvaló strukturális hiányosságot; esetükben ezért egyéb faktorok okozhatják a ligandszenzitivitás hiányát [24]. Jó példa erre a csoportra az atípusos PKC család, amelynek ligandaffinitását laboratóriumunk korábbi kutatásai részletesen jellemezték. Molekulamodelljeink szerint az aPKC izoenzimek C1 doménjének geometriai felépítése erőteljes hasonlóságot mutat a nagy ligandszenzitivitással bíró nPKC δ C1b doménjával. Ugyanakkor a szerkezeti analízis több olyan, a ligandkötőzseb peremén található arginin molekula jelenlétére hívta fel a figyelmet, amelyek a klasszikus és a novel csoportba tartozó (DAG-szenzitív) PKC-kban nem fordulnak elő. A ligand bekötődésének és a C1 domén lipid-membránba való beágyazódásának szempontjából kulcsfontosságú pozíciókban (a kötőzseb „csúcán”) elhelyezkedő arginin molekulák több lehetséges mechanizmus szerint is hátráltathatják a hatékony ligandkötést és a membránasszociációt anélkül, hogy a kötőhely geometriai felépítését lényegesen megváltoztatnák. Egyrészt, az arginin molekulák bizonyos konformációkban részlegesen elzárhatják a kötőzseb „bejáratát”, ezáltal a ligand molekuláknak bekötődésük során ezen arginin molekulákkal kell versengeniük a kötőhelyre

való „bejutás” érdekében. Másrészt, az arginin molekulák jelenlétéből adódó pozitív töltések nagyobb denzitása megváltoztathatja a kötőhely csúcsi részének töltéseloszlását, és ezáltal torzulhatnak a C1 domén és a lipidmembránok között kialakuló kölcsönhatások (elektrosztatikus és hidrofób kötések). Az nPKC δ ligandkötésének mechanizmusára irányuló részletes strukturális elemzések rámutattak, hogy a ligand-C1 domén komplexnek a lipidmembránnal kialakuló kölcsönhatásait (vagyis a membránhoz történő stabil asszociációjukat) meghatározó molekuláris faktorok kiemelt fontossággal bírnak az effektív ligandszenzitivitás vonatkozásában. Ezen vizsgálatok alapján a kötősebet alkotó két peptidhurok „csúcsi” részein elhelyezkedő lipofil természetű aminosavak alapvető jelentőségűnek bizonyultak a membránasszociáció (és ezáltal a ligandkötés) tekintetében [131]. Az izolált nPKC δ C1b domén forbol-13-acetáttal alkotott receptor-ligand komplexének krisztallográfiás vizsgálata rámutatott, hogy a lipofil természetű ligand molekula a kötősebet alkotó (β -lemez szerkezetű) N- és C-terminális peptidhurok közötti hidrofil árokba illeszkedik be, ezáltal kiszorítva onnan az oldat hidrofil vízmolekuláit. A bekötődés után a ligand molekula a kötősebet „csúcsi” peremén elhelyezkedő lipofil aminosavakkal együtt tulajdonképpen egy folytonos hidrofób felületet hoz létre. A kialakuló „nagy kiterjedésű” hidrofób felszín elősegíti a ligandot kötő C1 domén membránba való beágyazódását, így a ligand-C1-membrán hármas komplexének stabil létrejöttét. A komplex további stabilizálódásához hozzájárulnak azon pozitívan töltött aminosav molekulák is, melyek közvetlenül a csúcsi régió alatt helyezkednek el, és a membrán anionos foszfolipidjeinek negatívan töltött csoportjaival ionos kölcsönhatásokat alakítanak ki (az utóbbi megfigyelés magyarázhatja a típusos C1 doméneknek, a ligandkötődési vizsgálatokban tapasztalt, nagyfokú preferenciáját foszfatidil-szerin-tartalmú membránvezikulumok iránt). Ezek alapján tehát érthető, hogy a lipidmembrán és a ligandkötősebet csúcsi részének megfelelő kölcsönhatását (vagyis a ligand-C1 komplex stabil membránasszociációját) gyengítő aminosavak jelenléte csökkenteni fogja az adott C1 domén DAG és forbol-észter ligandok iránti affinitását. Akár a kötőhely részleges okklúziójából adódó kompetíció, akár a kötősebet csúcsi peremének megváltozott elektrosztatikus potenciálja miatt kialakuló gátolt membránasszociáció okozza az atípusos PKC molekulák csökkent ligandaffinitását, annyi bizonyos, hogy a kötőhely alapvető geometriai felépítése nem zárja ki (teljesen) a ligandkötés lehetőségét. Erre utal azon korábbi megfigyelésünk, hogy amikor az aPKC ζ és az aPKC ι C1 doménjában (irányított mutagenézis segítségével) kicseréltük ezen arginin molekulákat az nPKC δ azonos pozícióiban található aminosavakra, jelentős ligandaffinitást detektálhattunk [24]. (Megfordítva pedig, az addig nagy affinitású

ligandkötés teljes megszűnését tapasztaltuk, amennyiben ezen arginin molekulákat a megfelelő pozíciókban az nPKC δ C1b doménjába juttattuk ugyancsak mutagenézis segítségével.) Tehát az atípusos PKC izoenzimek C1 doménját tulajdonképpen tekinthetjük egy drámaian lecsökkent affinitású, de potenciálisan szenzitív ligandkötő struktúrának. Ezt támaszthatják alá egyes szerzők azon megfigyelései (valamint saját vizsgálataink eredményei), melyek esetében nagyon magas ligandkoncentrációk mellett, bizonyos körülmények között, sikerült gyenge transzlokációt kimutatni a vad típusú aPKC izoformákkal is [132]. Ezek alapján felmerül annak a lehetősége, hogy amennyiben a C1 domén alapvető struktúráját célzó, nagy affinitású ligandok (DAG, forbol-észterek, bryostatin stb.) szerkezetének megfelelő kémiai módosításával sikerülne olyan vegyületeket kifejlesztünk, amelyek a kötőhelyre való megfelelő beilleszkedés mellett ezen arginin molekulákkal is képesek lennének kémiai kapcsolatot létesíteni, úgy lehetőségünk nyílna olyan ligandok kifejlesztésére, amelyek nagy szelektivitást mutatnak az aPKC izoformák C1 doménje iránt. Ezirányú vizsgálatok vegyész munkacsoportokkal együttműködésben jelenleg is folynak laboratóriumunkban.

Az intenzív kutatómunka eredményeképpen ugyanakkor az aPKC ζ -n és az aPKC ϵ -n kívül a jövőben valószínűleg számos egyéb, a ligandkötés szempontjából megfelelő(nek tűnő) C1 geometriával rendelkező, atípusos csoportba sorolt szignál-protein (pl. Vav, RasGRP2) DAG-szenzitivitásának pontos feltérképezésére nyílik lehetőségünk. Az ezirányú vizsgálatok hármassal haszonnal kecsegtetnek:

1. A C1 domén ligandkötődés szempontjából fontos strukturális determinánsainak részletesebb megismerése segítségünkre lehet abban, hogy az alapvető sejtfolyamatokat (proliferáció, differenciálódás, tumorigenézis) kontrolláló nagyszámú DAG-szenzitív molekula esetében feltérképezzük azokat a finom szerkezeti különbségeket, amelyek erősen konzerválódott C1 doménjaikat megkülönböztethetik egymástól. Ez megteremtheti annak a lehetőségét, hogy az egyes protein családok (sőt, pl. a PKC enzimek esetében, az egyes alcsaládok izoenzimjeinek) enzimaktivitását a C1 doménen keresztül, szelektíven befolyásolhassuk.
2. A DAG-szignalizációs útvonal komplex hálózatának mélyebb és részletesebb megismerésére nyílik lehetőségünk azáltal, hogy olyan új szignál-proteineket azonosítunk, amelyek funkciója DAG-gal modulálható. Egyes proteinek esetében felmerülhet, hogy aktivitásuk DAG által történő modifikációja eltér attól a konvencionális mechanizmustól, amelyben a DAG szerepe az enzimek lipidmembránokba való transzlokációja és ezáltal szubsztrátjaik targetálása. Számos

C1 doménnel rendelkező protein esetében vetődött fel ugyanis a domén lehetséges szerepe protein-protein interakciók szabályozásában [13]. Ezen intermolekuláris kapcsolatok DAG által való lehetséges befolyásolhatóságáról jelenleg nem rendelkezünk kielégítő ismeretekkel, hiszen a DAG szenzitivitás megítélésére irányuló kísérletek klasszikusan a DAG-C1-membránlipid hármas komplexének vizsgálatán alapulnak.

3. Az atípusos C1 doménnel rendelkező molekulák ligandaffinitásának pontos feltérképezése megteremtheti az alapját olyan új farmakonok kifejlesztésének, amelyeket a típusos C1 ligandumok (DAG, forbol-észterek, indolaktámok, bryostatinok stb.) szerkezetének megfelelő modifikációjával állítanak elő, és amelyek képesek lehetnek nagy affinitással (és adott esetben nagy szelektivitással) kötődni a megfelelő geometriával rendelkező atípusos C1 doménekhez. Ezáltal új lehetőség kínálkozik azon atípusos C1 doménnel rendelkező szignál-proteinek funkciójának farmakológiai modulációjára, amelyekben a C1 domén az enzimaktivitás fontos intramolekuláris szabályozó elemeként funkcionál.

Az aPKC alcsaládba tartozó izoenzimeken kívül, laboratóriumunkban jelenleg négy atípusos C1 doménnel rendelkező protein esetében folynak a ligandaffinitás tisztázására irányuló intenzív kutatások. Az egyik ezek közül a RasGRP2 molekula, amely a RasGRP családba tartozó három másik izoenzimtől (RasGRP1, RasGRP3 és RasGRP4) eltérően nem rendelkezik kimutatható DAG/forbol-észter affinitással, annak ellenére, hogy C1 doménja nagyfokú homológiát mutat a többi izoenzim C1 doménjével. A másik három protein a Vav családba tartozó Vav1, Vav2 és Vav3 izoenzim, amelyek közül a Disszertációban a Vav1-gyel kapcsolatos eredményeinket szeretném bemutatni.

A Vav1 molekula

A Vav1 biológiai funkciója

A Vav1 protein egy sokoldalú intracelluláris szignál-transzducer molekula, amely központi szerepet játszik számos jelátviteli útvonal regulációjában. A Vav1 legfontosabb és legjobban jellemzett funkcióját a guanin nukleotid kicserélő (guanine nucleotide exchange, GNE) enzimaktivitása jelenti, amelynek segítségével részt vesz a Rho/Rac családba tartozó kis GTPázok funkciójának szabályozásában. Ezáltal olyan alapvető fontosságú

szignáltranszdukciós útvonalakat képes aktiválni, amelyek részt vesznek, többek között, a citoskeleton organizációjának, a sejtciklus progressziójának, a génexpresszióknak, az adhézióknak, a migrációknak, valamint a sejtosztódásnak és a sejthalálnak a szabályozásában [133-135]. A Vav1, katalizátor funkciója segítségével, elősegíti a Rho/Rac proteinekhez kapcsolódó GDP molekulák kicserélődését GTP molekulára, amelynek hatására ezen proteinek inaktív (GDP-kötött) konformációja megváltozik és enzimatikusan aktív (GTP-kötött) konformációt vesznek fel. A Rho/Rac család tagjai közül a Vav1 nukleotid cserélő aktivitásának elsődleges célpontját a Rac1 molekula jelenti [136], de a legfrissebb kutatások alapján bebizonyosodott, hogy (kisebb mértékben) a Cdc42 és a RhoA proteinek funkcióját is képes szabályozni [137]. A Vav1 molekula azonban számos sejt folyamat regulációjában részt vehet nukleotid cserélő aktivitásától független módon. Ezekben az esetekben szabályozó szerepét protein-protein interakciók elősegítése révén fejt ki, miáltal fontos adapter funkciókat tölt be [138].

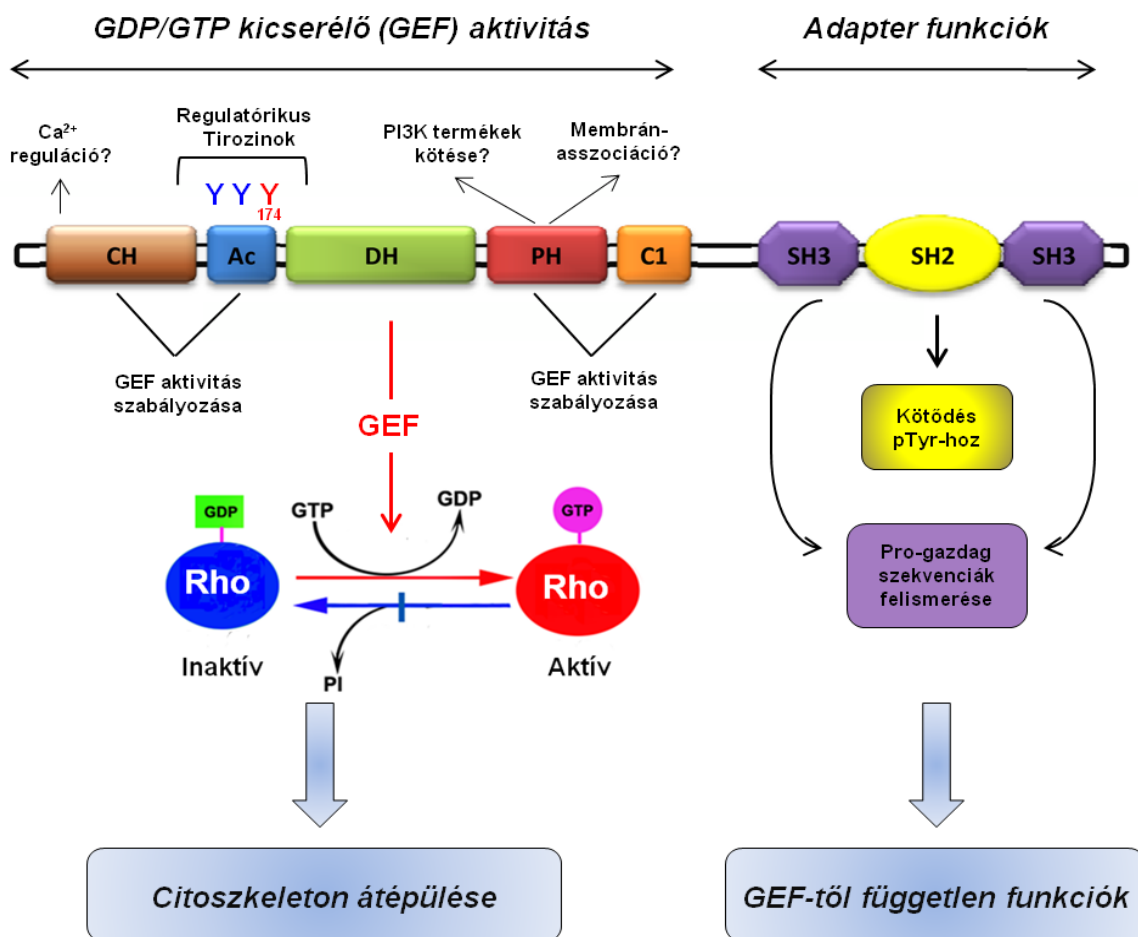
A Vav család emlősökben három tagból áll (Vav1, Vav2 és Vav3), amelyek erősen konzerválódott struktúrával rendelkeznek. A Vav1 izoforma expressziója szinte kizárólag csontvelői eredetű sejtekben mutatható ki, azonban a másik két izoforma számos egyéb sejtfeleségben kifejeződik, gyakorlatilag ubikviternek tekinthető [139-142]. A csontvelői eredetű sejtekben a Vav1 központi szerepet játszik az aktin sejt váz extracelluláris szignálok hatására bekövetkező átépülési folyamatainak szabályozásában. T-lymphocytákban például a T-sejt-receptorok (TCR) aktiválása a Vav1 GNE funkciójának aktiválásán keresztül (Rac1 által irányított) citoskeleton reorganizációt indukál. Ennek a esemény sornak alapvető jelentősége van az ún. immunológiai szinapszis létrejöttében és a T-lymphocyták megfelelő aktivációjában [134,143]. Az immunrendszer más sejt típusaiban még számos egyéb receptor felől aktiválhatók a Vav1-et involváló szignáltranszdukciós útvonalak. A teljesség igénye nélkül ilyen receptorok például a B-sejt receptorok (BCR), az FcRI, a különböző citokin és kemokin receptorok, valamint az integrin receptorok és a Natural Killer (NK) receptorok. A citoskeleton átépülését irányító jelátviteli folyamatok szabályozásán kívül a Vav1 molekula képes ezen csontvelői eredetű sejtek génexpresszióját is kontrollálni, olyan transzkripciós faktorok aktivitásának közvetlen szabályozása által, mint pl. az NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells), az AP-1 (Activator protein-1) és az NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) [133,135,138,144]. Ezenfelül a Vav1-ről bebizonyosodott, hogy alapvető szerepet játszik a T-lymphocyták differenciálódási folyamataiban is, mivel Vav1 „knock-out” egerekben ezen érési folyamat nem zajlik le megfelelően a thymus állományában [145].

A csontvelői eredetű sejtek biológiai folyamatainak regulációján túl, a Vav1 szerepe az utóbbi évek kutatásai alapján a nem-haemopoetikus eredetű solid tumorok patogenezisében is felmerült [146], bár a molekula pontos funkciója ezen folyamatokban nem egyértelműen tisztázott. A Vav1 protein N-terminálison deletált fragmentumáról (65 aminosav deléciója a teljes fehérjéhez képest) bebizonyosodott, hogy NIH-3T3 fibroblastokban onkogénként funkcionál, hiszen képes volt neoplastikus transzformációt indukálni a Vav1-el transzfektált sejtekben [142]. Ugyanakkor, eddig egyetlen humán tumorban sem sikerült onkogén potenciállal rendelkező, mutáns Vav1-expressziót kimutatni. Mindazonáltal, a legújabb kutatási eredmények az ectopiás lokalizációkban (olyan sejtfeleségekben, ahol fiziológias körülmények között egyébként nem fejeződik ki) aberránsan expresszáldó, vad típusú molekula patogenetikai szerepére hívják fel a figyelmet a humán malignomák kialakulásának és progressziójának eseménysorában. A Vav1 kifejeződését kimutatták többek között neuroblastomákban, a pancreas ductalis adenocarcinomájában és melanomákban [147-150]. Bár a molekula tumorigenezisben betöltött patogenetikai funkciójának molekuláris mechanizmusa jelenleg még nincs pontosan feltérképezve, valószínűnek tűnik, hogy az ectopiás Vav1-aktiváció olyan jelátviteli kaszkádokat indít el, amelyek a fokozott sejtproliferációnak kedveznek, illetve elősegítik a tumorosan transzformált sejtek túlélését és invázióját (utóbbit a citoskeletális fehérjestruktúra átépülésének elősegítése által, a Rho/Rac GTP-ázok aktivitásának szabályozásán keresztül).

A Vav1 molekula szerkezete és az enzimaktivitás szabályozása

A Vav1 szerkezeti felépítésében számos különböző funkciót betöltő strukturális elem található meg [133], amelyek jelenléte magyarázatul szolgálhat a molekula rendkívül sokoldalú szabályozó szerepére a jelátviteli folyamatokban (3. ábra). A Rho/Rac család kis GTP-ázainak nukleotid cseréjét katalizáló enzimaktivitásért a DH (Dbl homology) domén a felelős [136]. A DH domént az N-terminális oldalon az ún. Ac régió (savas (*acidic*) karakterű aminosavakat tartalmazó régió), valamint a CH (calponin homology) domén határolja. A molekula C-terminális vége felé haladva pedig a PH (pleckstrin homology) és a C1 doméneket találjuk. A DH domént körülvevő strukturális elemekről bebizonyosodott, hogy a GNE aktivitást szabályozzák [146]. Ugyanakkor a Vav enzimek felépítése egyedülálló a Rho/Rac proteinek funkcióját szabályzó GEF-ek között, mégpedig azért, mert az exchange aktivitásért és annak szabályozásáért felelős doméneken (CH-C1 régión) kívül, a molekula C-terminális végén, tartalmaz egy SH2 (src homology domén 2) és SH3 (src homology domén

3) doménekből álló régiót is. Ezen, a fehérje-fehérje interakciókat facilitáló domének jelenléte tirozin-foszforilációs útvonalak jelátviteli molekuláira jellemző. Az SH2 domén segítségével a Vav1 molekula egyéb proteinek foszforilált tirozin oldalláncaihoz képes kapcsolódni, az SH3 domén pedig bizonyos prolinban gazdag aminosavszekvenciákat képes felsimerni, így azokhoz kapcsolni a Vav1 molekulát [144]. Ez a C-terminálisan elhelyezkedő, SH3-SH2-SH3 felépítésű alegység tehát megteremti annak a lehetőségét, hogy a Vav proteinek (a GEF-ek között egyedülálló módon) részt vegyenek számos olyan szignáltranszdukciós útvonalban, amelyekben a fehérje-fehérje interakciókon keresztül „scaffold” funkciókat láthatnak el [138].



3. ábra: A Vav1 protein elsődleges szerkezetének kialakításában részt vevő strukturális domének sematikus diagramja és az egyes domének szabályozó funkciója. CH: „calponin homology” domén, Ac: „acidic” régió, DH: „Dbl homology” domén, PH: „pleckstrin homology” domén, C1: C1 domén, SH2/3: „src homology” domén 2/3. Az egyes domének funkcióinak leírását lásd a szövegben. pTyr: foszfo-tirozin, Pro: prolin, GEF: guanin nukleotid „exchange” faktor, Rho: kis GTP-áz molekulacsalád (RhoA, Rac1, Cdc42), PI3K: foszfatidilinozitol-3-kináz.

A Vav1 molekula nuklotid cserélő aktivitását számos faktor képes befolyásolni és szabályozni. Talán az egyik legfontosabb tényező a tirozin foszforiláció, amely az Ac régióban található (erősen konzerválódott) tirozin (Tyr¹⁷⁴) molekulán játszódik le [151,152]. A Tyr¹⁷⁴-foszforiláció meghatározó szerepet játszik a Vav1 molekula tirozin kinázok általi aktiválásában. A központi jelentőségű tirozin molekula a család mindhárom tagjában (Vav1, 2, 3) megtalálható a struktúra identikus helyein. Az Ac régió belül egy olyan α -helikális szerkezetű peptidszakaszon helyezkedik el, amely számos intramolekuláris kontaktust tart fenn a DH domén szubsztrátkötő régiójával, ezáltal (a PKC-k esetében leírt pszeudoszubsztrát régióval analóg módon) tulajdonképpen elfedi ezt a területet a kis GTP-ázok elől, megakadályozván azok effektív kötését (autoinhibíció). A Tyr¹⁷⁴ foszforilációja olyan intramolekuláris konformációs változásokat indukál, amelyek hatására ezen α -hélix eltávolodik a DH domén szubsztrátkötő régiójától, így a DH domén felszabadul az autoinhibíció alól; ezáltal képes lesz a szubsztrát molekulákkal kapcsolatot létesíteni és a GDP/GTP csere által azokat aktiválni [153].

Bár a pontos mechanizmus részletes feltérképezése még várat magára, a PH doménról úgy tartják, hogy a PI3K (foszfatidilinozitol-3-kináz) útvonalon keletkező lipid mediátorok hatására képes a Vav1 aktivitást allosztérikus módon befolyásolni, illetve a molekula membránba történő lokalizációját elősegíteni. A foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfát (PIP₃) bekötődésének hatására (*in vitro* vizsgálatokban) a GNE aktivitás mérsékelt növekedését találták, míg a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) kötődése ezzel ellentétes módon befolyásolta az enzimaktivitást. Ezen kísérletek alapján tehát feltételezhető, hogy a különböző intracelluláris lipidmediátorok megkötése (a PH domén által) eltérő módon befolyásolja a PH domén és a DH domén között fennálló intramolekuláris kapcsolatokat (a PIP₃ fokozza a két domén közötti asszociációt, míg a PIP₂ a disszociációt segíti elő), ezáltal ellentétes hatást gyakorolva a DH domén szubsztrátkötőhelyének hozzáférhetőségére és a Rho/Rac proteinek irányában megvalósuló exchange aktivitásra [154-156]. Mindazonáltal a PH domén szabályozó funkciójára irányuló kutatások nem mentesek az ellentmondásoktól, ezért annak részletes és pontos megismerése további vizsgálatokat igényel.

A molekula N-terminális végén elhelyezkedő CH doménról szintén azt feltételezik, hogy autoinhibitorikus funkcióval bírhat, mivel ezen szakasz (parciális vagy teljes) deléciója jelentősen fokozza a molekula enzimatisz aktivitását [140,157]. A CH domén regulatórikus funkcióját leíró modellek ezek alapján az enzimaktivitás (CH domén általi) gátlását azzal magyarázzák, hogy a CH domén intramolekuláris kapcsolatokat létesít a C1 doménnel, és ezen kötődés hatására a molekula egy olyan „zárt”, hurokszerű konformációt vesz fel, amely

tulajdonképpen a molekula belsejébe zárja a DH domént, így annak szubsztrátkötő régiója fedésbe kerül. A modell alapján tehát a CH és a C1 domének közötti interakciók tovább stabilizálhatják az Ac régió kritikus α -hélice és a DH domén között fennálló intramolekuláris kötéseket, amelyek együttesen allosztérikusan gátolják a szubsztrátok bekötődését, és ezáltal (foszforilálatlan Tyr¹⁷⁴ esetén) inaktív állapotban tartják a Vav1 molekulát [152,158].

A Vav1 molekula C1 doménja

A Vav proteinek egy további aspektusban is különleges molekuláknak számítanak a GEF proteinek népes táborában; ugyanis ez az egyetlen GEF enzimcsalád, amelynek szerkezeti felépítésében megjelenik a C1 domén. Ráadásul újabb kutatási eredmények alapján úgy tűnik, hogy a domén alapvető fontosságú szerepet játszik a Vav funkciójának szabályozásában. Az enzimaktivitás (fent említett, CH-C1 interakciók által megvalósuló) allosztérikus gátlásán túl a kísérletes adatok számos egyéb olyan mechanizmusra világítanak rá, amelyeken keresztül a C1 domén a Vav1 enzimaktivitását szabályozhatja. Irányított mutagenézist alkalmazó vizsgálatok segítségével például kimutatták, hogy a C1 domén alapvető fontossággal bír a megfelelő exchange aktivitás fenntartásában, hiszen ezen régiót érintő mutációk (egyes esetekben) drámaian lecsökkentették a Rho/Rac proteinek irányában mutatott enzimaktivitást [152,159]. Ezek alapján olyan feltételezések/modellek is napvilágot láttak, melyek szerint a C1 domén tulajdonképpen képes közvetlenül kapcsolatba lépni a Vav-szubsztrátokkal. Ezek értelmében a GTP-áz molekulák C1 általi megkötése lehetne az alapja a domén Vav-aktivitást szabályozó funkciójának [160]. Mindazonáltal a legfrissebb kutatások eredményei nem támasztják alá ennek a modellnek a létjogosultságát. Nagyfelbontású röntgenkristallográfiás mérések által egészen új betekintést nyerhettünk a C1 domén regulatórikus szerepébe [137,161]. A Vav1 protein (Ac)DH-PH-C1 fragmentumának Rac1-el alkotott kristályos komplexét vizsgáló térszerkezeti analízis alapján egy különleges intramolekuláris kapcsolati rendszer jelenlétére derült fény a PH-C1 régió és a DH domén között. Úgy tűnik, hogy ezen intramolekuláris kötések legfőbb funkciója abban áll, hogy segítenek stabilizálni egy, a DH doménben elhelyezkedő, kritikus strukturális funkcióval bíró α -hélix (az $\alpha 6$ jelölésű szakasz) optimális konformációját. Az említett α -helikális peptidszakasz intermolekuláris kötések segítségével kontaktusba lép a Rac1 molekula erősen konzervált szerkezetű, ún. „switch II” régiójával. A két protein közötti intermolekuláris kontaktusok kialakulása alapvető szerepet játszik a (Rac1-hez annak inaktív állapotában kötődő) GDP molekula Rac1-ről történő leválasztásában. Ezek alapján tehát úgy

tűnik, hogy a C1 domén (a korábbi nézetekkel ellentétben) nem vesz részt közvetlenül a szubsztrát molekula (Rac1) megkötésében, hanem (a PH doménnel közösen) a DH doménnel lép közvetlen kapcsolatba és korlátozza a domén bizonyos peptidszakaszainak (főként az $\alpha 6$ hélixnek) strukturális flexibilitását. Ezáltal stabilizálja a DH domén azon konformációs állapotát, amely szükséges a Rac1 molekulával történő interakciók hatékony kialakulásához és a megfelelő enzimatis aktivitáshoz.

A krisztallográfias elemzések további fontos adatokkal is szolgáltak a Vav1 molekula C1 domén struktúráját illetően. Az adatok egyértelműen azt mutatták, hogy a C1 domén rendelkezik egy ligandkötő zsebbel, amely alkalmas lehet egy kis molekula befogadására. A mérések egyúttal meglepő hasonlóságot találtak a Vav1 C1 és a nagy ligandszenzitivitással bíró nPKC δ C1b szerkezeti felépítése között [137]. Úgy tűnik tehát, hogy a ligandkötőhely geometriája a Vav1 esetében sem zárna ki a DAG vagy egyéb C1 ligandumok (forbol-észterek, bryostatinok) kötődését. Ugyanakkor, korábbi kísérletek tanúsága szerint, a Vav1 nem képes DAG/forbol-észter kötésre, hiszen tisztított Vav1 molekulák affinitásvizsgálata során ultraszenzitív anyagok (radioaktívan jelölt [^3H]Bryostatin) felhasználásával sem sikerült ligandkötést kimutatni még olyan kísérleti elrendezés mellett sem, amely alkalmas volt nagyon gyenge szenzitivitás kimutatására is [162]. Ezen kísérletek alapján a Vav1 molekula C1 doménjét az atípusos (DAG/forbol-észter szenzitivitással nem rendelkező) C1 domének csoportjába sorolták [13].

A fentiek alapján ugyanakkor számos kérdés fogalmazódik meg. Mi lehet az oka a röntgenkrisztallográfias adatok és a ligandaffinitást célzó vizsgálatok között fennálló látszólagos ellentmondásnak? Lehetséges volna, hogy az aPKC-k esetében tapasztaltakhoz hasonlóan léteznek egyéb faktorok, amelyek a kötőhely megfelelő geometriai felépítése ellenére is akadályozzák a ligandkötődést? Amennyiben sikerülne ezen faktorokat azonosítanunk, úgy (az aPKC ζ és az aPKC ι mellett [24]) a Vav1 esetében is lehetőségünk nyílhat olyan módosított szerkezetű DAG/forbol-észter-analógok kifejlesztésére, amelyek képesek lehetnek a Vav1 C1 struktúrához való szelektív kötődésre. A ligandszenzitivitás strukturális determinánsainak részletes vizsgálata különösen azon megfigyelések fényében kecsegtet értékes eredményekkel, melyek szerint a Vav1 C1 doménjának ligandkötő zsebe a DH domén azon (fent említett) α -hélixének a közvetlen szomszédságában helyezkedik el, amely az enzimaktivitás szempontjából meghatározó intermolekuláris kapcsolatokat kialakítja a Rac1 switch II régiójával. Ezek alapján felmerül, hogy a ligandkötődés esetleg azzal a következménnyel is járhat, hogy ezen szoros intermolekuláris kapcsolatok felbomlanak, így a Vav1 enzimatis aktivitása lecsökken. Vajon elképzelhető lenne, hogy

egyres DAG/forbol-észter-származékok megfelelő affinitással kötődjenek a Vav1 C1 kötőhelyére és ezáltal befolyásolják annak enzimikus funkcióját? A Vav1 molekula immunológiai folyamatokban betöltött fiziológias szabályozó funkciójának, valamint egyes malignomák esetében felmerülő lehetséges patogenetikai szerepének ismeretében, az enzimaktivitás befolyásolásának új, potenciális lehetőségei közvetlen farmakoterápiás haszonnal kecsegtetnek a gyógyítás olyan területein, mint például az immunszuppresszív kezelés, valamint a daganatellenes terápia.

CÉLKITŰZÉSEK

Az epidermist alkotó keratinocyták esetében nagyszámú adat támasztja alá az egyik legjelentősebb (és sokáig egyedülállónak tartott) DAG effektor molekulacsalád, a PKC enzimrendszer meghatározó szerepét a sejtek alapvető biológiai funkcióinak szabályozásában; a folyamatok részletes megismeréséhez többek között laboratóriumaink korábbi kísérletes eredményei is hozzájárultak [20,50,52,63,68,74]. Jelen kísérleteink első felében azt a célt tűztük magunk elé, hogy feltérképezzük a PKC rendszer szerepét a faggyúmirigyek funkcióját meghatározó jelátviteli folyamatok szabályozásában, amelyről korábbi irodalmi adatok nem álltak rendelkezésre. A normál humán faggyúmirigy sejtjeinek jó modelljéül szolgáló [126], immortalizált SZ95 sebocyta sejtvonallal felhasználásával az alábbi specifikus kérdésekre kerestük a választ ezen kísérletsorozatunk során:

1. Milyen protein kináz C izoenzimeket expresszálnak a humán SZ95 sebocyták?
2. A PKC rendszer farmakológiai befolyásolásával sikerül-e kimutatnunk a PKC rendszer funkcionális szerepét az SZ95 sebocyták olyan alapvető sejtfolymatainak szabályozásában, mint a sejtek proliferációja, differenciálódása (lipidtermelés), illetve a sejtek életképességét meghatározó apoptotikus és nekrotikus folyamatok?
3. Molekuláris biológiai módszerek (szelektív géncsendesítés) segítségével azonosíthatók-e az enzimcsalád egyes tagjainak izoforma-specifikus funkciói?
4. A faggyúmirigyek esetében fontos patogenetikai faktornak tartott, gyulladáshoz vezető prekursor molekula, az AA által kiváltott sejthatások szignáltranszdukciós útvonalában vajon szerepet játszhatnak-e a PKC enzimcsalád egyes tagjai?

Laboratóriumaink másik fontos érdeklődési területe a PKC rendszer és az újonnan azonosított egyéb DAG effektor proteinek (PKD, RasGRP, MRCK) C1 doménon keresztüli szelektív farmakológiai befolyásolásának vizsgálata; valamint új, potenciális DAG targetként működő jelátviteli fehérjék azonosítása és jellemzése [24,163]. Ezen vizsgálatsorozatokhoz kapcsolódva, jelen kísérleteink második felében az volt a célunk, hogy tanulmányozzuk az immunsejtekben sokoldalú szabályozó funkcióval bíró, GEF molekulaként a citoskeleton átépülésében központi szerepet játszó Vav1 molekula [133] DAG/forbol-észterek iránti szenzitivitásának lehetőségét. Az *in vitro* ligandkötődési vizsgálatok, a rekombináns géntechnológia (molekuláris klónozás, irányított mutagenézis), valamint a számítógépes

molekulamodellés eszköztárainak számos elemét felhasználva az alábbi kérdésekre kerestünk magyarázatot:

1. A Vav1 molekula rekombináns technológiával létrehozott, izolált C1 doménje adott körülmények között rendelkezik-e kimutatható DAG/forbol-észter szenzitivitással?
2. Számítógépes molekulamodellek segítségével megállapítható-e, hogy milyen strukturális determinánsok állhatnak a Vav1 C1 domén csökkent/hiányzó ligandszenzitivitásának hátterében?
3. Irányított mutagenézis segítségével pontosan beazonosíthatók-e a ligandkötőhely közelében található mindazon aminosavak, amelyek felelősek lehetnek a Vav C1 csökkent/hiányzó ligandaffinitásáért?
4. A receptor struktúra csökkent/hiányzó ligandkötéséért felelős molekuláris faktorok figyelembevételével lehetséges-e olyan új, szintetikus DAG analógok kifejlesztése, amelyek képesek lehetnek nagy affinitással kötődni az ezen aminosavak jelenléte által meghatározott ligandkötőhelyre, ezáltal Vav1 C1 domén-szelektív ligandként funkcionálva?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Felhasznált anyagok

Az SZ95 sebocytákon végzett farmakológiai kísérletek során, a PKC rendszer funkcionális vizsgálatához az alábbi farmakonokat használtuk fel: a PKC aktivátor forbol-12-mirisztát-13-acetátot (PMA), az általános PKC inhibitor GF109203X-et (GF) (mindkettő Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), a „klasszikus” csoport (cPKC α , β , γ) specifikus gátlószereként alkalmazott Gö6976-ot (Gö), valamint a „novel” csoport δ izoformájának (nPKC δ) szelektív inhibitorát, a Rottlerint (utóbbi kettő: Calbiochem; Nottingham, Egyesült Királyság). Ezen farmakológiai vizsgálatok során alkalmazott arachidonsav (AA) szintén a Sigma-Aldrich-től származott.

A LNCaP sejtek felhasználásával elvégzett transzlokációs kísérletek során használt PMA az LC Laboratories-től (Woburn, MA, USA) származott. A ligandkötődés vizsgálata során használt jelöletlen forbol-12,13-dibutirátot (PDBu) az LC Laboratories-től, a radioaktív trícium izotóppal jelzett PDBu-t ([20-³H]PDBu) pedig a Perkin Elmer Life Sciences-től (Waltham, MA, USA) szereztük be. A foszfatidil-L-szerint (PS) és a foszfatidil-kolint (PC) az Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) biztosította számunkra. A baktériumtenyésztéshez használt anyagok (LB Broth médium, különféle szelektációs antibiotikumot tartalmazó LB agar táptalajok, stb.) a K-D Medical, Inc.-től (Columbia, MD, USA) származtak. A PCR-klónozás, a szekvenenciaanalízis, valamint az irányított mutagenézis során felhasznált oligonukleotid primereket a Life Technologies-től (Grand Island, NY, USA) szereztük be.

A Western immunoblot és az immuncitokémia során poliklonális, nyúlban termeltetett elsődleges antitesteket használtunk. A cPKC α , β I, β II, γ ; az nPKC ϵ , η ; az aPKC ζ , és a PKD-PKC μ izoformák elleni antitestek a Sigma-Aldrich-től származtak. Az nPKC δ és θ , valamint az aPKC λ / τ elleni specifikus antitesteket a Santa Cruz Biotech-től (Santa Cruz, CA, USA) szereztük be. Laboratóriumunk korábbi vizsgálataiban során valamennyi antitest specifikusnak bizonyult az adott PKC izoformát illetően [31,32]. A PKC-ellenes antitestek specificitásának kimutatásához ezenfelül izoforma-specifikus blokkoló peptidekkel (Sigma-Aldrich és Santa Cruz) történő előinkubációt használtunk, amely minden esetben megakadályozta az immunfestődést (adat nincs feltüntetve). Mindemellett, az egyes PKC izoformák expressziós szintjének kvantitatív meghatározása során belső kontrollként a háztartási géntermék,

citokróm-C fehérje kifejeződési szintjét is meghatároztuk Western blot segítségével, nyúlban termeltetett, poliklonális citokróm-C ellenes (Santa Cruz) antitest felhasználásával.

Sejtenyésztés

A humán faggyúmirigyből származó SZ95 sejteket Sebomed Basal Medium-ban (Biochrom, Berlin, Németország) tenyésztettük, amelyet 10%, hővel inaktivált embrionális borjú szérummal (FBS) (Life Technologies), 1 mM CaCl₂-dal, 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktoral (Sigma-Aldrich), valamint 50 IU/ml penicillinnel és 50 µg/ml streptomycinnel (mindkettő Teva, Debrecen, Magyarország) egészítettük ki. A tenyésztést 5% CO₂ tartalmú légtérben, 37 °C-on végeztük. A tápoldatot kétnaponta lecseréltük, és a sejteket a 80-90%-os konfluencia szint (szubkonfluens állapot) elérésekor passzáltuk (megelőzve ezáltal terminális differenciálódásukat).

A transzlokációs kísérletekhez humán prosztata adenocarcinómából származó LNCaP sejtvonalat használtunk, amelyet az American Type Culture Collection-től (ATCC; Manassas, VA, USA) szereztünk be. A sejteket 10% FBS-sel és 2 mM L-glutaminnal kiegészített RPMI-1640 médiumban tenyésztettük (mind ATCC), 5% CO₂ tartalmú légtérben, 37°C-on. A LNCaP sejtek passzálása és tápoldataik cseréje a sebocyták esetében említett elvek szerint történt.

Western immunoblot

A sejtenyészetet jéghideg foszfát-pufferben (PBS) mostuk, lízis pufferben (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM EGTA és proteáz inhibitor keverék 1:100 arányú hígításban; mind a Sigma-Aldrichtól) homogenizáltuk, majd jégen ultrahangos feltárást (szonikálást) végeztünk. A lizátumok proteintartalmának meghatározása módosított BCA protein assay segítségével történt (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA). A protein koncentrációk ismeretében összeállítottuk a mintáinkat, majd nátrium-dodecil-szulfát (SDS) mintapufferben (10% glicerin, 2% SDS, 62 mM Tris, 20 mM ditiotreitól, 0,002% brómfenolkék és 5% β-merkaptóetanol; mind Sigma-Aldrich) 10 percig főzve 100°C-on denaturáltuk azok fehérjetartalmát. Az így elkészített mintákból azonos mennyiségeket felhasználva SDS poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) [164] végeztünk, 100 V konstans feszültségen. A gélelektroforézishez 10%-os gélt készítettünk, amelyre 30-50 µg protein/vályú mennyiségben vittük fel mintáinkat. Ezután a gélben lévő proteineket nitrocellulóz membránra transzferáltuk (Whatman, Maidstone, Egyesült Királyság) 100 V konstans

feszültségen, majd a membrán szabad kötőhelyeit 5% zsírtmentes tejporthoz tartozó PBS-sel 30 percig blokkoltuk. Ezután a felvitt molekulahúly-indikátor alapján a membránokat a 40 kDa alatti sávban a futási irányra merőlegesen két részre választottuk. A 40 kDa feletti tartomány membránrészletét ezután a fent említett PKC-ellenes elsődleges antitestekkel inkubáltuk 5%-os tejporthoz tartozó PBS-ben (hígítás:1:100-1:1000), egy éjszakán át 4°C-os hőmérsékleten. A 40 kDa alatti proteineket tartalmazó membránszakaszt pedig a fent említett citokróm-C ellenes antitesttel jelöltük meg (hígítás:1:50), a PKC antitestek esetében használt módszer szerint. Az inkubáció után a membránokat 30 percig PBST (0.1% Tween-20 tartalmú PBS oldat; Sigma-Aldrich) oldatban mostuk, majd kecskében termeltetett, torma-peroxidázzal (HRP) konjugált, nyúl immunoglobulin Fc-szakasza elleni másodlagos antitesttel (Bio-Rad, Life Science, Hercules, CA, USA) 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk őket (hígítás: 1:1000, 5% tejporthoz tartozó PBS oldatban). Újabb 3 x 15 perc PBST-ben történő mosás után az immunjeleket kemilumineszcens SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével tettük láthatóvá, LAS-3000 Intelligent Dark Box (Fujifilm, Tokió, Japán) készülék felhasználásával. A kapott immunjелеk szemikvantitatív denzitometriás analízisét Image Pro Plus 4.5.0 szoftver (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) felhasználásával végeztük. A PKC-specifikus immunjелеk intenzitását az azonos kísérletben meghatározott citokróm-C jelintenzitás értékére normalizáltuk, majd a kontroll (kezeletlen, illetve nem-transzfektált sejtekből származó minták PKC expressziója) százalékában kifejezve számszerűsítettük.

A PKC rendszer vizsgálata immuncitokémia és konfokális mikroszkópia segítségével

Az egyes PKC izoenzimek expresszióját immuncitokémia segítségével vizsgáltuk az SZ95 sebocytákban. Az izoenzimek szubcelluláris lokalizációját immunfestést követő konfokális mikroszkópiával detektáltuk a megfelelő farmakológiai kezelések után. Az SZ95 sebocytákat 24-lyukú tenyésztőedényekben, steril fedőlemezekre szélesztettük és 60-70%-os konfluencia eléréséig tenyésztettük őket. (Az egyes izoformák szubcelluláris lokalizációjának vizsgálata során a következő lépés előtt elvégeztük a megfelelő farmakológiai kezeléseket (PMA és AA kezelése; lásd 9. ábra), míg az expressziós vizsgálatok előtt ilyen kezeléseket természetesen nem történtek; lásd 5. ábra). Ezután a sejteket (többszöri PBS-sel történő mosást követően) 5 percig 4°C -os acetonnal fixáltuk, majd 0,1%-os, PBS-ben oldott Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) oldattal permeabilizáltuk 10 percig. Ezután ismét PBS-sel mostuk sejteinket, majd 30 percre 1%-os BSA oldattal (Sigma-Aldrich) blokkoltuk az aspecifikus

kötőhelyeket. A sejteket ezután 60 percig inkubáltuk 4°C-on a megfelelő PKC-izoforma-ellenes, nyúlban termeltetett, elsődleges antitesttel (hígítás: 1:100-1:200, blokkoló oldatban). Ezután a fedőlemezeket háromszor mostuk PBS-sel, majd a mintákat 1 órán keresztül inkubáltuk kecskében termeltetett, fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált, nyúl immunglobulin Fc-szakasza elleni másodlagos antitesttel (37°C, hígítás: 1:200 PBS-ben; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Végül PBS-sel történő háromszori mosás után Vectashield fedőmédiummal (Vector Laboratories) fedtük le őket. Az így feldolgozott sejtpopulációkról Nikon Eclipse E600 típusú fluoreszcens mikroszkóp (expressziós vizsgálatok; Nikon, Tokió, Japán), illetve Zeiss Laser Scanning konfokális mikroszkóp (lokalizációs vizsgálatok; Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Németország) segítségével felvételeket készítettünk.

Kvantitatív „real-time” PCR (Q-PCR)

A kvantitatív-polimeráz lánreakciót az ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével, 5' nukleáz assay használatával végeztük. A sejtek teljes RNS tartalmát TRIzol (Life Technologies) felhasználásával izoláltuk, a gyártó protokolljának megfelelően. A teljes RNS 3 µg-jából kiindulva 15 U AMV reverz transzkriptázt (Promega, Madison, WI, USA) és 0,025 µg/µl oligodT primert (Promega) felhasználva állítottunk elő cDNS-t. Az így előállított cDNS-ből kvantitatív „real-time” PCR segítségével mutattuk ki az egyes PKC izoenzimek specifikus transzkriptjeit. A PCR amplifikációs reakciót (a következő) TaqMan primerekkel és próbákkal végeztük (assay ID-k: Hs00176973_m1 a cPKC α , Hs00176998_m1 a cPKC β , Hs00177010_m1 a cPKC γ , Hs00178914_m1 az nPKC δ , Hs00178455_m1 az nPKC ϵ , Hs00178933_m1 az nPKC η , Hs00234709_m1 az nPKC θ , Hs00177051_m1 az aPKC ζ és Hs00702254_s1 az aPKC λ/ι esetében), a TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol-t követve (Applied Biosystems). Belső kontrollként a humán glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) transzkriptjének mennyiségét határoztuk meg (assay ID: Hs99999905_m1), majd az egyes PKC izoenzimek relatív génexpresszióját a GAPDH-ra vonatkoztatva adtuk meg.

Az intracelluláris lipidtartalom meghatározása

A sebocyták lipidtartalmának szemikvantitatív vizsgálatához a sejteket Oil-Red O festésnek vetettük alá (Fluka/Sigma-Aldrich). A sejteket üveg fedőlemezen tenyésztettük és a megfelelő farmakonokkal adott ideig kezeltük őket. Ezután a fedőlemezeket kétszer mostuk

PBS-sel, majd a sejteket 4%-os paraformaldehiddel (Sigma-Aldrich) fixáltuk, 1 órán keresztül. Ezt követően újabb két mosás következett PBS-sel, majd egy mosás 60%-os izopropanollal (Spektrum-3D, Debrecen, Magyarország), amit a frissen készített 0,3% Oil-Red O oldattal (60%-os izopropanolban oldva) történő festés követett (20 perc, 37°C-on). Végül, újabb PBS-sel történő mosás után, a sejtmagokat Mayer-féle hematoxilinnal (Sigma-Aldrich) tettük láthatóvá. Az így megfestett sejteket vizes bázisú beágyazó médiummal (Dako, Glostrup, Dánia) fedtük, majd fénymikroszkóppal vizsgáltuk [118].

A sebocyták lipidtartalmának kvantitatív vizsgálatához fluoreszcens Nile Red (Sigma-Aldrich) jelölést alkalmaztunk. A sejteket egy speciális, fluorimetriás mérésekhez használatos („black-well/cear bottom”) 96-lyukú lemezre (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Németország) szélesztettük, 15.000 sejt/lyuk denzitásban, majd elvégeztük a megfelelő kezeléseket. A felülúszó eltávolítása után 100 µl PBS-ben oldott Nile Red oldatot (Sigma-Aldrich) mértünk a sejtekre 1 µg/ml végkoncentrációban, majd 20 percen keresztül 37°C-on inkubáltuk őket. Az egyes lyukak fluoreszcencia intenzitását FlexStation³⁸⁴ II *FLuorescence Image microPlate Reader* (FLIPR, Molecular Devices, San Francisco, CA USA) készülék segítségével detektáltuk. Kihhasználva, hogy a Nile Red emissziós spektruma kék irányba tolódik a lipidközeg polaritásának csökkenésével, a sebocyták citoplazmájában felhalmozódó, jórészt neutrális lipidekkel kitöltött vakuólumok elkülöníthetővé váltak a membránokat alkotó (döntő többségében) poláros lipidektől [165]. Az eltérő gerjesztési és detektálási hullámhosszok miatt (neutrális lipidek: excitáció 485 nm-en, emisszió 565 nm-en; poláros lipidek: excitáció 540 nm-en, emisszió 620 nm-en) lehetőségünk nyílt a kétféle lipidtartalom egymás melletti detektálására. Mivel a sebocyták terminális differenciációját jelző citoplazmatikus lipidakkumuláció során a sejtek neutrális lipideket halmoznak fel [166], ezen lipidek mérésével betekintést nyerhettünk a differenciálódás folyamatába; emellett a poláros lipideket mintegy belső kontrollként használhattuk, hiszen felhalmozódásuk leginkább a sejtszám növekedésével korrelált. (A poláros lipidek mérésének adatait ábráinkon nem tüntettük fel.) Minden kezelést 3-5-szörös ismétléssel végeztünk, a kapott intenzitásértékeket pedig átlag ± SEM formában a kontrollhoz viszonyított relatív fluoreszcencia egységek (RFU) százalékában adtuk meg.

Az élősejt-szám meghatározása

A sejtek növekedésének vizsgálatához kolorimetriás MTT-assay-t (Sigma-Aldrich) alkalmaztunk. A módszer lényege, hogy a sárga színű metilthiazol-tetrazólium (MTT) (3-

{4,5-dimetilthiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazólium bromid), az élő sejtek mitokondriumaiban elhelyezkedő mitokondriális dehidrogenázok hatására, lila színű formazán kristállyá alakul át, mert az enzimek hasítják a kiindulási vegyületben található tetrazólium gyűrűt. Az SZ95 sejteket 96-lyukú lemezekben szélesztettük 15.000 sejt/lyuk denzitásban, majd a megfelelő farmakonok különböző koncentrációival kezeltük őket meghatározott ideig. Ezt követően, a tenyésztő oldat eltávolítása után, minden lyukba 100 µl, 0,5 mg/ml végkoncentrációjú MTT oldatot pipettáztunk (szérummentes Sebomed Basal Mediumban feloldva), majd 37°C-on 3 órán át inkubáltuk a sejteket. Ezután az MTT oldatot eltávolítottuk és minden lyukhoz 100 µl „MTT szolubilizáló oldatot” (81 v/v% 2-propanol, 9 v/v% 1 M HCl, 10 v/v% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)) adtunk, majd tíz percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket, közepesen intenzív rázatás mellett. A sejtekben keletkező formazán kristályokat ezen eljárás segítségével feloldottuk, koncentrációjukat pedig kolorimetriás úton határoztuk meg, 550 nm-en. A mért abszorbancia az élő sejtek számával korrelál. Minden kezelést 3-5-szörös ismétléssel végeztünk, az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg és a kontroll (nem kezelt sejtpopuláció) százalékában fejeztük ki.

Az apoptotikus folyamatok vizsgálata

A mitokondriális membránpotenciál-csökkenés detektálása a korai apoptotikus folyamatok kimutatásának egyik szenzitív módszere [167,168]. Kísérleteinkben ezért, a különböző farmakonokkal történő kezeléseket után, elvégeztük az SZ95 sejtek mitokondriális membránpotenciáljának fluorimetriás mérését a MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit (Molecular Probes/Life Technologies) segítségével. A kísérlet során alkalmazott festék a mitokondriális membránpotenciál nagyságának függvényében akumulálódik a sejtek mitokondriumaiban, ezért a korai apoptotikus jeleket mutató (csökkent mitokondriális membránpotenciállal rendelkező) sejtekben csökkent fluoreszcencia intenzitást detektálhatunk. A sebocytákat 15.000 sejt/lyuk denzitásban szélesztettük, a Nile Red meghatározás során már említett, („black-well/clear-bottom”) 96-lyukú lemezekre (Greiner Bio-One), majd az egyes farmakonok különböző koncentrációival adott ideig kezeltük őket. A felülúszó eltávolítása után a sejteket 30 percig inkubáltuk szérummentes tápoldatban 1:200-ra hígított DiIC₁(5) munkareagenssel (50 µl/lyuk) 37°C-on, a gyártó által megadott protokoll szerint. Ezt követően PBS-sel kétszer mostuk őket. A fluoreszcencia-intenzitást 630 nm-es hullámhosszon gerjesztve és 670 nm-en detektálva mértük, FlexStation 384 II FLIPR (Molecular Devices) segítségével. A pozitív kontrollként használt sejteket közvetlenül a

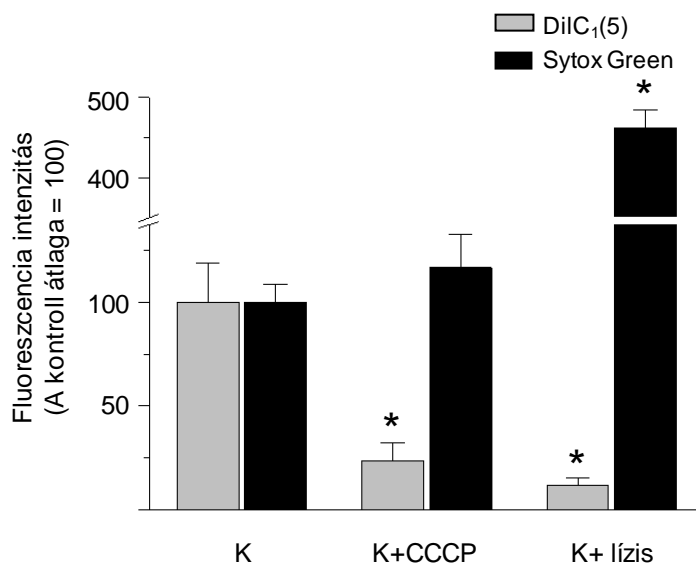
mérés előtt 10 percig 50 μ M végkoncentrációjú karbonilcianid-3-klorofenil-hidrazon (CCCP) oldatban inkubáltuk, amely anyag szelektíven csökkenti a sejtek mitokondriális membránpotenciálját. Minden kezelést 3-5-szörös ismétléssel végeztünk; a relatív fluoreszcencia intenzitást a nem kezelt kontroll százalékában, átlag \pm SEM formában adtuk meg.

A citotoxicitás/sejtnekrózis vizsgálata

Az alkalmazott farmakonok citotoxicitásának vizsgálatát fluoreszcens SYTOX Green (Life Technologies) jelöléssel végeztük. A nagyméretű fluoreszcens festékmolekulák csak a sérült és dezintegrálódott plazma-, illetve magmembránon keresztül képesek bejutni a sejtmagba, ahol azután a duplaszálú DNS-hez kötődnek. Az ép sejtmembránnal rendelkező sejtek esetében viszont a festék nem képes a sejtmagba bejutni. Mindez tehát azt jelenti, hogy a nekrotikus sejtek esetében magas fluoreszcencia intenzitást detektálhatunk, míg az ép sejtmembránnal rendelkező sejtek esetében ez az érték alacsonynak adódik. A sebocytákat 96-lyukú („black-well/clear-bottom”) lemezekre (Greiner Bio-One) raktuk ki 15.000 sejt/lyuk denzitásban, majd a megfelelő farmakonok különböző koncentrációival adott ideig kezeltük őket. A kezeléseket végeztével a felülúszót eltávolítottuk, majd a sejteket szérummentes tápoldatban hígított SYTOX Green (Life Technologies) reagenssel (végkoncentráció 1 μ M) 30 percig inkubáltuk 37°C-os hőmérsékleten (50 μ l/lyuk). Az inkubációt követően a sejteket kétszer mostuk CMF PBS-sel, majd FlexStation 384 II (Molecular Devices) spektrofluorométerrel detektáltuk a fluoreszcencia intenzitást, 490 nm gerjesztési és 520 nm emissziós hullámhossz mellett. Pozitív kontrollként lízis pufferben inkubált sejtpopulációt használtunk. Minden kezelést 3-5-szörös ismétléssel végeztünk; a relatív fluoreszcencia intenzitást a nem kezelt kontroll százalékában, átlag \pm SEM formában, adtuk meg.

A sejtnekrózis indikátoraként szolgáló SYTOX Green festék, és az apoptózis vizsgálatához használt DiIC₁(5) festék eltérő gerjesztési és detektálási spektrumának köszönhetően (valamint a fluoreszcens jelölési protokollok nagyfokú hasonlósága következtében), az apoptotikus folyamatokat, illetve a sejtnekrózist lehetőségünk nyílt ugyanabban a mintában megvizsgálni, a két jelölő molekulát egyszerre adva a munkaoldatunkhoz. Kísérleteink kezdetén összehasonlító vizsgálatokat végeztünk, melyekben egyértelműen bebizonyosodott, hogy a fluoreszcens festékek egyidőben történő használata semmilyen különbséget sem okoz a csak egyetlen festéket tartalmazó munkaoldattal elvégzett mérésekhez képest (adatok nincsenek feltüntetve). További

kísérleteink során tehát a SYTOX-Green, illetve DiIC₁(5) jelölést egyszerre végeztük. A 4. ábrán látható, hogy az apoptózis vizsgálata során pozitív kontrollként alkalmazott CCCP anyag (ld. fent) lecsökkenti a sejtek mitokondriális membránpotenciálját (a DiIC₁(5) mitokondriális akkumulációjának csökkenése; szürke oszlop), azonban nem okozott nekrozist (a SYTOX-Green felvétel a kontroll szinten maradt; fekete oszlop). A sejtek lizáló oldatban való inkubálása ugyanakkor nagymértékben megemeli a SYTOX-Green bejutását a sérült sejtekbe, a ruptúrált membránokon keresztül (valamint lecsökkenti a mitokondriális membránpotenciált is, hiszen a kezelés következtében a mitokondrium membránja is sérül). Az apoptózis és a sejtnekrózis vizsgálatára irányuló kísérletek során minden esetben elvégeztük ezen, pozitív kontrollként szolgáló kezeléseket is (CCCP, illetve lízis); a jobb átláthatóság kedvéért a további ábrákon ezen kontroll eredményeket nem tüntettük fel.



4. ábra: Az apoptotikus folyamatok és a sejtnekrózis fluorimetriás vizsgálata párhuzamosan végzett DiIC₁(5) és SYTOX Green jelöléssel.

A mitokondriális membránpotenciál változását (apoptózis) DiIC₁(5) jelöléssel követtük nyomon (szürke oszlopok). Pozitív kontrollként CCCP-vel (karbonilcianid-3-klorofenil-hidrazon) inkubált sejteket használtunk. A nekrózis vizsgálatához SYTOX-Green jelölést (fekete oszlopok) alkalmaztunk, pozitív kontrollként lizált sejtpopulációt felhasználva. N=4, *p<0,05.

RNS interferencia (RNSi)

Az SZ95 sejteket 6-lyukú tenyésztőedényekben szélesztettük és antibiotikum-mentes Sebomed tápoldatban (kiegészítve a „Sejtenyésztés” alfejezetben említett egyéb anyagokkal) 40-60%-os konfluencia eléréséig tenyésztettük őket. A tápoldatot ezután szérumentes OptiMEM médiumra (Life Technologies) cseréltük, majd az egyes sejtpopulációkat 40 nM humán cPKC α -, nPKC δ - és aPKC ζ -specifikus, duplaszálú kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal transzfektáltuk (Santa Cruz, azonosító kódok: cPKC α : sc-44227, nPKC δ : sc-36253 és aPKC ζ : sc-29451), Lipofectamin RNAiMAX (Life Technologies) transzfekciós reagens felhasználásával. Negatív kontrollként a sejteket Santa Cruz Control

siRNA-A (sc-37007) és siRNA-B (sc-44230) duplaszálú siRNS-sel transzfektáltuk, amelyek semmilyen ismert mRNS szekvenciával nem mutatnak homológiát (scrambled siRNS). A szelektív géncsendesítésnek az adott PKC izoforma expressziójára kifejtett hatását Western blot segítségével naponta ellenőriztük, a transzfekciót követő 4 napon át. A lipidszintézisére, a sejtnövekedésre, valamint az apoptotikus és citotoxikus folyamatok vizsgálatára irányuló kísérleteink során a transzfekción átesett SZ95 sejteket 24 órával a beavatkozás után feltripszinezttük, és 96-lyukú tenyésztőedényekben újraszélesztettük őket. Ezután elvégeztük a fent említett végpontokra irányuló vizsgálatainkat.

GST-fúziós C1 domének létrehozása

A PKC δ C1b domén szekvenciáját tartalmazó rekombináns, bakteriális expressziós vektort (továbbiakban PKC δ -C1b-GST) laboratóriumunk korábbi kísérletei során hoztuk létre [163], egy a glutation-S-transzferázt (GST) N-terminális fúziós proteinként kódoló plazmid, a pGEX-5X-1 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) felhasználásával. A jelen kísérletek során létrehozott, a Vav1 C1 domént N-terminális GST fúziós proteinként expresszáló rekombináns vektor (továbbiakban Vav1-C1-GST) megalkotása ehhez teljesen hasonló elvek alapján történt. Elsőként a teljes Vav1 proteint kódoló cDNS szekvenciát (Origene, Rockville, MD, USA) templátként felhasználva elvégeztük a Vav1 C1 doménját kódoló szakasz PCR amplifikációját, a Platinum PCR Supermix High Fidelity (Life Technologies) Kit segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően. A következő oligonukleotid primereket használtuk a PCR reakció során: forward primer: 5'-CGGAATTCAATGCTACAGCCAATGGGC-3', reverse primer: 5'-CGGAATTCGAAATCTTGCCCATGGCG-3'. A reakció során keletkezett, specifikus DNS szakaszokat QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) segítségével megtisztítottuk, majd ezután EcoRI (New England BioLabs Inc., Beverly, MA, USA) restrikciós endonuklázal hasítottuk őket. Ezáltal a restrikciós enzim specifikus felismerőhelyeinek megfelelően (amelyet előzőleg a primerek szekvenciájába is beklónoztunk) tapadó végeket hoztunk létre a Vav1 C1 domént kódoló szakasz mindkét oldalán. Ezután az „üres” (rekombináns proteint kódoló szakaszt nem tartalmazó) pGEX-5X-1 vektort is alávetettük az EcoRI-gyel történő hasításnak, végül pedig, egy újabb tisztítási lépés után (ismét a QIAquick PCR Purification Kit felhasználásával), elvégeztük a két lineáris DNS fragmentum kovalens összekapcsolását (ligáció). Az így létrehozott rekombináns DNS (Vav1-C1-GST) szekvenciájának ellenőrzése a DNA Minicore

laboratóriumában (Center for Cancer Research, NCI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) történt, DNS szekvenálás segítségével. A kapott nyers szekvenciaadatok feldolgozását és ellenőrzését a következő szoftverek segítségével végeztük el: BioEdit Sequence Alignment Editor V7.0.5 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) és DNA Baser Sequence Assembler V2.91 (Heracle BioSoft S.R.L., Pitesti, Románia).

Irányított mutagenézis (site-directed mutagenesis)

A PKC δ C1b domént, illetve a Vav1 C1 domént kódoló DNS szakaszokon, a megfelelő lokalizációkban pontmutációkat hoztunk létre, a GeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System (Life Technologies) segítségével, a gyártó által javasolt protokollt követve. Az így létrehozott pontmutációk mindkét C1 domén esetében a 9-es, a 10-es, a 11-es, a 22-es, a 24-es és 26-os aminosavakat érintették. (Az itt alkalmazott számozás nomenklatúrája az izolált C1 domén aminosavszekvenciáját veszi alapul és nem a teljes fehérjére vonatkozik. Bővebb magyarázatot lásd a Disszertáció „Eredmények” fejezetének a Vav1 C1 összehasonlító szekvenciaanalízisét tárgyaló részében.) A C1 domén mutánsok megalkotásánál az előző részben említett rekombináns, vad típusú GST-fúziós C1 doménekből indultunk ki (pGEX-5X-1 expressziós vektorba klónozott PKC δ -C1-GST, illetve Vav1-C1-GST). A fent említett pozíciókban megváltozott aminosavszekvenciával bíró egyszeres mutánsokon kívül többszörös mutánsokat is létrehozunk, melyek ezen mutáns szekvenciák különböző kombinációit tartalmazták. A dupla- és tripla mutánsok megalkotása (a vad típusú konstruktokból kiindulva) egy lépésben történt, míg a négyszeres és ötszörös mutánsok létrehozása (a korábbi lépésben megalkotott tripla mutánsokból kiindulva) egy további mutációs lépést foglalt magába. A létrehozott C1 domén mutánsok szekvenciáját a DNA Minicore laboratóriumában analizálták, és a kapott szekvenciaadatok helyességét az előző részben említett szoftverekkel (Bioedit, DNABaser; Ibis Biosciences és Heracle BioSoft S.R.L.) ellenőriztük.

GFP-fúziós C1 domének létrehozása

Az intracelluláris transzlokációs vizsgálatok elvégzéséhez a PKC δ C1b domént és a Vav1 C1 domént zöld fluorszcens fehérjével (green fluorescent protein, továbbiakban GFP) jelöltük meg, ezáltal létrehozva a következő fúziós proteineket: PKC δ -C1b-GFP és Vav1-C1-GFP (mind a vad típusú, mind pedig a mutáns C1 domének esetében). Az előző részekben

említett (a korábbi lépésekben létrehozott) GST-fúziós proteinek (PKC δ -C1-GST és Vav1-C1-GST) kódoló szekvenciáit tartalmazó rekombináns bakteriális expressziós vektorokat (pGEX-5X-1 plazmid) EcoRI restrikciós endonukleáz (New England Biolabs) kezelésnek vetettük alá, miáltal az adott C1 doménnek megfelelő cDNS szakaszok kihalászásra kerültek a pGEX-5X-1 vektorból. Az ily módon keletkezett DNS fragmentumokat QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) segítségével megtisztítottuk. Végül a C1 doméneket kódoló DNS fragmentumokat, az EcoRI-lyel hasonló módon előkezelt (és ezáltal EcoRI-specifikus tapadós végeket tartalmazó, linearizált) pEGFP-C2 (Clontech, Mountain View, CA) eukarióta expressziós vektorhoz ligáltuk, amely a GFP szekvenciát C-terminális fúziós „tag”-ként kódolja. (Az eredeti pGEX-5X-1 vektorba történő „visszaligálás” megelőzésére azt a tényt használtuk ki, hogy a két expressziós vektor eltérő antibiotikum-rezisztenciagént kódol.) Az így előállított rekombináns expressziós vektorok szekvenciájának helyességét a korábban említett módon ellenőriztük (DNA Minicore általi szekvenálás, valamint Bioedit/DNABaser szoftverekkel történő ellenőrzés (Ibis Biosciences/Heracle BioSoft S.R.L.)).

A teljes Vav1 molekula GFP-fúziós formájának létrehozása (vad típus, tripla mutáns, ötszörös mutáns)

Az izolált Vav1 C1 domének ligandaffinitásának vizsgálata után a teljes nagyságú Vav1 protein ligandkötő sajátosságait is vizsgálni kívántuk. Az izolált Vav1 C1 doménnel ellentétben, a teljes Vav1 fehérjét, a fehérjetisztítás korlátai miatt, nem állt módunkban tisztított formában előállítani, így radioaktív ligandkötési vizsgálatok elvégzésére nem nyílt lehetőség. Ugyanakkor, a ligandkötést közvetetten vizsgáló intracelluláris transzlokációs kísérletek a teljes Vav1 esetében is kivitelezhetők voltak (annak ellenére, hogy a teljes molekula expressziós szintje nem érte el az izolált C1 domén expressziós szintjét). A GFP-vel jelölt fúziós Vav1 protein (továbbiakban Vav1-GFP) vad típusának klónozása a pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit (Life Technologies) segítségével történt, a gyártó által meghatározott elveknek megfelelően. Templátként a teljes Vav1 proteint kódoló cDNS szekvenciát (Origene) használtuk és a Platinum® PCR SuperMix High Fidelity Kit (Life Technologies) segítségével végeztük el ezen szekvencia PCR amplifikációját. A PCR reakció során az alábbi oligonukleotid primereket alkalmaztuk: forward primer 5'-CACCGAGCTCTGGCGACAGTGC-3', reverse primer: 5'-TCAGCAATATTCGGAATAGTCTTCC-3'. Az így „felamplifikált lineáris, kettős szálú, tompa végű DNS szakaszt, a módszer alapjául szolgáló TOPO reakció [169] felhasználásával

közvetlenül (azaz endonuklázal való hasítás nélkül) a pENTR/D-TOPO jelölésű vektorba juttattuk, amely ún. „Entry”-vektorként (köztes vektor) funkcionált a következő lépéseknél. (Ezen klón Vav1-Entry-ként kerül megemlítésre a továbbiakban.) Ezután, kihasználva az Invitrogen által kifejlesztett Gateway módszerben rejlő lehetőségeket [170], az LR rekombinációs reakció segítségével ezen Vav1-et kódoló DNS szakaszt a fent említett Entry vektorból egy lépésben a pcDNA-DEST53 jelölésű (Life Technologies) Gateway „Destination” vektorba (célvektor) juttattuk. Ez az eukarióta expressziós vektor tartalmazza a GFP fehérje kódoló szekvenciáját, amely N-terminális fúziós „tag”-ként kerül kifejeződésre a sejtekben, a Vav1 proteinhez kapcsoltn. A teljes Vav1 protein tripla- (Vav1 E9M/E10S/T11P), illetve ötszörös mutáns (Vav1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) változatai, a C1 doméneknél leírt irányított mutagenézishez teljesen hasonló módon, a GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System (Life Technologies) segítségével kerültek megalkotásra. A mutagenézis kiindulópontjául ebben az esetben a vad típusú (teljes) Vav1 szekvenciát tartalmazó Vav1-Entry klón szolgált; a mutagenézishez használt oligonukleotid primerek pedig megegyeztek a Vav1 C1 domén tripla és ötszörös mutáns változatainak létrehozásánál alkalmazott primerekkel. Hasonlóan a C1 doménál alkalmazott stratégiához, elsőként a teljes Vav1 esetében is a tripla mutánst hoztuk létre egy lépésben, majd egy második lépésben az ötszörös mutáns megalkotása következett, amelynél templátként a tripla mutánst alkalmaztuk. Az így létrejött Vav1 E9M/E10S/T11P és Vav1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K mutánsok Entry klónjait (pENTR/D-TOPO vektorban), a vad típus (Vav1-Entry) esetében ismertetett Gateway LR rekombinációs módszer segítségével, egy lépésben a fent említett pcDNA-DEST53 expressziós vektorba juttattuk, miáltal ezen mutánsokat is lehetőségünk nyílt eukarióta sejtekben GFP-fúziós proteinként expresszálni. Az így létrehozott GFP-fúziós Vav1-et (vad típus és mutáns) tartalmazó vektorok szekvenciáinak helyességét szintén a már említett módon ellenőriztük (DNA Minicore általi szekvenálás, valamint Bioedit/DNABaser szoftverekkel történő ellenőrzés (Ibis Biosciences és Heracle BioSoft S.R.L)).

A GST-fúziós C1 domén fehérjefragmentumok termeltetése E.coli-ban; fehérjetisztítás

Az izolált PKC δ C1b domént, illetve a Vav1 C1 domént tartalmazó pGEX-5X-1 expressziós vektorokat kompetens *E.coli* baktériumokba (BL21-AI™ One Shot® Chemically Competent *E. coli*; Life Technologies) juttattuk transzformáció segítségével. A transzformált sejteket LB Broth Médiumban (K-D Medical) növesztettük 37°C-on, amíg a baktérium

szuszpenziónak optikai denzitása elérte a 0,6-0,8-as értéket. A GST-fúziós géntermékek kifejeződését ekkor a szuszpenzióhoz adott 0,3 mM izopropil-O-D-tiogalaktopiranozid és 0,125% L-arabinóz (mindkettő Sigma-Aldrich) hozzáadásával indukáltuk 4 órán keresztül 37°C-on. Ezután elvégeztük a bakteriális sejtek jégén történő ultrahangos feltárását egy speciális összetételű protein extrakciós reagensben (B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent), amelyet 50 mg/ml lizozimmal és 2,500 U/ml DNáz I-gyel egészítettünk ki (mind Thermo Fisher Scientific). A sejtekben termelt GST-fúziós peptideket a B-PER GST spin purification kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével tisztítottuk meg a gyártó utasításainak megfelelően. A fehérjetisztítás hatékonyságát SDS-PAGE segítségével ellenőriztük. A tisztított GST-fúziós proteinek koncentrációját Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Life Science) segítségével határoztuk meg. Tárolásuk -80 °C-on történt 30%-os glicerol oldatban.

A GFP-jelölt proteinek intracelluláris transzlokációja

LNCaP sejteket (öt és húsz közötti passzázs-számnál) 60,000 sejt/edény denzitásban szélesztettünk speciális Ibidi tenyésztőedényekre (Ibidi, LLC, Verona, WI), és 48 órán keresztül 37°C-on növesztettük őket, 10% FBS-sel és 2 mM L-glutaminnal kiegészített RPMI 1640 médiumban. Ezután a sejteket az adott GFP-jelölt rekombináns konstrukttal transzfektáltuk, Lipofectamine és Plus reagens felhasználásával (mindkettő Life Technologies), a gyártó által javasolt protokollt követve. A fluoreszcens fúziós proteineket expresszáló sejteket 24 óra elteltével vizsgáltuk Zeiss LSM 510 NLO konfokális mikroszkóp segítségével (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY). (A gerjesztés 488 nm-en történt 30 mW-os argon lézer segítségével, az emissziót pedig BP 500-530 nm filter segítségével detektáltuk). A GFP-jelölt proteineknek (PKC δ -C1b-GFP, Vav1-C1-GFP, Vav1-GFP, stb.) a PMA kezelés hatására bekövetkező intracelluláris transzlokációs folyamatait sorozatfelvételek segítségével követtük nyomon. Harminc percen keresztül fél percenként készítettünk felvételeket a Zeiss AIM szofver (Carl Zeiss, Inc.) segítségével, 63x-os olaj immerziós objektívet használva (1.4 NA Zeiss Plan-Apochromat; Carl Zeiss, Inc.).

A konfokális mikroszkópia kvantifikálása

Az LNCaP sejtekről készült konfokális felvételeken három, egyenként 4 μm^2 átmérőjű, területet választottunk ki; egyet a citoplazmában, egyet a sejtmembránban, egyet pedig a sejtmagban (lehetőség szerint kerülve az olyan területeket, amelyek szubcelluláris organellumokban – mint pl. Golgi vagy nukleólusz – gazdagok voltak). Ezután a sejtről

különböző időpontokban készített felvételeken, a Zeiss AIM szoftver (Carl Zeiss, Inc.) segítségével, meghatároztuk ezen dedikált területek átlagos fluoreszcencia intenzitását, amely az adott időpontban ide lokalizálódó GFP-jelölt proteinek mennyiségével volt arányos. Ezt követően pedig az egyes időpontokban meghatároztuk a sejtmembrán/citoplazma, illetve a sejtmag/(sejtmembrán + citoplazma) jelintenzitás-hányadost, amelyet a kezdőidőpontra (ligand hozzáadása előtti időpont) normálva adtunk meg. Amennyiben az egyes sorozatfelvételeken belül, a ligand hozzáadása után ezen sejtmembrán/citoplazma hányados emelkedett és/vagy a sejtmag/(sejtmembrán+citoplazma) hányados csökkent, úgy az a transzlokáció egyértelmű jele volt. Ezután minden egyes sorozatfelvétel esetében meghatároztuk a legnagyobb sejtmembrán/citoplazma és/vagy a legkisebb sejtmag/(sejtmembrán + citoplazma) hányadost, amely az adott sorozatfelvétel esetében a maximális transzlokációt adta meg. Az egyes GFP-jelölt proteinek meghatározott ligandkoncentráció hatására bekövetkező transzlokációjának mértékét az ugyanazon körülmények között készült sorozatfelvétel-replikátumok maximális transzlokációinak átlaga képviselte (amelyet átlag \pm SEM formában adtunk meg).

DAG laktonok kémiai szintézise

A Vav1 protein atípusos C1 doménjét célzó, specifikus DAG analóg ligandok (DAG laktonok) kémiai szintézisét teljes egészében Victor E. Marquez munkacsoportja végezte (Chemical Biology Laboratory, Molecular Discovery Program, Center for Cancer Research, NCI-Frederick, Frederick, MD, USA) a laboratóriumunkkal fennálló kooperáció keretében. A szintézis egyes lépéseinek részletes leírása, valamint az egyes molekulák vegytani karakterizálása az alábbi publikációkban található meg: *i*) DAG laktonok szintézisének alapelve: [171]; *ii*) a **6a**, **6c**, és a **8b-e** jelű DAG laktonok szintézise és kémiai karakterizálása: [172]; *iii*) a **6b**, **8a**, és **8f** jelű DAG laktonok szintézise és kémiai karakterizálása: [173]. A Disszertációban mindezek részletes ismertetésétől eltekintettem.

Radioktív ligandkötődés (^3H]PDBu-kötés) vizsgálata

Az egyes C1 domének (mutáns/vad típusú PKC δ C1b/Vav1 C1) forbol-észter-affinitását vizsgáló kísérletekben a tisztított protein fragmentumokat *in vitro* [^3H]PDBu-kötési vizsgálatoknak vetettük alá. Ennek során meghatároztuk az egyes C1 domének ligandaffinitásának nagyságát kifejező, az adott receptor-ligand (C1 domén- ^3H]PDBu) párosra jellemző disszociációs konstans (K_d) értékeket. A polietilén-glikol precipitáción

alapuló módszer a laboratóriumunkban került kifejlesztésre. A részletes, minden lépésre kiterjedő protokollt az alábbi metodikai publikáció tartalmazza: [174]. A módszer főbb elemei a következők: a vizsgálandó tisztított proteineket az alábbi anyagokat tartalmazó oldathoz adtuk hozzá: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 100 µg/ml foszfatidilszerin (Avanti Polar Lipids), 4 mg/ml marha immunglobulin G (IgG; Sigma-Aldrich), 1 mM EGTA, valamint a radioaktív ligand [³H]PDBu (Perkin Elmer Life Sciences) különböző koncentrációi (8-10 komponensből álló hígítási sor). A receptor (jelen esetben a C1 domén fragmentumok) hozzáadása után a reakcióelegyet 37°C-on 5 percig inkubáltuk, mely során megtörtént a ligand-receptor kötődés. A mintákat ezután 10 percig jégen tartottuk, majd 200 µl 35%-os polietilén-glikolt (50 mM Tris-HCl-ben oldva (pH 7,4)) adtunk az elegyhez, amely a receptor-ligand-komplex precipitációját váltotta ki. Ezután további 10 perc inkubáció következett jégen, majd a mintákat tartalmazó csövecskéket 12.200 rpm fordulatszámra, 15 percre keresztül centrifugáltuk. Az így elválasztott felülúszó tartalmazta a (receptorhoz nem kötött) szabad ligandokat, míg a pelletben a receptorhoz kötött (a fehérjékkel együtt precipitálódott) ligandok voltak kimutathatók. A felülúszóból 100 µl-nyi mintát vettünk a további mérésekhez, a maradék felülúszót pedig óvatos vákuumszívás mellett eltávolítottuk a pelletről. A csövecskében maradt pelletet, a csövecske aljának levágása után, speciális szcintillációs üvegcsékbe transzferáltuk. Hasonlóan jártunk el az előbb említett 100 µl-nyi felülúszó minta esetében is. Ezután az üvegcsékhez Cytoscint-ES (ICN, Costa Mesa, CA, USA) folyékony szcintillációs koktélt adtunk. Az üvegcsékben lévő minták (pellet vagy felülúszó) radiaktivitásának mértékét (amely a mintában lévő radioaktív [³H]PDBu mennyiségével volt arányos) Tri-Carb 2810TR szcintillációs számláló (Perkin Elmer Life Sciences) segítségével analizáltuk. Az adott ligandkoncentráció mellett detektálható specifikus ligandkötést a teljes ligandkötés és a nem-specifikus ligandkötés mennyiségének a különbsége adta. A 8-10 különböző ligandkoncentráció esetében meghatározott, specifikus ligandkötődés-értékek ismeretében ábrázoltuk a ligandtelítési görbét, majd a görbe analízisét Graphpad Prism szoftverrel (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) elvégezve, meghatároztuk az egyes receptor proteinek (adott ligandra vonatkozó) K_d értékét. A radioaktívan nem jelzett DAG-laktonok C1 doménnel szembeni affinitását ezen módszer egy módosított változatának segítségével vizsgáltuk, amely az azonos kötőhelyért való kompetíció elvén alapul. Ezen „kompetitív” ligand-kötődés vizsgálat során fix koncentrációjú radioaktív [³H]PDBu-t tartalmazó elegyhez emelkedő koncentrációjú jelöletlen ligandot (DAG-lakton) adtunk, amely az adott receptornal szembeni affinitás mértéke szerint szorítja le a radioaktív [³H]PDBu-t a kötőhelyéről. Az ily módon meghatározott „inhibitorikus”

disszociációs konstans (K_i érték) megadja a receptor molekulának az adott jelöletlen ligand iránti affinitását. A módszer ezen változata szintén részletesen tárgyalásra kerül a fent említett metodikai közleményben [174]. A disszociációs görbék analíziséhez ebben az esetben is a fent említett Graphpad Prism szoftvert (GraphPad Software) alkalmaztuk.

A molekulaszervezet modellezése

Az egyes C1 domének (mutáns/vad típusú PKC δ C1b /Vav1 C1) DAG/forbol-észter kötőhelyeinek térbeli szerkezetét, az egyes ligandok kötőhelyre való beilleszkedését (docking), illetve a különböző receptorstruktúrák felszíni lipofilicitását vizsgáló számítógépes modellek elkészítése teljes egészében Megan L. Peach (Basic Research Program, SAIC-Frederick, NCI-Frederick, Frederick, MD, USA) munkájának köszönhető, aki ebben a projektben laboratóriumunk kollaborátoraként vett részt. A molekulaszervezet modellezésének módszertani leírása megtalálható a Disszertáció alapjául szolgáló közlemény „Anyagok és módszerek” fejezetében [173]. A Disszertációban annak részletes ismertetésétől eltekintettem.

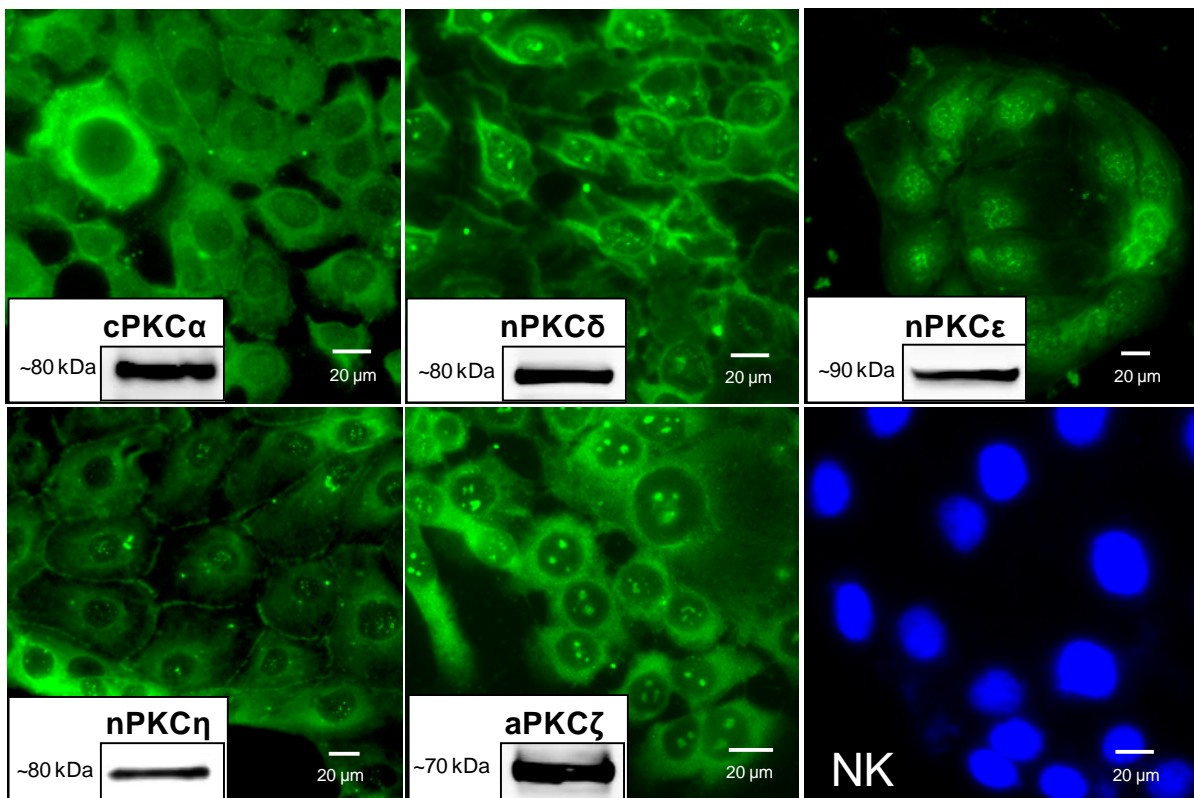
Statisztikai analízis

A kapott eredményeket, ha azt a továbbiakban másként nem jelezzük, a megfelelő kontroll százalékában adtuk meg. Hibasávban az egyes eredménypontok átlagának standard hibáját (SEM) tüntettük fel, szintén a kontroll százalékában kifejezve. Az átlagok különbségét páros t -próbával analizáltuk. Szignifikánsnak a 0,05 szignifikancia szint alatti különbségeket fogadtuk el ($p < 0,05$).

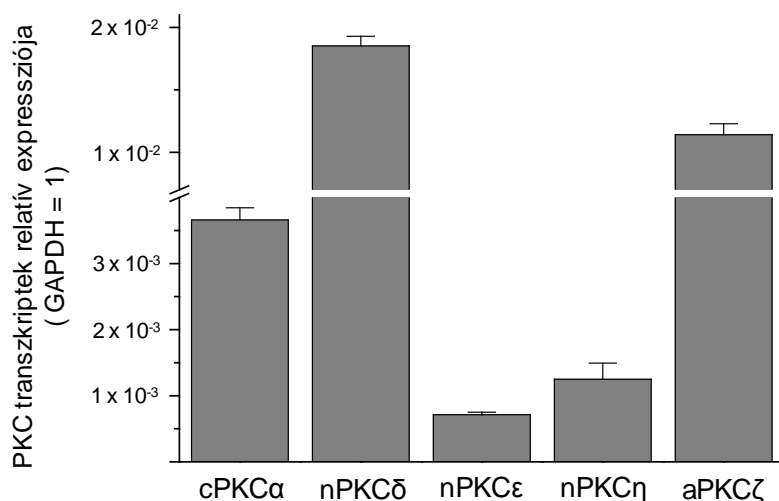
EREDMÉNYEK

A humán SZ95 sebocyták jellegzetes PKC izoenzim mintázata

Kísérleteink első lépéseként arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az SZ95 sebocyták a PKC rendszer mely izoformáit expresszálják. Immuncitokémia, Western blot valamint kvantitatív „real-time” PCR segítségével (az irodalomban először) sikerült kimutatnunk a klasszikus csoportba tartozó cPKC α , a novel csoportba tartozó nPKC δ , ϵ , és η , valamint az atípusos PKC ζ kifejeződését mind protein, mind pedig mRNA szinten (5. és 6. ábra).



5. ábra: A humán SZ95 sebocyták jellegzetes PKC izoforma mintázattal rendelkeznek. A fedőlemezeken 80-90%-os konfluenciaszintig tenyésztett SZ95 sejteket acetonos fixálás után a különböző PKC izoformák ellen, nyúlban termeltetett elsődleges antitestekkel inkubáltuk. Ezután FITC-konjugált kecske-anti-nyúl, másodlagos antitestekkel végeztük a fluoreszcens jelölést (zöld fluoreszcencia). NK: negatív kontrollként elsődleges antitest nélküli jelölést használtunk. A sejtmagokat DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole) festéssel tettük láthatóvá (kék fluoreszcencia). **Belső panelek:** A 80-90%-os konfluenciaszintnél összegyűjtött SZ95 sejtek lizátumaiban Western immunoblot segítségével is meghatároztuk a PKC izoformák protein szintű expresszióját.



6. ábra: Az egyes PKC izoformák mRNS szintű expressziója SZ95 sebocytákban. A 80-90%-os konfluenciájú SZ95 sebocytákból izolált RNS felhasználásával, reverz-transzkripciót követő kvantitatív "real-time" PCR (Q-PCR) segítségével vizsgáltuk a különböző PKC izoformák mRNS transzkriptjének kifejeződését. Az eredményeket a belső kontrollként használt glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) expresszióra normálva adtuk meg.

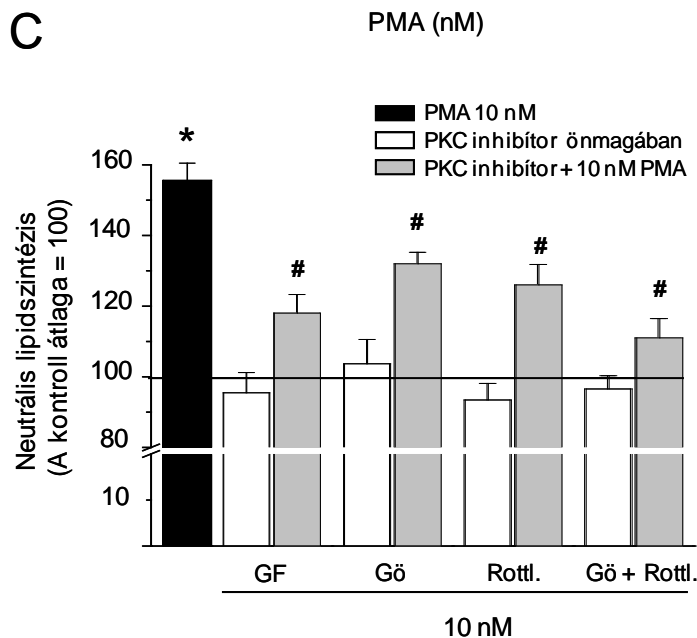
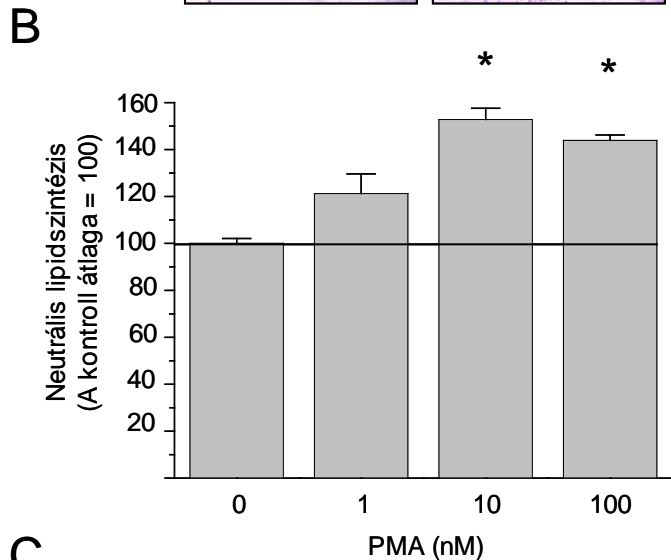
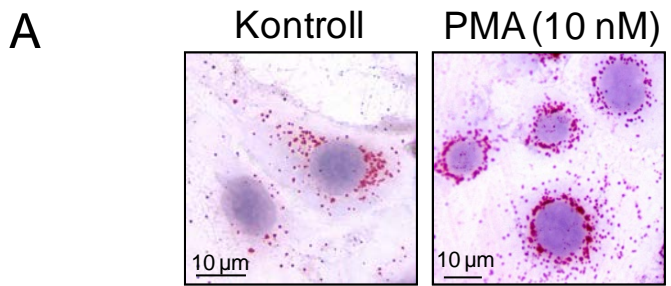
látható, hogy a fent említett öt izoforma közül a cPKC α , az nPKC δ és az aPKC ζ (GAPDH-ra normált relatív) expressziója volt a legmarkánsabb, és jelentősen meghaladta az nPKC ϵ és η kifejeződését, amely izo-enzimek alacsony expressziót mutattak. Ezen eredményünk tehát felvetette a három PKC izoforma kitüntetett szerepének lehetőségét a sebocyták alapvető sejtfolymatainak szabályozásában.

A PKC rendszer farmakológiai modulációja megváltoztatja az SZ95 sejtek lipidtermelését, ugyanakkor nem befolyásolja életképességüket

Ahogy azt a „Bevezetés” fejezetben már említettük, a sebocyták differenciálódás irányába történő elköteleződésének legmarkánsabb ismertetőjele az intracelluláris vakuólumaikban tárolt lipíd molekulák (leginkább neutrális lipidek) mennyiségének jelentős emelkedése, a megnövekedett lipidszintézis következtében [91,122,124,175]. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az SZ95 sejtvonal (bár proliferációs kapacitása jelentősen meghaladja a normál humán sebocytákét) korlátozott mértékben képes megőrizni terminális differenciálódásra való képességét, mely folyamat szembetűnő bizonyítéka a konfluencia előrehaladtával bekövetkező lipidszintézis fokozódás és a következményes citoplazmatikus

Fontos kiemelni, hogy egyik módszerrel sem tudtuk detektálni az enzimcsalád többi tagjának (azaz a cPKC β I, β II és γ ; az nPKC η és θ ; valamint az aPKC λ /I) expresszióját, sem mRNS, sem pedig protein szinten. A Q-PCR vizsgálat segítségével ezenfelül módunk nyílt egymással is összehasonlítani az egyes izoformák mRNS transzkriptjeinek relatív expresszióját. A 6. ábrán

lipidakkumuláció, valamint a posztkonfluens állapotban bekövetkező apoptózis és sejtpusztulás [118,126].



7. ábra: A *forbol-12-mirisztát-13-acetát* (PMA) kezelés fokozza az SZ95 sebocyták lipidszintézisét. Az SZ95 sejteket 2 napon keresztül a következő anyagokkal kezeltük: oldószerrel (Kontroll, K), a PKC aktivátor, PMA-val (a feltüntetett koncentrációkban; lásd A és B ábra), az egyes PKC inhibitorokkal (GF109203X (GF), Gö6986 (Gö), és Rottlerin (Rottl.) 10 nM-os koncentrációban), valamint a PMA és az inhibitorok kombinációjával (C ábra). A: A lipidszintézis kvalitatív vizsgálatához Oil-Red O festés segítségével tettük láthatóvá az intracelluláris lipidcseppeket, a sejtmagot pedig Mayer-féle hematoxilinnel jelöltük. B és C: A lipidtermelés kvantitatív meghatározása végett Nile-Red jelölést végeztünk, majd FLIPR-alapú fluorimetriás mérés segítségével meghatároztuk a sejtek neutrális lipidszintézisét (amely az intracelluláris vakuólumok de-novo szintetizált lipidszintézisével jár együtt). A kapott értékeket mindkét ábra esetében átlag \pm SEM alakban, (az oldószerrel kezelt) kontroll százalékában ábrázoltuk, amelyet az x-tengellyel párhuzamos folytonos vonal jelöl. A B és C jelű ábrán látható „*„ jelzés a kontrollhoz képest szignifikáns ($p < 0.05$) eltérést jelzi, míg a C panelen lévő „#„ jelzés a PMA-kezelte csoporttól való szignifikáns ($p < 0.05$) különbséget mutatja. $N=4$, mindegyik esetben

Következő kísérletünkben farmakológiai módszerek segítségével vizsgáltuk a PKC enzimszintézis lehetséges funkcionális szerepét a sebocyták ezen alapvető jelentőségű sejtfolyamataiban (differenciálódást jelző lipidszintézis fokozódás, a sejtek életképességének változása). A sebocyták kultúrákat két napon keresztül az általános PKC aktivátor PMA különböző koncentrációival kezeltük. Ezt követően, különböző kvalitatív (Oil-Red O) és

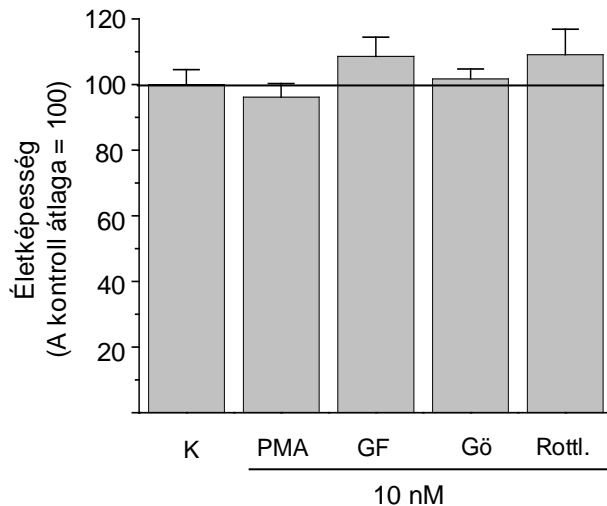
kvantitatív (Nile Red) módszerek segítségével, meghatároztuk a differenciáltsági állapot tükröző lipidtartalmat. Az Oil-Red O festést követően elkészített reprezentatív fénymikroszkópos képek tanúsága szerint (7.A ábra) a PKC rendszer farmakológiai aktiválása (10 nM PMA-val) fokozta a sejtek lipidszintézisét, melyet a citoplazmatikusan elhelyezkedő, pirosan festődő, lipidekkel telt vakuólumok megnövekedett száma mutatott. Nile Red-alapú fluoreszcencia intenzitás mérés segítségével (FLIPR készülék felhasználásával) számszerűsítettük a PMA által kiváltott lipidszintézis-fokozódás mértékét a különböző sejtpopulációk esetében. Az 7.B ábrán látható koncentrációtartományban a PMA dózis-függő módon fokozta a sejtek neutrális lipidtartalmát. (A sejtek poláros lipidtartalma, mely leginkább a sejtszámmal korrelál, nem mutatott eltérést a kontrollhoz képest, egyik koncentrációnál sem (adat nincs feltüntetve)).

Ezután a következő kérdésekre kerestük a választ: *i)* Vajon az általános PKC aktivátor PMA lipidszintézis-fokozó hatása valóban a PKC rendszeren keresztül valósul-e meg? *ii)* Kimutatható-e az egyes izoformacsaládok, illetve (esetlegesen) egyes izoformák kitüntetett szerepe ezen folyamat jelátviteli mechanizmusában? A kérdések eldöntéséhez sejtenyészeteinket PKC inhibitorokkal és PMA-val szimultán kezeltük két napon keresztül (az inhibitorokat 30 perccel a PMA hozzáadása előtt adtuk a tápoldathoz). A kísérlet során a következő inhibitorokat alkalmaztuk: GF109203X (cPKC és nPKC izoformák inhibitora), Gö6976 (cPKC izoformák gátlószere) és Rottlerin (nPKC δ inhibitor). Kontrollként minden esetben a csak inhibitorokkal kezelt tenyészetek szolgáltak. A fluorimetriás Nile Red jelölés (7.C ábra) alapján megállapítható, hogy mindhárom inhibitor szignifikáns mértékben (ugyanakkor csak részlegesen) csökkentette a PMA lipidszintézist fokozó hatását. Mindezek alapján tehát felvetődött, hogy a PMA hatásának közvetítésében több PKC izoforma is szerepet játszhat. Az 7.C ábra alapján ugyanakkor az is nyilvánvaló, hogy az általunk alkalmazott PKC inhibitorok önmagukban (tehát PMA alkalmazása nélkül) nem változtatták meg a sejtek bazális lipidszintézisét. Ezek alapján tehát feltételezhetjük, hogy a bazális PKC aktivitás (leglább is *in vitro*) nagy valószínűséggel nem vesz részt a sebocyták lipidtermelésének szabályozásában.

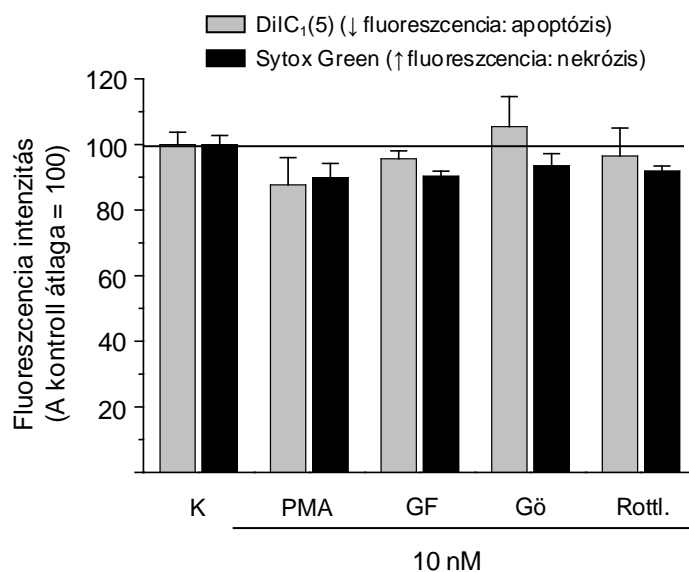
A sebocyták terminális differenciálódását jelző neutrális lipidtermelés változásai mellett arra is kíváncsiak voltunk, hogy vajon a PKC rendszer farmakológiai befolyásolása megváltoztatja-e a sejtek életképességét; vagyis okoz-e változást a sejtek proliferációs folyamataiban, illetve kiváltja-e a sejthalál valamely formáját (apoptózis vagy nekrozis). A 8.A ábrán látható kolorimetriás MTT-assay tanúsága szerint sem a PKC aktivátor PMA sem

pedig a fentebb említett inhibitorok (önmagukban alkalmazva) nem változtatták meg a sebocyta-kolóniák élő sejt számát két napos kezelést követően.

A



B



8. ábra: A PKC rendszerre ható farmakonok nem befolyásolják az SZ95 sebocyták életképességét. Az SZ95 sejteket 2 napon keresztül kezeltük a PKC aktivátor PMA-val és egyes PKC inhibitorokkal ((GF109203X (GF), Gö6986 (Gö), és Rottlerin (Rottl.)), az ábrán feltüntetett koncentrációkban. **A:** A sejtek életképességében bekövetkező változásokat kolorimetriás MTT-assay segítségével határoztuk meg. **B:** Az apoptotikus folyamatokat a mitokondriális membránpotenciál változását detektáló fluorimetriás DiIC₁(5) jelölés segítségével követtük nyomon (szürke oszlopok). A sejtnekrozis meghatározásához pedig a SYTOX Green beépülés mértékét vizsgáltuk, ami a sejtmembrán dezintegrálódásával korrelál (fekete oszlopok). A fluoreszcencia intenzitásokat mindkét esetben FLIPR segítségével mértük. A kolorimetriával (A) és a fluorimetriával (B) meghatározott értékeket átlag ± SEM alakban, (az oldószerrel kezelt) kontroll százalékában ábrázoltuk (amelyet az x-tengellyel párhuzamos folytonos vonal jelöl). N=4, mindkét esetben.

A 8.B ábrán pedig azt láthatjuk, hogy az alkalmazott farmakonok nem voltak citotoxikusak, hiszen a sejtnekrozist (vagyis a dezintegrálódott sejtmembránt) jelző intracelluláris SYTOX Green akkumuláció nem emelkedett meg a kezelések hatására, a nem kezelt kontroll csoporthoz képest. Ezenfelül egyik kezelési protokoll sem indukált apoptotikus folyamatokat, hiszen a fluoreszcens DiIC₁(5) festék mitokondriumban történő felhalmozódása nem mutatott csökkenést a két napos kezelés után, amely alapján (lásd „Anyagok és módszerek” fejezet) a korai apoptotikus markernek tekintett mitokondriális membránpotenciál-csökkenés kizárható volt (8.B ábra). Ezek alapján tehát elmondható, hogy

sem a PKC rendszer aktiválása (exogén forbol-észter aktivátor, PMA segítségével) sem pedig az endogén PKC aktivitás gátlása (GF109203X, Gö6976 és Rottlerin segítségével) nem befolyásolja a sebocyták proliferációs és túlélési folyamatait.

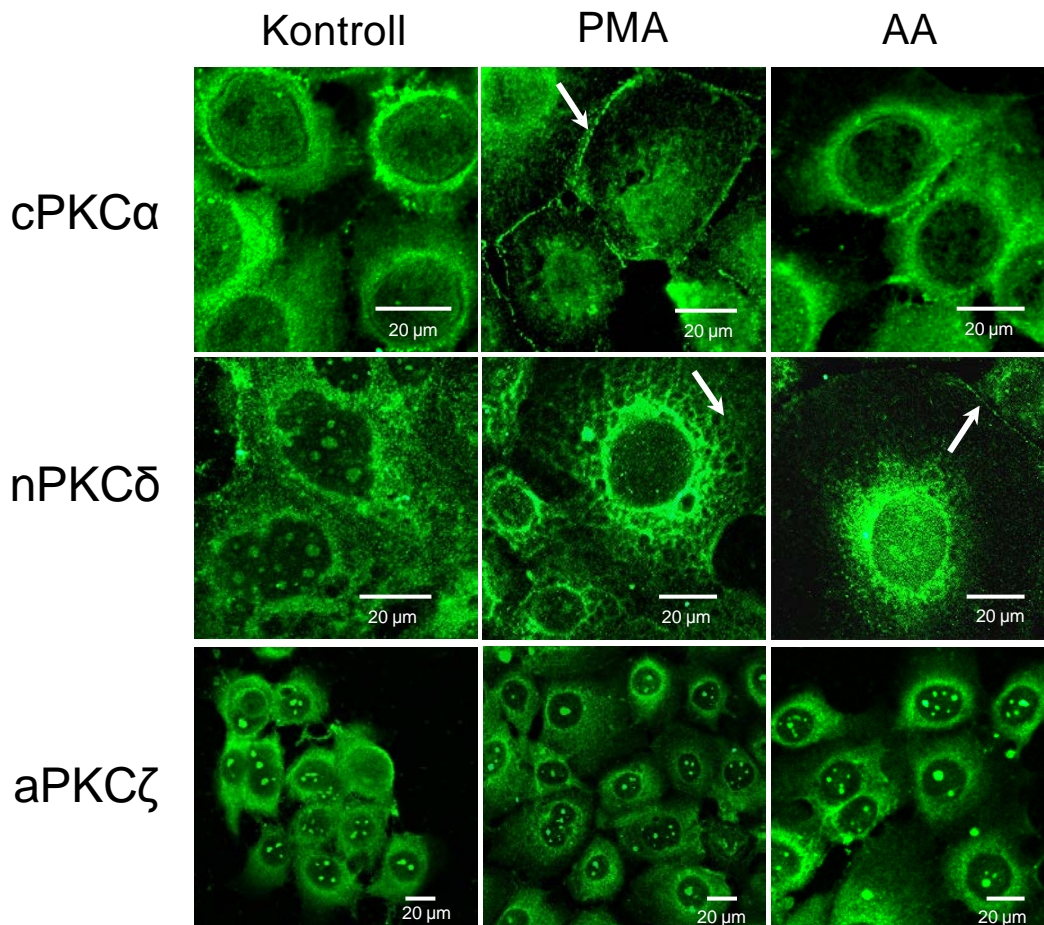
A PMA lipidszintézis-stimuláló hatása a cPKC α és az nPKC δ aktiválásán keresztül valósul meg SZ95 sebocytákban

Farmakológiai kísérleteink alapján tehát valószínűsíthető volt a PKC rendszer specifikus szerepe a PMA által kiváltott sebocyta-differenciálódási folyamatokban. Ugyanakkor számos közlemény veti fel az egyes PKC inhibitorok kérdéses szelektivitásának és/vagy specificitásának nem elhanyagolható problémáját, hiszen nem egy esetben tapasztalták, hogy egyéb jelátviteli molekulák aktivitását is befolyásolhatják [176-178]. Ezen felül, mivel a PKC ζ aktivitásának gátlására jelenleg nem áll rendelkezésre megfelelő inhibitor, ezért a sejtek egyik legmagasabb expressziós szinttel bíró izoformájának jelátviteli folyamatokban betöltött szerepe farmakológiai megközelítéssel nem volt vizsgálható. Az egyes PKC enzimek izoforma-specifikus szerepének vizsgálatához ezért a továbbiakban különböző sejt- és molekuláris biológiai módszereket alkalmaztunk; kiküszöbölve ezáltal a farmakológiai módszerek megkérdőjelezhető szelektivitásából adódó nehézségeket, valamint a PKC ζ farmakológiai gátlásának hiányosságait. Ezen kísérleteink során azok az izoformák (cPKC α , nPKC δ , aPKC ζ) álltak a vizsgálatok középpontjaiban, amelyek expressziós szintje, a Q-PCR vizsgálatok alapján, a legmagasabbnak adódott (lásd 6. ábra)

A PMA kezelés a cPKC α és az nPKC δ transzlokációját és down-regulációját okozza

Ahogy azt a „Bevezetés”-ben említettük, a PKC izoformák aktiválódása rendszerint együtt jár a molekulának a citoszólból/nukleoplazmából a sejtmembránba (illetve egyéb intracelluláris kompartmentekbe) irányuló transzlokációjával. Elsőként ezért (az aktiválódás bizonyítékaként) a PKC izoformák szubcelluláris lokalizációjában bekövetkező lehetséges változásokat vizsgáltuk, rövidtávú PMA kezelés (1 óra) után. Az immunfluoreszcens módszerrel jelölt PKC izoformák intracelluláris elhelyezkedését konfokális mikroszkópia segítségével tettük láthatóvá. A 10 nM PMA-val történő kezelés után a cPKC α illetve az nPKC δ transzlokációját detektálhattuk (9. ábra). A cPKC α esetében a molekulának a citoplazmából a sejtmembránba irányuló kihelyeződését figyelhattuk meg, míg az nPKC δ a citoszólból és a sejtmagból, a mag körüli membránstruktúrákba (endoplazmatikus retikulum?,

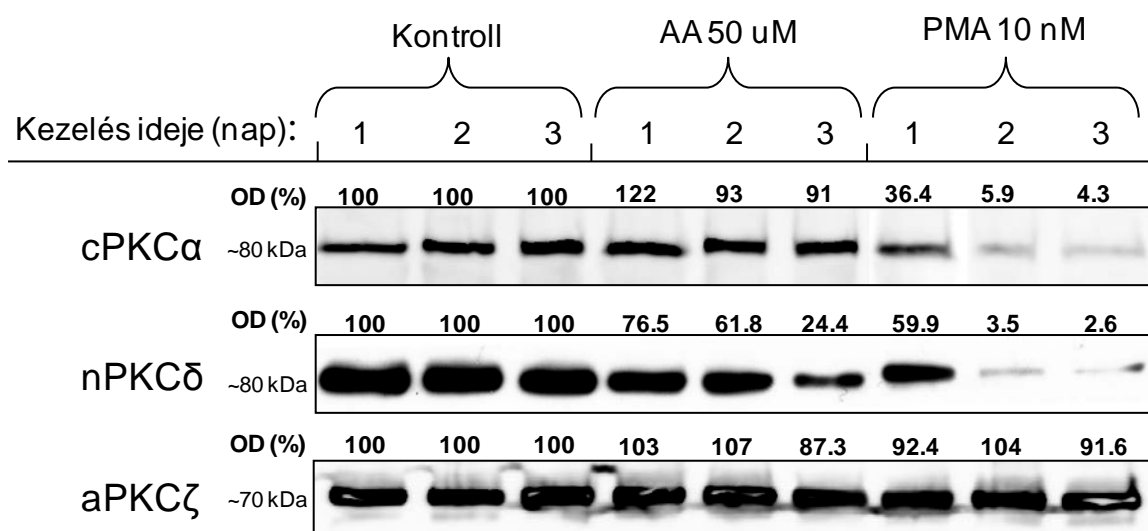
Golgi apparátus?) transzlokálódott. Ugyanakkor, amint az várható volt, a PKC ζ szubcelluláris lokalizációja nem változott meg, hiszen atípusos izoforma lévén, nem rendelkezik forbol-észterre szenzitív C1 doménnel (lásd 1.C ábra).



9. ábra: A PMA és az AA kezelés eltérő PKC izoenzimek transzlokációját váltja ki. A fedőlemezek szélészett SZ95 sejtenyészeteket letapadás után 10 nM PMA-val vagy 50 μ M AA-val kezeltük, 1 órán keresztül. Acetonos fixálást követően elvégeztük a PKC izoformák immunjelölését, nyúlban termeltetett anti-PKC elsődleges antitestek, valamint FITC-konjugált, kecske-anti-nyúl másodlagos antitestek felhasználásával (zöld fluoreszcencia). Ezt követően, a PKC izoformák szubcelluláris lokalizációját konfokális mikroszkóp segítségével tettük láthatóvá. A nyilak a transzlokáció helyét jelölik. A felvételek alapján jól látható, hogy a PMA transzlokálja a cPKC α és az nPKC δ izoformákat (az aPKC ζ -t viszont nem), míg az AA kezelés hatására csak az nPKC δ transzlokálódik (a cPKC α és az aPKC ζ sem).

Az egyes PKC izoformák aktivációjának másik jellegzetes bizonyítéka a folyamatos enzimműködést követő down-reguláció, melynek során a sejtben lévő proteázok lebontják az adott enzimet, emiatt csökken annak sejtben mérhető expressziós szintje; így az enzimműködés negatív visszacsatolós regulációja következik be. Ezért következő kísérletünkben Western blot segítségével vizsgáltuk a hosszútávú (max. 3 nap) PMA kezelés PKC-expresszióra kifejtett hatását. A 10. ábrán látható, hogy a forbol-észterrel történő

kezelés jelentősen lecsökkentette a cPKC α , illetve az nPKC δ kifejeződését. Az immunjelek denzitometriás analízise (az immunjelek felett számszerűen jelölve) alapján jól látszik, hogy már az első napon kb. 50%-os csökkenés detektálható mindkét izoforma expressziójában, a második naptól pedig szinte teljesen eltűnnek a sejtekből (3-6 %-os maradék expresszió). Ugyanakkor (várakozásainknak megfelelően) a PMA kezelés nem változtatta meg a PKC ζ expresszióját. A transzlokációs vizsgálatok eredményei, összhangban a down-regulációt célzó vizsgálatok eredményeivel így arra utalnak, hogy a PMA kezelés következtében aktiválódnak a cPKC α és az nPKC δ izoformák.



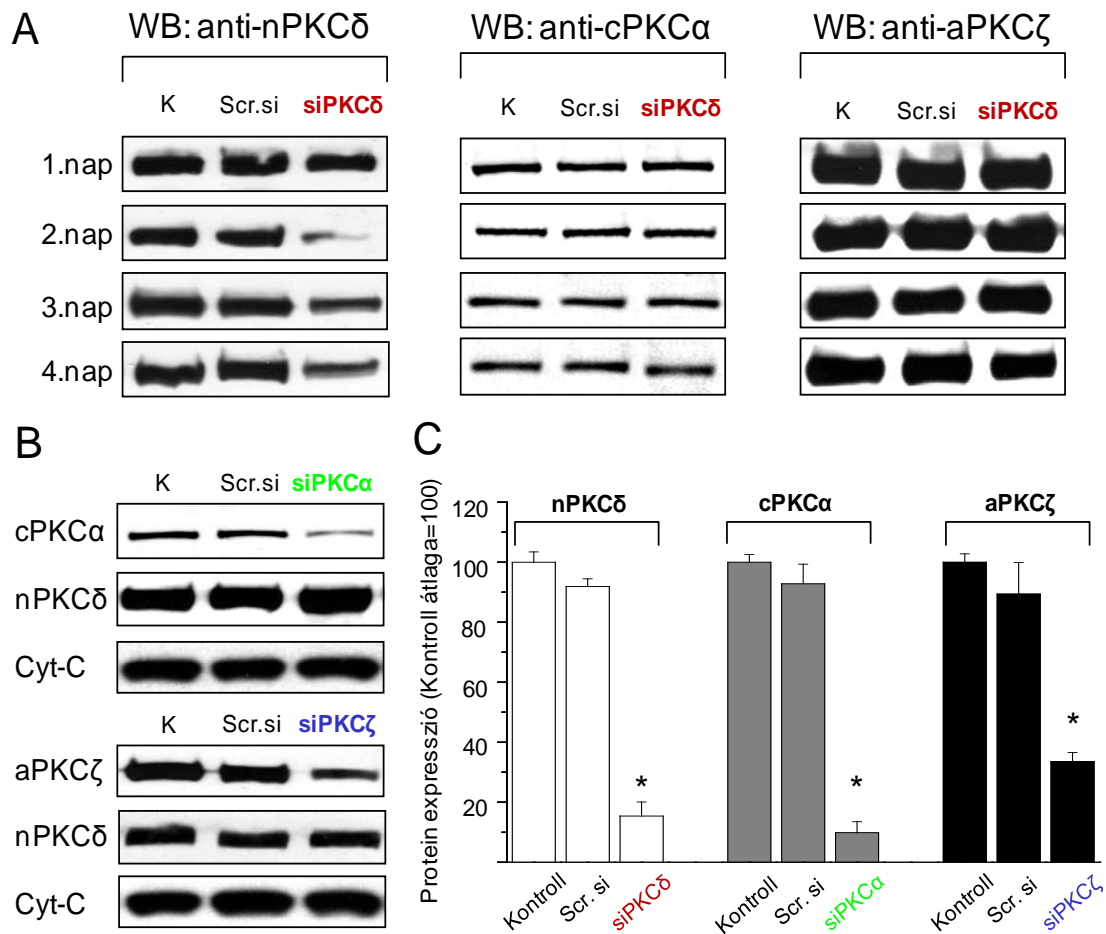
10. ábra: A PMA és az AA kezelés eltérő PKC izoenzimek esetében okoz down-regulációt. Az SZ95 sejteket tenyésztőedényekben szélesztettünk, majd 3 napon keresztül 10 nM PMA-val vagy 50 μ M AA-val kezeltük őket. Ezt követően Western immunoblot segítségével meghatároztuk az egyes PKC izoformák (cPKC α , nPKC δ és aPKC ζ) expresszióját. Belső kontrollként (mindhárom PKC esetben) a citokróm-C-expresszió immunjelei szolgáltak, amely egyik kísérlet során sem mutatott változást a kezelésekre hatására (nincs feltüntetve). A proteinexpresszió (szemi)kvantitatív meghatározásához elvégeztük a kapott immunjelek denzitometriás analízisét (optikai denzitás, OD). A kapott értékeket a citokróm-C expresszióra normáltuk, majd az (azonos naphoz tartozó) kezeltlen kontroll százalékában fejeztük ki őket. Látható, hogy (összhangban a transzlokációs kísérletek eredményeivel) a PMA hatására down-regulálódik a cPKC α és az nPKC δ (de az aPKC ζ nem); míg az AA kezelés hatására csak az nPKC δ down-regulálódik (a cPKC α és az aPKC ζ nem). Három további független kísérlet hasonló eredményt hozott.

A cPKC α és az nPKC δ izoformák részt vesznek a PMA okozta lipidtermelés-fokozódás jelátviteli útvonalában, az aPKC ζ ugyanakkor gátolja a lipidszintézist és az apoptotikus folyamatokat

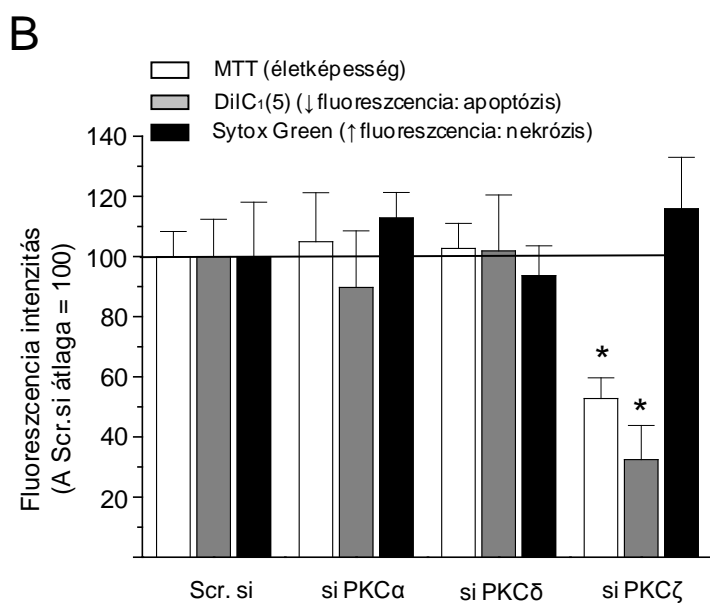
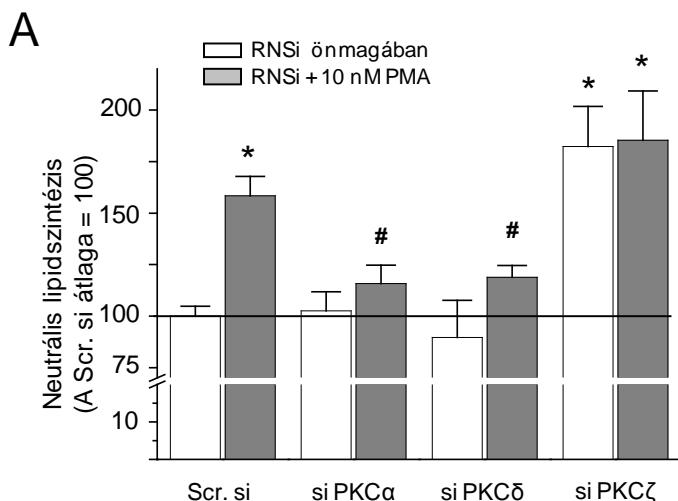
A cPKC α és az nPKC δ molekulák PMA általi aktivációjára utaló közvetett bizonyítékok (transzlokáció, down-reguláció) megismerése után arra kerestük a választ, hogy vajon ezen izoenzimek valóban részt vesznek-e a PMA lipidszintézist fokozó celluláris

hatásának szignáltranszdukciós útvonalában. A kérdés megválaszolásához az egyes izoformák expressziójának szelektív gátlása után vizsgáltuk a lipidtartalomban bekövetkező változásokat (Nile-Red festés segítségével). Az izoforma-szelektív „géncsendesítés” RNS interferencia technika felhasználásával valósult meg, az egyes izoenzimre specifikus siRNS oligonukleotidok tranziens transzfekeciójának segítségével. Mindenekelőtt azt szerettük volna bizonyítani, hogy az RNS interferencia valóban lecsökkenti az adott izoforma kifejeződését. Ezenfelül, arra is kíváncsiak voltunk, hogy ez a tranziens hatás (a specifikus siRNS oligonukleotiddal történt transzfekeció után) mely napokon a legkifejezettebb. Ezen kérdéseinket megválaszolando, Western blot segítségével vizsgáltuk az izoenzim protein szintű expresszióját, a transzfekeciót követő négy napon keresztül. A 11.A ábra bal oldali oszlopának immunjelei alapján látható, hogy az nPKC δ -specifikus siRNS oligonukleotiddal transzfekektált („géncsendesített”) sejtekben jelentősen lecsökkent ezen izoenzim expressziója a kontrollhoz képest. A Western blot alapján az is jól látható, hogy ezen expressziószint-csökkenés a második napon a legkifejezettebb (80%-os csökkenés a denzitometriás analízis alapján; 11.C ábra bal oldali oszlopai), ugyanakkor az nPKC δ kifejeződése még a következő napokon (harmadik-negyedik nap a transzfekeció után) is alacsony szinten maradt. Az immunjelek denzitometriás analízise segítségével ezeken a napokon 40-50%-os csökkenést detektálhatunk. (A jobb átláthatóság kedvéért a denzitometriás mérések eredményeit a második nap (11.C ábra) kivételével nem tüntettük fel). A géncsendesítés ezen felül specifikusnak és szelektívnek is bizonyult, hiszen *i*) a PKC δ -ra specifikus siRNS transzfekeciója nem változtatta meg a többi vizsgált PKC izoenzim (cPKC α és aPKC ζ) expresszióját (11.A ábra középső és jobb oldali oszlopai); *ii*) a nem specifikus (ún. „scrambled”) siRNS-sel történő transzfekeció nem változtatta meg egyik izoenzim expresszióját sem. Ezután az nPKC δ -hoz hasonlóan, az általunk vizsgált másik két izoenzim (cPKC α , aPKC ζ) esetében is elvégeztük az RNS interferencia hatékonyságának vizsgálatát. Hasonlóan az nPKC δ -nál tapasztaltakhoz, a cPKC α és az aPKC ζ izoenzim esetében is sikerült jelentős expressziócsökkenést elérnünk az adott izoenzimre specifikus siRNS-sel történő transzfekeció után (11.B ábra). Az ábrán a két izoenzim második napon detektált expressziócsökkenését mutatjuk be, mivel a hatékonyság, esetükben is, ezen a napon volt a legkifejezettebb (a 11.C ábrán bemutatott denzitometriás analízis tanúnága szerint kb. 70-80%-os expressziócsökkenést értünk el ezen a napon). A transzfekeció specificitására, illetve szelektivitására vonatkozó megállapítások (az nPKC δ esetében tapasztaltakhoz hasonlóan) ezen két izoenzim esetében is igaznak bizonyultak; azaz a „scrambled” siRNS esetükben sem okozott változást a génkifejeződésben és az adott izoenzimre (cPKC α -ra, ill. nPKC δ -ra)

specifikus siRNS-sel történt transzfecció nem változtatta meg a kontrollként vizsgált nPKC δ expresszióját (11.B ábra).



11. ábra. Az RNS interferencia (RNSi) hatékonyan és specifikusan csökkenti az egyes izoformák expresszióját. Az SZ95 sejteket nPKC δ -ra specifikus siRNS-sel transzfeccióztunk. Kontrollként, a nem specifikus, (ún. „scrambled”) siRNS-sel (Scr. si) transzfeccióztalt sejtek szolgáltak. A „géncsendesítés” hatékonyságát a transzfecció után (négy napig) naponta elvégzett Western blottal követtük nyomon, az egyes PKC izoenzimek és a belső kontrollként szolgáló citokróm-C (Cyt-C) esetében. **A:** Az nPKC δ -specifikus siRNS kizárólag az nPKC δ izoforma expresszióját csökkentette le (bal oldali oszlop), a többi izoforma (cPKC α és aPKC ζ ; középső és jobb oldali oszlop) kifejeződése változatlan maradt. A Scr. si-vel történt transzfecció nem okozott expresszió változást a nem-transzfeccióztalt kontrollhoz képest. **B:** A cPKC α és az aPKC ζ szelektív „géncsendesítése”. A protein expressziót ebben az esetben is 4 napon keresztül ellenőriztük. A második naphoz (legnagyobb expressziócsökkenés) tartozó reprezentatív felvételek szerint mind az siPKC α -val (fenn), mind az siPKC ζ -val (lenn) történő transzfecció szelektíven csökkentette a megfelelő izoformák (α és ζ) expresszióját, ugyanakkor sem az nPKC δ , sem pedig a Cyt-C expresszióját nem változtatta meg. **C:** A második naphoz tartozó immunjeleket (három független kísérlet esetében) szemikvantitatív denzitometriás analízisnek (optikai denzitás, OD) vetettük alá. Az így kapott értékeket (a Cyt-C expresszióra normálva) átlag \pm SEM formában adtuk meg, a nem-transzfeccióztalt, kontroll (K) populáció expressziójának százalékában kifejezve. A „*” jelzés a Scr. si RNS-sel transzfeccióztalt csoporthoz képest szignifikáns ($p < 0,05$) expresszió változást jelzi.



12. ábra. A PMA lipidszintézist fokozó celluláris hatása a cPKC α és az nPKC δ aktiválásán keresztül valósul meg. Az aPKC ζ expresszió szelektív „gécscsendesítése” fokozott lipidtermelést és apoptózist indukál. Az SZ95 sejtekben elvégeztük a különböző PKC izoformák (cPKC α , nPKC δ és aPKC ζ) szelektív „gécscsendesítését”. **A:** A transzfekció utáni második naptól sejteinket további két napon keresztül 10 nM PMA-val kezeltünk. Ezek után megmértük a sejtek neutrális lipidtartalmát (Nile Red, FLIPR). **B:** A transzfektált sejtek életképességét MTT-assay-vel határoztuk meg (üres oszlopok). Az apoptózist DilC₁(5) jelöléssel (mitokondriális membránpotenciál; szürke oszlopok), a nekrozist pedig SYTOX Green jelöléssel vizsgáltuk (fekete oszlopok). Az eredményeket átlag \pm SEM formában adtuk meg, a „scrambled” siRNS-sel transzfektált (Scr. si), kezeletlen (PMA-val nem kezelt) sejtpopuláció százalékában kifejezve (amelyet az x-tengellyel párhuzamos folytonos vonal jelöl, (N=4). A Scr. si kontrollhoz képest szignifikáns ($p < 0.05$) eltérést „*”-gal jelöltük, a PMA-val kezelt kontroll csoporthoz képest szignifikáns ($p < 0.05$) eltérést pedig „#” szimbólummal. A Scr. si RNS-sel transzfektált csoport nem mutatott különbséget az azonos kezelési sémáknak alávetett, nem-transzfektált SZ95 sejtekhez képest (nincs feltüntetve).

Az RNS interferencia technika hatékonyságának bizonyítása után rátérhettünk a lipidszintézist célzó funkcionális vizsgálatokra, az adott izoformát csökkent mértékben expresszáló sejtpopulációk felhasználásával. A transzfekció után 24 órával sejteinket 10 nM PMA-val kezeltük, majd a kezelést követő második napon elvégeztük a lipidtartalom meghatározását az „Anyagok és Módszerek” fejezetben leírtak szerint. A 12.A ábrán látható, hogy a cPKC α , valamint az nPKC δ szelektív gátlása (RNS interferencia segítségével) önmagában semmilyen hatással nincs a sejtek bazális lipidszintézisére. Ezenfelül az is nyilvánvalóvá vált (12.B ábra), hogy a két izoforma expressziójának visszaszorítása

önmagában nincs hatással sem a sejtproliferációra (üres oszlopok, MTT-assay), sem pedig az apoptotikus (szürke oszlopok, mitokondriális membránpotenciál) és a nekrotikus (fekete oszlopok, SYTOX Green) folyamatokra. Az 12.A és B ábrák alapján ugyanakkor azt a fontos következtetést vonhattuk le, hogy (a fent említett farmakológiai vizsgálatok esetében tapasztaltakkal összhangban) mind a cPKC α , mind pedig az nPKC δ expressziójának szelektív gátlása képes részlegesen kivédeni a PMA lipidszintézisfokozó hatását. Ez tehát alátámasztja a farmakológiai vizsgálatokban kapott azon eredményeinket, melyek szerint a PMA által aktivált két izoforma részt vesz a forbol-észter mediátor lipidszintézist fokozó celluláris hatásának szignáltranszdukciós útvonalában.

Az RNS interferencia segítségével lehetőségünk nyílt a sebocyták legmarkánsabb expressziót mutató PKC izoformájának, az aPKC ζ -nak a vizsgálatára is, amelynek aktivitását célzott farmakológiai módszerekkel nem állt módunkban vizsgálni, a megfelelő aktivátorok, illetve inhibitorok hiánya miatt. Meglepetéssel tapasztaltuk, hogy a cPKC α és nPKC δ esetében észleltekkkel szöges ellentétben, az aPKC ζ aktivitás szelektív „lecsendesítése” jelentősen fokozta a sejtek lipidtermelését (12.A ábra). A lipidszintézis fokozódása az aPKC ζ -géncsenedesített sejtekben olyan nagymértékű volt, hogy ezen sejtpopulációk esetében a PMA kezelés nem volt képes tovább fokozni a már jelentősen megemelkedett lipidtermelődést (12.A ábra). A bazális lipidszintézis fokozódása mellett az aPKC ζ izoforma expressziójának szelektív gátlása jelentősen csökkentette a géncsenedesített sejtpopulációk élő sejtszámát is (a kontrollként alkalmazott scrambled siRNS-sel transzfektált sejtpopulációhoz képest), eltérően a cPKC α és nPKC δ izoformáktól, amelyek a fentiek alapján nem befolyásolták a géncsenedesített sejtek életképességét (12.B ábra). Az ábrán az is látható, hogy ezen életképességcsökkenés háttérében valószínűleg az állhat, hogy az aPKC ζ izoforma szelektív lecsendesítése jelentősen fokozza a sejtek apoptotikus folyamatait (hiszen szignifikánsan csökkentette a mitokondriális membránpotenciáljukat) a kontrollhoz képest; sejtnekrózist ugyanakkor az aPKC ζ -val történő transzfekció sem okozott (12.B ábra). Mindezek alapján tehát elmondható, hogy a PKC ζ endogén aktivitása központi szerepet játszhat olyan szignáltranszdukciós útvonalak aktiválásában, melyek gátolják a sebocyták lipidtermelését, valamint kivédik a terminális differenciálódás következtében beinduló apoptotikus folyamatokat.

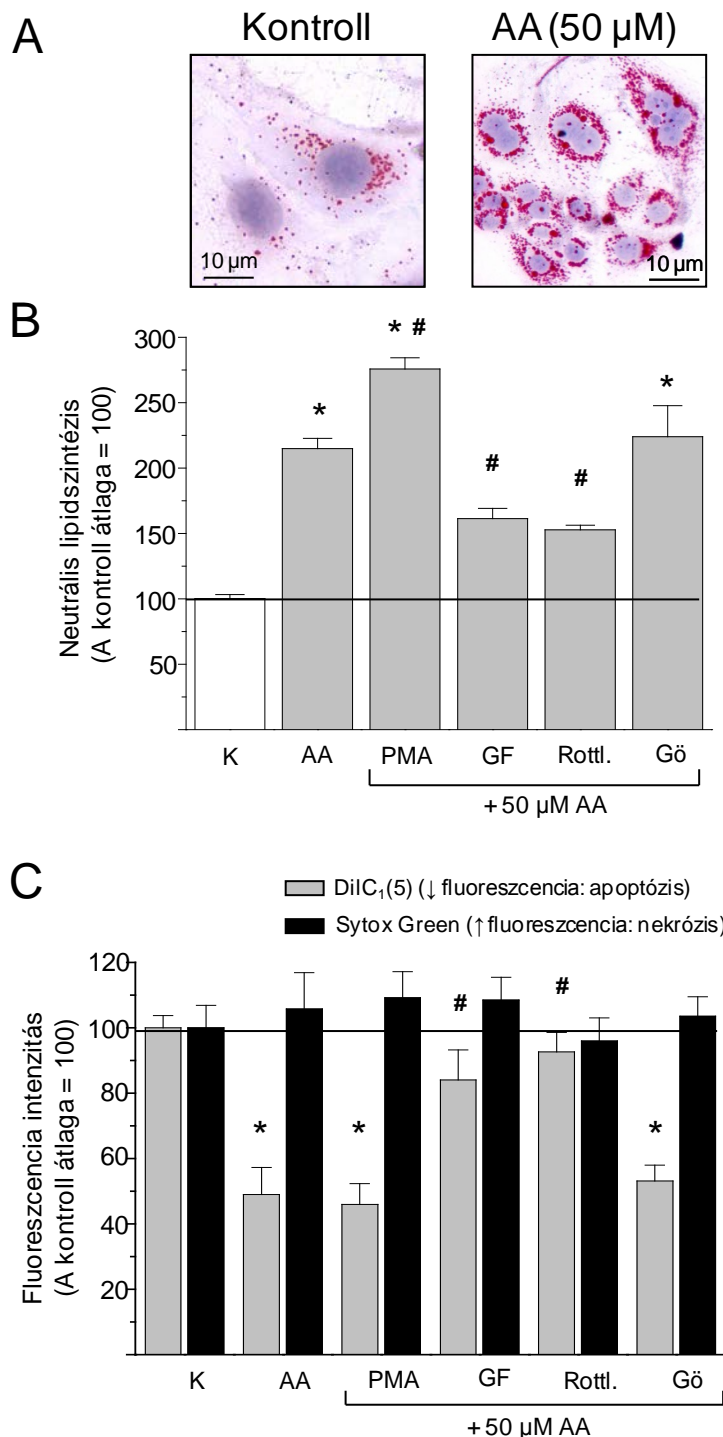
Az AA celluláris hatása az nPKC δ aktiválásán keresztül valósul meg SZ95 sebocytákban

A klasszikus és a novel izoformacsald két tagjáról (cPKC α és nPKC δ) tehát bebizonyosodott, hogy aktiválásuk fokozza a sebocyták terminális differenciálódását jelző lipidszintézist. Ugyanakkor, a várakozásunkkal némiképp ellentétes módon, a két izoforma endogén aktivitása, úgy tűnt, nem játszik jelentős szerepet a sejtek bazális lipidszintézisének és apoptotikus folyamatainak szabályozásában. Ahogyan azt a „Bevezetésben” ugyanakkor említettük, számos endokrin és parakrin mediátor szerepelhet a sebocyták differenciálódási programjának szabályozásában. Fiziológias vagy patológias körülmények között a bőrben felszabadulva, ezen mediátorok (a sebocytákban expresszáldó változatos receptorkészlet egyes elemeihez kötödvé) aktiválhatják a sejtek PKC rendszerét, és (részben) ezen rendszeren keresztül befolyásolhatják a terminális differenciálódást szabályzó jelátviteli útvonalakat. Az egyik ilyen anyag a gyulladálos lipidmediátorok prekurzora, az AA, amelyről az irodalmi adatok alapján ismert, hogy (a PMA hatásához nagyon hasonlóan) jelentősen képes fokozni a humán sebocyták lipidszintézisét; ezen felül pedig (a PMA-tól eltérően) szerepet játszik a sejtek apoptotikus folyamatainak indukciójában is [115,118,179]. Ezért a következőkben azt szeretttük volna megvizsgálni (a már bemutatott farmakológia módszerek, valamint sejt- és molekuláris biológias technikák alkalmazásával), hogy a PKC izoformák részt vesznek-e az AA celluláris hatásait közvetítő szignáltranszdukciós útvonalakban.

A GF109203X és a Rottlerin kivédi az AA által indukált lipidtermelést és apoptózt

Az Oil-Red O festés (13.A ábra) és a Nile-Red jelölés (13.B ábra) alapján látható, hogy, az irodalmi adatokkal összhangban, az alkalmazott AA kezelés jelentős lipidszintézis-fokozódást okozott a sejtekben (a Nile Red fluorimetria tanúsága szerint mintegy 120%-os növekményt tapasztaltunk; 13/B ábra). Ezután PMA-val és a fent említett PKC inhibitorokkal történő előkezelés mellett vizsgáltuk az AA hatását a lipidtermelésre (13.B ábra). Negatív kontrollként a csak PKC aktivátorral (PMA), illetve inhibitorokkal (GF109203X, Gö6976, Rottlerin) kezelt kultúrák szolgáltak, amelyek a korábbiakkal egyező mértékű változásokat okoztak ezen kísérletben is (ezek adatait ezen az ábrán nem tüntettük fel; lásd 7.B és C ábra). Az ábrán látható, hogy míg a klasszikus izoformák gátlószere (Gö6976) nem védte ki az AA lipidszintézist fokozó hatását, addig a GF109203X (amely mind a klasszikus mind pedig a novel izoformák gátlására képes) részlegesen kivédi azt, hasonlóan az nPKC δ specifikus inhibitorához, a Rottlerinhez. Ezek alapján felmerül, hogy az nPKC δ részt vesz az AA

lipidszintézis-fokozó hatásának mediálásában; ugyanakkor ezen kísérletek alapján a cPKC α szerepe a jelátviteli útvonalban nem tűnik valószínűnek. Ezen túlmenően az is látható, hogy a PMA képes volt még tovább fokozni az AA által elért lipidszintézis-növekményt.



13. ábra A GF109203X és a Rottlerin kivédi az AA által okozott lipidtermelés fokozódást és apoptózis indukciót. A PMA tovább fokozza az AA hatására megemelkedett lipidszintézist. Az SZ95 sejteket 2 napon keresztül a következő anyagokkal kezeltük: oldószerrel (Kontroll, K), 50 μM AA-val, 10 nM PMA-val, PKC inhibitorokkal (GF109203X (GF), Gö6986 (Gö), és Rottlerin (Rottl.) 10 nM-os koncentrációban), valamint AA és a PKC rendszerre ható farmakonok kombinációjával. **A:** Az AA lipidszintézisre gyakorolt hatását Oil-Red O festés segítségével tettük láthatóvá (a sejtmagot Mayer-féle hematoxilinnel jelöltük). **B:** Az intracelluláris lipidtartalom kvantitatív meghatározásához fluorimetriás Nile-Red assay-t végeztünk. **C:** Az apoptotikus folyamatokat a mitokondriális membránpotenciál mérésén keresztül (fluorimetriás DilC₁(5) jelölés) követtük nyomon (szürke oszlopok). A nekrotikus folyamatokat fluorimetriás SYTOX Green assay felhasználásával vizsgáltuk (fekete oszlopok). A kapott értékeket mindkét ábra esetében átlag ± SEM alakban, (az oldószerrel kezelt) kontroll százalékában ábrázoltuk (amelyet az x-tengellyel párhuzamos, folytonos vonal jelöl). A „*” jelzés a kontrollhoz képest szignifikáns ($p < 0.05$) különbséget jelzi, míg a „#” jelzés az AA-kezelt csoporttól való szignifikáns ($p < 0.05$) eltérést mutatja. $N=4$, mindegyik esetben.

Az irodalmi adatok, és saját munkacsoportunk korábbi kísérletei alapján [118,179] ismert volt az a tény, hogy az AA a lipidszintézis fokozásán kívül, a sebocyták apoptotikus

folyamatait is képes indukálni. Ezért a következő kísérletünk során azt vizsgáltuk, hogy a PKC rendszer egyes tagjainak vajon szerepe lehet-e az AA ezen sejthatásában is. Sejtjeinket két napig kezeltük a 13.C ábrán látható farmakonokkal, majd elvégeztük a DilC₁(5), illetve a SYTOX Green jelölés fluorimetriás mérését. (Negatív kontrollként ebben az esetben is a kizárólag PMA-val/PKC inhibitorral kezelt sejt kultúrák szolgáltak, amely anyagok ezen vizsgálatunk során sem okoztak változást a sejtek apoptotikus folyamataiban. Az adatokat nem tüntettük fel.) Az ábrán látható, hogy a kétnapos AA kezelés jelentősen fokozta a korai apoptotikus jeleket (mitokondriális membránpotenciál csökkenés), ugyanakkor az alkalmazott kezelés nem okozott sejtnekrózist (a SYTOX Green akkumuláció nem fokozódott). Fontos eredményünk emellett, hogy (hasonlóan az AA által indukált lipidtermelés esetében tapasztaltakhoz) a GF109203X és a Rottlerin majdnem teljesen kivédte az AA apoptózis-fokozó hatását, míg a Gö6976 anyag nem befolyásolta azt. Ezek alapján ismét felmerült az nPKC δ szerepe az AA celluláris hatásainak közvetítésében. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy a PKC aktivátor (PMA) nem volt semmiféle hatással az AA-indukált apoptózisra (13.C ábra).

Az AA kezelés az nPKC δ szelektív transzlokációját és down-regulációját okozza

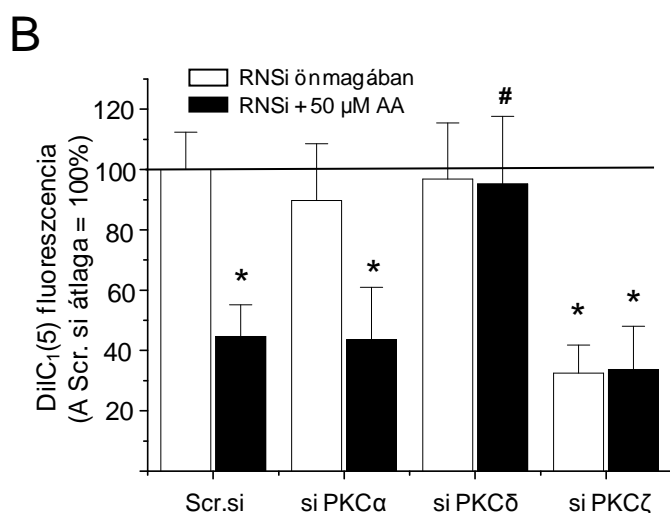
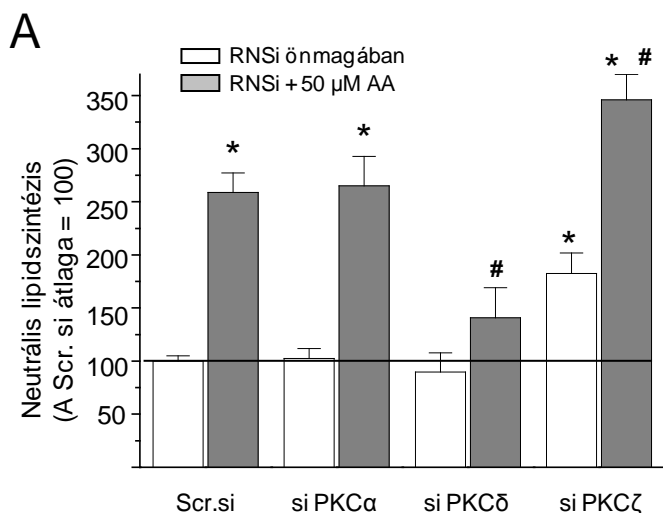
A PMA-nál ismertetett gondolatmenethez hasonlóan, farmakológiai kísérleteink eredményei az AA esetében is rávilágítottak a PKC rendszer izoforma-szelektív (nPKC δ) szerepére a gyulladáshoz vezető lipidmediátor jelátviteli útvonalában. A farmakológiai megközelítés korábban említett hiányosságai miatt az AA szignáltranszdukciós útvonalát vizsgáló további kísérletek során a fentebb már ismertetett sejt- és molekuláris biológiai módszereket hívtuk segítségül, hogy kétséget kizáróan bizonyíthassuk a PKC-szelektív mechanizmusok jelenlétét. Elsőként az egyes izoformák aktivációját bizonyító tranziens transzlokációt, valamint a tartós aktiválást követő szelektív down-regulációt vizsgáltuk. Az immunfluoreszcens jelölést követő konfokális mikroszkópia (9. ábra) rávilágított, hogy a rövidtávú (1 óra) AA-kezelés megváltoztatja az nPKC δ izoforma szubcelluláris lokalizációját; a sejtmembránba, illetve a mag körüli membránstruktúrákba transzlokálván az enzimet. (A kontroll esetben tapasztalt homogén citoszólikus festődés szinte teljesen eltűnt!) A sebocytákban jelentős mennyiségben kifejeződő másik két izoforma (cPKC α , aPKC ζ) esetében ugyanakkor nem tapasztaltunk transzlokációt. Az nPKC δ AA általi aktivációjának másik bizonyítékát a 10. ábra Western blot felvételei, valamint az immunjelekhez tartozó denzitometriás analízis eredményei szolgáltatták (utóbbi az immunjelek felett számszerűen

jelölve). Az ábrákon látható, hogy a hosszútávú (max. 3 nap) AA kezelés a fenti izoformák közül kizárólag az nPKC δ expresszióját csökkenti le szignifikánsan, míg a másik két izoforma kifejeződését nem változtatja meg jelentősen. Mindezek alapján tehát elmondható, hogy a jelentős celluláris expressziós szintet mutató PKC izoformák (cPKC α , nPKC δ és aPKC ζ) közül az AA szelektíven aktiválja a nPKC δ izoformát.

Az nPKC δ részt vesz az AA celluláris hatásainak szignáltranszdukciós útvonalában

Ezt követően arra voltunk kíváncsiak, hogy az AA-kezelés hatására történő (több módszerrel is bizonyítható) aktiváción túl, vajon valóban kimutatható-e az nPKC δ izoforma részvétele az AA sejtszintű hatásainak (lipidszintézis-fokozás, apoptózis-indukció) jelátviteli folyamatában. Ezért a korábban megismert, és bizonyítottan hatékony (lásd 11. ábra), RNS interferencia technika ismételt felhasználásával az AA esetében is elvégeztük a „géncsendesített” sebocyták sejtfolymataira irányuló célzott funkcionális vizsgálatainkat (lipidtartalom meghatározás, apoptotikus-nekrotikus folyamatok mérése). A 14.A ábrán látható, hogy (a korábbi farmakológiai eredményekkel összhangban) az nPKC δ expresszióját csökkentő „géncsendesítés” eredményeképpen az AA nem volt képes (teljes mértékben) kifejteni lipidszintézis-fokozó celluláris hatását; míg ezzel ellentétben a cPKC α szelektív „lecsendesítése” nem befolyásolta ezt a folyamatot. Mindezek alapján tehát elmondható, hogy az nPKC δ valóban részt vesz az AA lipidszintézis-fokozó hatásának jelátviteli útvonalában. A lipidtermelésre vonatkozó megállapításokon túl az nPKC δ -ról az is bebizonyosodott, hogy részt vesz az AA másik fontos celluláris hatásának jelátviteli mechanizmusában is, hiszen a δ izoenzim kifejeződésének szelektív gátlása csaknem teljes mértékben kivédte az lipidmediátor apoptózist indukáló hatását is (14.B ábra). Az ábrán jól látható, hogy az AA-kezelés hatására a kontroll sejtekben bekövetkező mitokondriális membránpotenciálcsökkenés (korai apoptózismarker) nem volt megfigyelhető az nPKC δ -specifikus siRNS-sel transzfektált sejtek esetében.

Ezen felül az ábrán az is jól látható, hogy az aPKC ζ -t csökkent mértékben expresszáló „géncsendesített” sejtekben az AA képes tovább fokozni a már amúgy is jelentősen felfokozott (bazális) lipidtermelést (14.A ábra). Ugyanakkor ezen sejtpopulációk esetében valószínűleg már olyan kifejezett volt az apoptózis (vagyis annyira lecsökkent a mitokondriális membránpotenciál), hogy az AA kezelés már nem volt képes további apoptózis-fokozódást indukálni (14.B ábra).

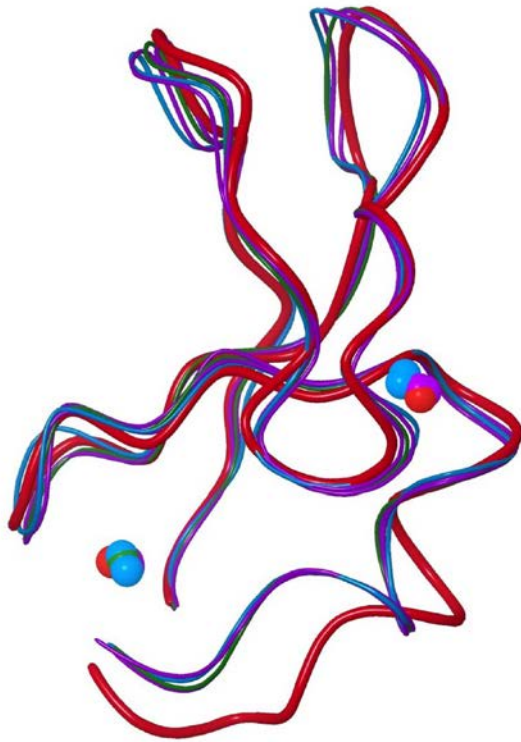


14. ábra. Az *nPKCδ* részt vesz az AA lipidszintézisfokozó és apoptózist indukáló celluláris hatásainak jelátvitelében. Az SZ95 sebocyták különböző PKC izoformáinak (*cPKCα*, *nPKCδ* és *aPKCζ*) szelektív „gécnsendesítése” (RNSi) után (a 2. naptól) a sejteket 50 μM AA-val kezeltük, 48 órán keresztül. Ezután meghatároztuk (A) az intracelluláris lipidtartalmat (Nile-Red, FLIPR), valamint (B) az apoptózis mértékét (DilC₁(5), FLIPR). Az átlag ± SEM formában megadott eredményeket a „scrambled” siRNS-sel (Scr. si) transzfektált, kezeletlen (AA-val nem kezelt) sejtek százalékában fejeztük ki (amelyet az x-tengellyel párhuzamos, folytonos vonal jelöl), N=4. A kezeletlen Scr. si csoporthoz képest szignifikáns eltérést ($p < 0.05$) „*” jelöli, az AA-val kezelt Scr. si kontrollhoz képest szignifikáns ($p < 0.05$) eltérést pedig „#”. A Scr. si RNS-sel transzfektált csoport nem mutatott különbséget az azonos kezelési sémáknak alávetett, nem-transzfektált SZ95 sejtekhez képest (nincs feltüntetve).

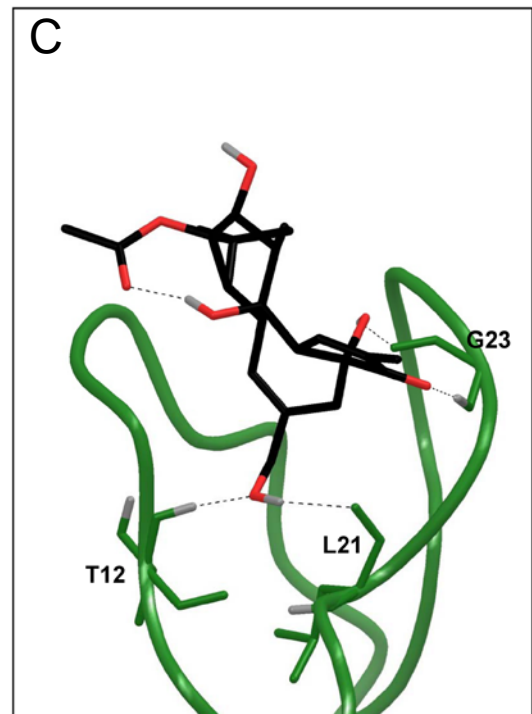
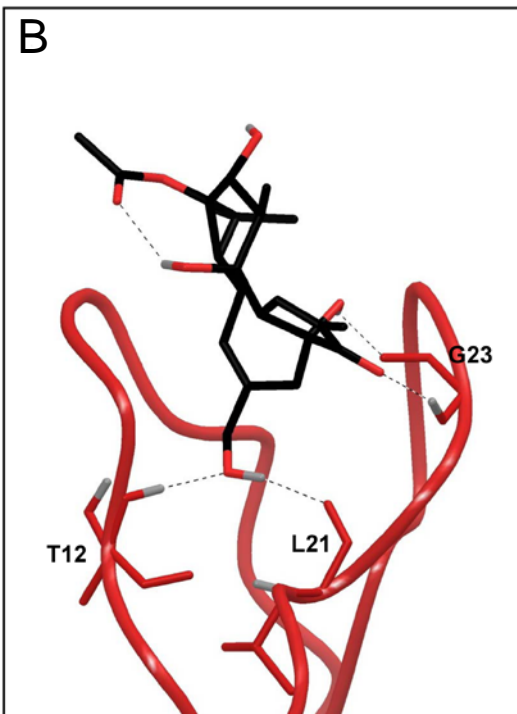
Az izolált Vav1 C1 domén a megfelelő szerkezetű kötőhely birtokában sem köt forbol-észtert

A legújabb röntgenkristallográfiás mérések tanúsága szerint meglepően nagy a szerkezeti homológia a forbol-észtereket nagy affinitással kötő PKCδ C1b, valamint a Vav1 molekula C1 doménjának ligandkötőhelye között [137]. A ligandaffinitás szempontjából meghatározó jelentőségű geometriai struktúra (15.A ábra) konzerválódása azt sejteti, hogy, a PKCδ C1b-hez hasonlóan, a Vav1 C1 is képes lehet DAG/forbol-észterek megkötésére.

A



15. ábra: A Vav1 C1 domén háromdimenziós szerkezete nagyfokú homológiát mutat a PKCδ C1b szerkezetével. A: A Vav1 C1 doménjának térszerkezeti modelljeit (zöld, kék, lila) a PKCδ C1b (piros) alapvázára vetítettük, hogy a strukturális hasonlóságokat érzékeltethessük. (A protein adatbázisban (PDB) szereplő mindhárom Vav1 kristályszerkezetet felhasználtuk; PDB azonosítók: 2VRW-zöld szín; 3KY9-kék szín; és 3BJI-lila szín). A C1 alapvázakat alkotó aminosavakat (PKCδ:231-274; Vav1: 516-559) egymás mellé igazítva jól látszik, hogy a két C1 domén ligandkötőhelyének felépítése lényegében teljesen identikus, és a ligandkötőhelyet alkotó N- és C-terminális hurkok között létrejövő kötőzseb is egyforma nagyságú. (A két struktúra közötti kis különbséget csak a C-terminális α-hélix dőlésszöge adja, azonban ez nem befolyásolja a ligandkötőhely felépítését.) B és C: A forbol-13-acetát bekötődése az nPKCδ C1b (B) és a Vav1 C1 (C) kötőhelyére. A ligand molekula és a kötőhelyet alkotó aminosavak között kialakuló hidrogénkötéseket szaggatott vonallal jelöltük..



Felmerül tehát: Vajon valóban alkalmas a Vav1 C1 ligandkötőhelye ezen molekulák megkötésére? A kérdés megválaszolásához elsőként molekuláris szerkezeti modelleket hívtunk segítségül. A PKCδ C1b és annak kötőhelyére illeszkedő forbol-13-acetát (forbol-

észter) molekula receptor-ligand komplexét leíró [131] kristályszerkezeti modellből ("virtuálisan") kiemeltük a forbol-észter ligandot, majd beillesztettük a Vav1 C1 identikus kötőzsebébe (a Vav1 C1 térszerkezetét a legnagyobb felbontású krisztallográfiás struktúra alapján modelleztük [137]). Az 15.C ábrán látható szerkezeti modell alapján megállapítható, hogy a Vav1 C1 esetében is fennáll annak a lehetősége, hogy a forbol-13-acetát a megfelelő orientációban illeszkedjen be a domén feltételezett ligandkötőhelyére, hiszen a liganddal hidrogénkötészet létesítő aminosavak (T12, L21, G23) teljesen azonosak a PKC δ -nál találhatóakkal (15.B ábra). Emellett a forbol-észter kötődés következtében kialakuló intra-, illetve intermolekuláris hidrogénkötések mintázata is teljesen analóg a PKC δ C1b esetében tapasztalt mintázattal. A 15.A ábrán látható megdöbentő szerkezeti homológia, valamint a forbol-13-acetátnak a ligandkötőhelyre való optimális beilleszkedési lehetősége (15.C ábra) alapján felmerül, hogy a Vav1 képes lehet DAG/forbol-észterek megkötésére.

A nyilvánvaló szerkezeti homológia ellenére, a Vav1 ligandaffinitását vizsgáló korábbi kísérletek [162] nem találtak a molekula DAG/forbol-észter-kötésére utaló bizonyítékokat. Ezen ellentmondás egyik lehetséges magyarázataként felmerülhet, hogy a C1 domén a Vav1 protein belsejében helyezkedik el (nem pedig a molekula külső felszínén), így a domén feltételezett ligandkötőhelye nem elérhető a megfelelő ligandok számára, mivel egyéb domének elfedik azt. A C1 domén kötőhelyének ilyesfajta „leárnyékolására” az irodalomban is akad példa, mégpedig a β 2-chimaerin [180], illetve a PKC β [181] esetében; habár ez a hatás egyik molekula esetében sem gátolja meg teljes mértékben a ligandkötődést.

Mindezek miatt elsőként azt szeretnénk volna tisztázni, hogy vajon a fent említett proteineknél tapasztalt „leárnyékoláshoz” hasonló jelenség okozhat-e a teljes nagyságú Vav1 molekulánál is csökkent ligandaffinitást. Ezért első kísérletünkben, rekombináns géntechnológia segítségével, izolált proteinfragmentumként állítottuk elő a Vav1 C1 doménjét. Az izolált C1 domént bakteriális expressziós vektorba klónoztuk (pGEX), majd GST-fúziós proteinként fejeztettük ki. A tisztított, rekombináns Vav1-C1-GST ligandkötő képességét *in vitro* [3 H]PDBu-kötési vizsgálat segítségével határoztuk meg. A nagy affinitású DAG/forbol-észter receptor, a PKC δ C1b szolgált pozitív kontrollként ezen kísérlet során. Azonos kísérleti körülmények között vizsgálva a két tisztított C1 fragmentum (PKC δ -C1b-GST és Vav1-C1-GST) ligandkötését, a Vav1 esetében nem találtunk [3 H]PDBu-kötésre utaló bizonyítékot, még igen magas (a PKC δ C1b doménjának koncentrációját sokszorosán felülmúló, 1-2 mM-os) receptorkoncentráció esetében sem (adatokat nem tüntettünk fel).

Mivel a bakteriális rendszerben expresszált és tisztított protein molekulák nem megfelelő „folding”-ja gyakori probléma ezen módszerek használata során, ezért a

következőekben szeretnénk volna kizárni annak a lehetőségét, hogy a ligandkötési vizsgálatokat, a bakteriális expresszió és a tisztítás során felmerülő esetleges hibalehetőségek miatt, tévesen interpretáljuk. Ezért a a ligandaffinitást eukarióta sejtekben is megvizsgáltuk. Az izolált Vav1 C1 domént, N-terminális GFP-„tag”-et kódoló eukarióta expressziós vektorba klónoztuk, majd pedig a rekombináns plazmidot LNCaP sejtekbe transzfektálva a Vav1-C1-GFP fúziós proteint intracellulárisan expresszáltattuk. A DAG/forbol-észter-szenzitív proteinek (típusos C1 domént tartalmazó fehérjék) a ligandokkal történő interakció hatására (az aktivációs mechanizmus részeként) a sejtmembránba illetve egyéb intracelluláris membránokba (magmaembrán, ER stb.) transzlokálnak; ezért ezen redisztribúciós folyamat tényének detektálása indirekt bizonyítéka a bekövetkező receptor-ligand kölcsönhatásnak. A Vav1-C1-GFP-t overexpresszáló LNCaP sejteket PMA kezelésnek vettettük alá, majd a szubcelluláris lokalizáció megváltozását „real-time” konfokális mikroszkópia segítségével követtük nyomon. A kísérletek során, pozitív kontrollként, a GFP-fúziós PKC δ C1b-t használtuk, amelynek transzlokációs sajátosságait részletesen jellemeztük több korábbi vizsgálatunk során [24,163]. A sejteket 1 μ M PMA-val kezelve, a PKC δ C1b esetében egy gyors és tranziens, sejtmembránba irányuló transzlokációt figyelhettünk meg, amelyet a sejttagon belül elhelyezkedő molekulák magmaembránba történő kihelyeződése követett (lásd 18. ábra második sor). Ezzel ellentétben, Vav1-C1-GFP esetében a 10 μ M-os PMA kezelés sem okozott detektálható transzlokációt LNCaP sejtekben (lásd 19. ábra felső sor), amely, a radioaktív ligandkötési vizsgálattal összehangban, valamint azt kiegészítve, az izolált Vav1 C1 forbol-észter-szenzitivitása ellen szól.

A Vav1 C1 domén összehasonlító szekvenciaanalízise több nem-szokványos aminosav jelenétére derített fényt a kötőhely környékén

Az izolált C1 doménnel elvégzett kísérleteink tanúsága szerint a Vav1 molekula C1 doménja nem képes forbol-észter-kötésre, annak ellenére, hogy ligandkötőhelye megőrizte a nagy affinitású C1 domén struktúrák jellegzetes szerkezeti felépítését. Ezen ellentmondás egyik lehetséges magyarázata, hogy a ligandkötőseb „falát” alkotó (vagy annak közvetlen szomszédságában elhelyezkedő) aminosavak közül egyesek gátolhatják a receptor-ligand interakció létrejöttét. Feltevésünk szerint ennek a gátló hatásnak a legvalószínűbb mechanizmusai a következők lehetnek: *i)* Egyes aminosav-oldalláncok, bizonyos konformációkban, elfoglalhatják a kötőhely belsejét, kiszorítván onnan a megfelelő

ligandokat. *ii*) A szóban forgó aminosavak a kötőhely belsejét szabadon hagyják ugyan a ligandok számára, viszont akadályozzák a C1 doménnek a membrán lipidjeihez történő kötődését; így megghiúsítják a molekula aktivációs mechanizmusának egyik legfontosabb lépését, nevezetesen a receptor-ligand-membrán hármaskomplexének létrejöttét, amely (a bevezetőben említettek szerint) alapvető feltétele a stabil ligandkötésnek és az enzimaktivációt előidéző konformáció kialakításának. A két lehetőség bármelyikének megvalósulása esetén, ezen nem szokványos (az adott pozícióban csak a Vav1 molekula C1 doménjében előforduló) aminosavak az alapvető geometriai szerkezet megváltoztatása nélkül is képesek lehetnek a ligandaffinitás jelentős csökkentésére. Korábbi vizsgálatok során, az atípusos PKC izoformák (αPKCζ és ι) esetében sikerült kimutatnunk az itt felvázolt jelenséget, így molekuláris szintű magyarázatot találni ezen PKC izoformák forbol-észter-szenzitivitásának hiányára. (Részletesen lásd a „Bevezetés” fejezetben [24]).

A Vav1 C1 doménjának szekvenciaanalízisét a 16. ábrán tüntettük fel, amelynek legfelső sorában a jellegzetes C1 motívum (HX₁₂CX₂CX_nCX₂CX₄HX₂CX₇C, részletesen lásd: „Bevezetés”) látható. Az erősen konzerválódott hisztidin és cisztein molekulákat szürke háttérrel emeltük ki [12]. A következőkben az egyes C1 doméneket alkotó aminosavakat a doménen belül elfoglalt pozíciójuk alapján fogjuk számozni, nem pedig a teljes proteinen belül elfoglalt tényleges aminosavsorrend alapján. Ezzel a módszerrel a különböző C1 domének könnyebben összehasonlíthatóvá válnak és a szekvenciaanalízis eredménye könnyebben interpretálható. Például: a domén N-terminális végén elhelyezkedő, általunk His¹-ként jelölt aminosav, a teljes proteinen belül elfoglalt pozíció alapján, a Vav1-nél a His⁵¹⁶-nak, a PKCδ esetében pedig a His²³¹-nek (C1b domén) felel meg.

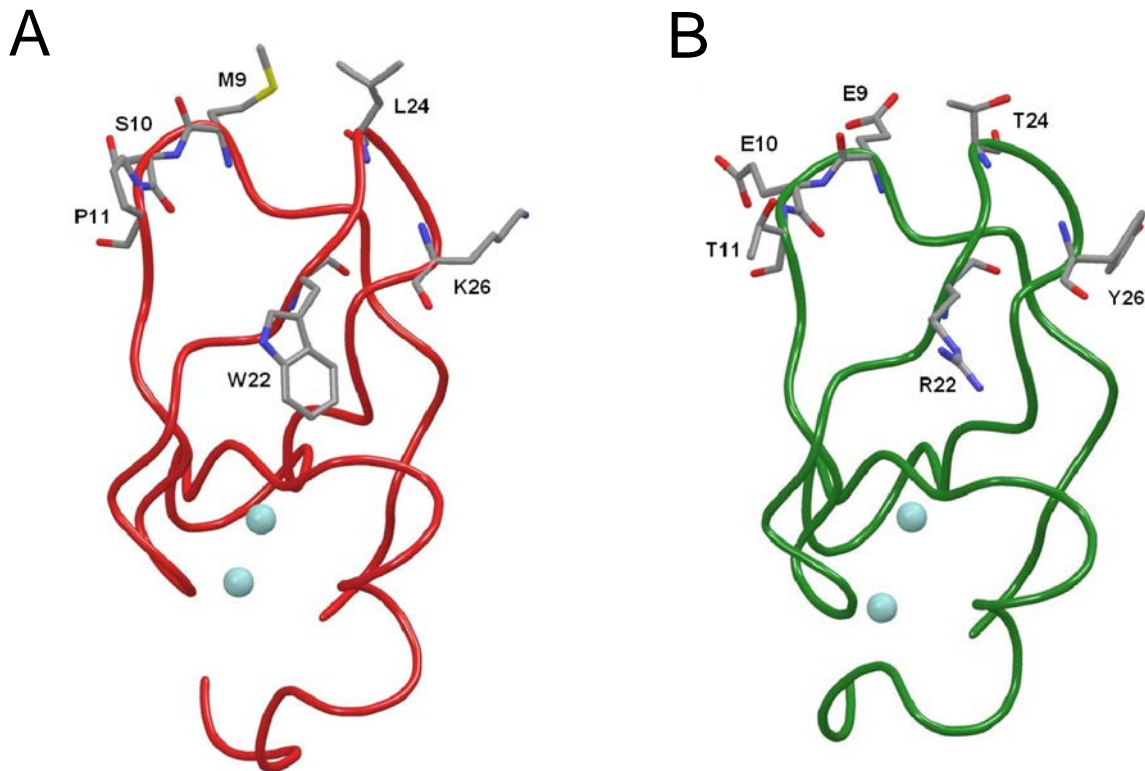
Az elvégzett átfogó szekvenciaanalízis során az atípusos Vav1 C1 domént az irodalomban eddig leírt, összes típusos (tehát DAG/forbol-észter-érzékeny) C1 domén szekvenciájával összehasonlítottuk (16. ábra). Elemzésünk számos olyan egyedi aminosav jelenlétét mutatta ki a Vav1 C1 domén szekvenciájában, amelyek felelősek lehetnek a ligandaffinitás csökkenéséért. A 17.B ábrán látható, hogy ezen nem-szokványos aminosavak közül hat (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Arg²², Thr²⁴ és Tyr²⁶) a feltételezett ligandkötőseb peremén vagy annak közelében helyezkedik el.

Az irodalomban számos tanulmány utal a ligandkötőhely peremén elhelyezkedő hidrofób aminosavak fontosságára. A kötősebet alkotó két peptidhurok „csúcsi” részén (9-12-es pozíció az N-terminális peptidhurokban, valamint a 21-24-es pozíciók a C-terminális hurok esetében) található lipofil természetű aminosavak elősegítik a kötőhely felső egyharmadának a membrán lipidkettősrétegébe történő beágyazódását [13,182].

■	Bázikus karakter
■	Apoláros (hidrofób)
■	Poláros, töltéssel nem rend.
■	Savas karakter

		1	10	20	30	40	50
	C1 motívum	HXXXXXXXXXXXXCXXCXXXXXX-	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
Vav1	hVav1 C1	HDFQMFSS	E E T T S K A C Q M L L R G	-	T F Y Q G Y R C H R C R A S A H K E C L G R V P	-	P
	mVav1 C1	HDFQMFSS	E E T T S K A C Q M L L R G	-	T F Y Q G Y R C Y R C R A P A H K E C L G R V P	-	P
PKC	cPKC α C1a	HKFIARFFK	Q P T F C S H C T D F I W G	-	F G K Q G F Q C Q V C C F V V H K R C H E F V T F S C		
	cPKC β C1a	HKFTARFFK	Q P T F C S H C T D F I W G	-	F G K Q G F Q C Q V C C F V V H K R C H E F V T F S C		
	cPKC β II C1a	HKFTARFFK	Q P T F C S H C T D F I W G	-	F G K Q G F Q C Q V C C F V V H K R C H E F V T F S C		
	cPKC γ C1a	HKFTARFFK	Q P T F C S H C T D F I W G	-	L G K Q G L Q C Q V C S F V V H R R C H E F V T F E C		
	nPKC δ C1a	HEFIATFFG	Q P T F C S V C K D F V W G	-	L N K Q G Y K R Q C N A I H K K C I D K I I G R C		
	nPKC ϵ C1a	HKFMATYLR	Q P T Y C S H C R D F I W G V	-	L G K Q G Y Q C Q V C T C V V H K R C H E L I I T K C		
	nPKC η C1a	HKFMATYLR	Q P T Y C S H C R E F I W G V	-	L G K Q G Y Q C Q V C T C V V H K R C H H L I V T A C		
	nPKC θ C1a	HEFTATFFG	Q P T F C S V C H E F V W G	-	L N K Q G Y Q C R Q C N A I H K K C I D K V I A K C		
	cPKC α C1b	HKFKIHTY	G S P T F C D H C G S L L Y G	-	L I H Q G M K C D T C D M N V H K Q C V I N V P S L C		
	cPKC β C1b	HKFKIHTY	S S P T F C D H C G S L L Y G	-	L I H Q G M K C D T C M M N V H K R C V M N V P S L C		
	cPKC β II C1b	HKFKIHTY	S S P T F C D H C G S L L Y G	-	L I H Q G M K C D T C M M N V H K R C V M N V P S L C		
	cPKC γ C1b	HKFRLHSY	S S P T F C D H C G S L L Y G	-	L V H Q G M K C S C E M N V H R R C V R S V P S L C		
	nPKC δ C1b	HRFKVHNY	M S P T F C D H C G S L L W G	-	L V K Q G L K C E D C G M N V H H K C R E K V A N L C		
	nPKC ϵ C1b	HKFGIHNY	K V P T F C D H C G S L L W G	-	L L R Q G L Q C K V C K M N V H R R C E T N V A P N C		
	nPKC η C1b	HKFSIHNY	K V P T F C D H C G S L L W G	-	I M R Q G L Q C K I C K M N V H I R C Q A N V A P N C		
	nPKC θ C1b	HRFKVYNY	K S P T F C E H C G T L L W G	-	L A R Q G L K C D A C G M N V H R C Q T K V A N L C		
MRCK	MRCK α	HQFFVKSFT	T T P T K C H Q C T S L M V G	-	L I R Q G C S C E V C G F S C H I T C V N K A P T T C		
	MRCK β	HQFSIKSF	S S P T Q C S H C T S L M V G	-	L I R Q G Y A C E V C S F A C H V S C K D G A P Q V C		
	MRCK γ	HTLRPRSF	P S P T K C L R C T S L M L G	-	L G R Q G L G C D A C G Y F C H T T C A P Q A P - P C		
DAG kináz	DGK β C1a	HVWRLKHF	N K P A Y C N L C L N M L I G	-	V G K Q G L C C S F C K Y T V H E R C V A R A P P S C		
	DGK γ C1a	HAWTMKHF	K K P T Y C N F C H I M L G	-	V R K Q G L C C T Y C K Y T V H E R C V S R N I P G C		
Munc-13	Munc13-1	HNFEVWTAT	T T P T				

Az N-terminális hurok csúcsi régiójában a Vav1 C1 domén esetében két negatívan töltött glutamátot (Glu⁹ és Glu¹⁰) találunk. Habár a típusos C1 doménnel rendelkező proteineknel is megfigyelhető egy mérsékelt fokú variabilitás az ebben a pozícióban fellelhető aminosavak tulajdonságait illetően (Izd. 16. ábra), a szekvencaanalízis tanúsága szerint negatívan töltött aminosav egyetlen típusos C1 domén esetében sem fordul elő a 9-es, illetve a 10-es pozíciókban.



17. ábra: A C1 domének kötőhelye közelében létrehozott mutációk pontos lokalizációja. **A:** Az irányított mutagenézis segítségével megváltoztatásra kerülő aminosavak pontos térbeli helyzete a PKC δ C1b domén forbol-észter-kötőhelyét alkotó N- és C-terminális peptidhurokokban. (Az eredeti, mutáció előtti állapotot tüntettük fel.) **B:** Ugyanezen pozíciókban található aminosavak a Vav1 C1 doménjának ligandkötőhelyén.

Ezenfelül, ugyanezen N-terminális hurok következő pozíciójában egy treonin (Thr¹¹) molekula található. Bár a kísérletes bizonyítékok nem egyértelműek a 11-es pozícióban található prolin ligandkötésben betöltött szerepét illetően [24,183,184], kétségtelen tény, hogy a Pro¹¹ jelenléte nagymértékben konzerválódott az összes típusos C1 domén szekvencaájában. A kötőzseb másik oldalát alkotó C-terminális hurok (20-27-es pozíciókban található aminosavak) esetében három nem-szokványos aminosav (Arg²², Thr²⁴, Tyr²⁶) jelenlétét azonosítottuk a szekvencaanalízis során. A 16. ábrán látható, hogy a Vav1 C1

doménjával ellentétben gyakorlatilag az összes, típusos C1 domént tartalmazó molekula erősen hidrofób aminosavakkal rendelkezik a 22-es, illetve a 24-es pozíciókban (a PKD izoformák C1 doménjain kívül). A PKC δ esetében a hidrofób Trp²² és Leu²⁴ aminosavaknak a ligandkötésben betöltött fontos szerepét már számos tanulmány alátámasztotta [131,184-186]. Ezért felmerül a lehetősége annak, hogy a Vav1 C1-ben található hidrofíl természetű Arg²² és Thr²⁴ molekulák negatívan befolyásolják a domén ligandaffinitását. A C-terminális hurokban elhelyezkedő harmadik nem-szokványos aminosav, amely felelős lehet a csökkent ligandaffinitásért, a Tyr²⁶. A 16. ábra tanúsága szerint, majdnem mindegyik DAG/forbol-szenzitív C1 domén pozitívan töltött aminosavval rendelkezik ebben a pozícióban (Arg²⁶, Lys²⁶ vagy His²⁶). A PKC δ C1b kristályszerkezetének elemzése megmutatta, hogy a domén „középső” harmadának felszínén pozitívan töltött aminosavak csoportosulnak, közvetlenül a membránba beágyazódó „felső” harmad alatt. Ezek a bázikus aminosavak kötések alakítanak ki a membrán foszfolipid molekuláinak „feji” végén található anionos csoportokkal, ezáltal tovább erősítve a C1 domén és a membrán közötti szoros kapcsolatot [131]. A „középső” harmadban elhelyezkedő, bázikus aminosavak közül a PKC δ C1b doménjében a Lys²⁶ esik a legközelebb a ligandkötő felső harmadához (17.A ábra), ezért, nagy a valószínűsége annak, hogy részt vesz ilyen típusú (C1 domén-membrán) kötések kialakításában. Mivel a Vav1 C1 doménjának 26-os pozíciójában (a típusos C1 doménnel ellentétben) egy töltéssel nem rendelkező tirozin molekula található, ezért a fent említett ionos kötések alapuló interakciók kialakulásának csökken az esélye.

A Vav1-re jellemző aminosavakat tartalmazó PKC δ C1b mutánsok ligandaffinitása

Az egyszeres PKC δ C1b mutánsok ligandaffinitása enyhén csökkent a vad típushoz képest

A szekvenenciaanalízis során a Vav1 C1 doménjában azonosított, nem-szokványos aminosavaknak a domén ligandszenzitivitására gyakorolt potenciális negatív hatását radioaktív ligandkötés segítségével vizsgáltuk. Első megközelítésben az ismerten nagy DAG/forbol-affinitással bíró PKC δ C1b doménjában hoztunk létre Vav1-szerű mutációkat (17. ábra). A fent említett pozíciókban (9-es, 10-es, 11-es, 22-es, 24-es és 26-os) található aminosavakat, irányított mutagenézis segítségével, a Vav1 C1 domén azonos pozíciójában található aminosavakra cseréltük. Az így előállított hat darab (Vav1-szerű) egyszeres PKC δ C1b mutánst [³H]PDBu-kötési vizsgálatoknak vetettük alá. Az 1. táblázat alapján látható, hogy a hat mutáció közül öt esetében (M9E, S10E, P11T, L24T, és K26Y) detektálhattunk

enyhe (azaz mintegy 1 nagyságrendű) affinitáscsökkenést a [³H]PDBu iránt, míg a hatodik mutáció (W22R) nem változtatta meg a ligandkötési sajátosságokat.

1. táblázat: Az egyszeres és többszörös PKCδ C1b mutánsok [³H]PDBu iránti affinitása a radioaktív ligandkötődés vizsgálatok során. Az egyes C1 doméneket GST-fúziós proteinként, bakteriális expressziós rendszerben fejeztettük ki. Tisztítás után megmértük a proteinek [³H] PDBu kötését az "Anyagok és Módszerek" fejezetben leírtak szerint. A disszociációs konstansokat (K_d érték) átlag ± S.E.M. formában adtuk meg. N=3 független kísérlet alapján. NK: nincs kimutatható kötődés.

<i>Receptor (PKCδ C1b)</i>	K_d	<i>Vad-típushoz képest</i>
	<i>nM</i>	
Vad típus (WT)	0,193 ± 0,005	1 x
<i>Egyszeres mutánsok</i>		
M9E	2,11 ± 0,11	10,9 x
S10E	1,77 ± 0,06	9,1 x
P11T	1,76 ± 0,21	9,1 x
W22R	0,16 ± 0,02	0,8 x
L24T	2,63 ± 0,15	13,6 x
K26Y	0,97 ± 0,10	5,0 x
<i>Többszörös mutánsok</i>		
M9E/S10E	50,5 ± 2,1	261 x
M9E/S10E/P11T	186,1 ± 6,0	963 x
L24T/K26Y	96,4 ± 17,6	499 x
M9E/S10E/P11T/L24T/K26	NK	NK

A 9-es pozícióban lévő, erősen hidrofób metionin molekulának negatív töltéssel bíró, hidrofil glutamatra történő cseréje (M9E mutáns) 11-szeres affinitáscsökkenést okozott a vad típussal összehasonlítva ($K_d = 2,11 \pm 0,11$ nM). A töltéssel nem rendelkező, poláros szerin molekula glutamáttal történő helyettesítése (a 10-es pozícióban; S10E mutáns) az előzőhöz nagyon hasonló, 9,2-szeres szenzitivitáscsökkenést váltott ki ($K_d = 1,77 \pm 0,06$ nM). Ezek alapján elmondható, hogy bár a negatív töltéssel bíró aminosavak a PKCδ C1b domén ligandkötésének erősségét egy nagyságrenddel lecsökkentették, jelenlétük egyik pozícióban sem akadályozta meg teljes mértékben a receptor-ligand-membrán stabil komplexének létrejöttéért felelős intermolekuláris kapcsolatok kiépülését, hiszen az M9E és az S10E mutánsok esetében továbbra is számottevő PDBu-affinitást tudtunk detektálni.

A P11T mutáció hatására 9,1-szer kisebb ligandkötést mértünk ($K_d = 1,76 \pm 0,21$ nM), a vad típushoz képest. Az apoláros prolin molekula (amely a típusos C1 doménben nagymértékben konzerválódott), poláros treoninnal való helyettesítése lecsökkentette ugyan a PKC δ C1b ligandaffinitását (az előző M9E és S10E mutációk esetében tapasztaltakkal nagyjából azonos mértékben); ugyanakkor a P11T mutáns esetében fennmaradó, jelentékeny ligandszenzitivitás arra enged következtetni, hogy a (11-es) prolin molekula hiánya önmagában nem okozna drámai affinitáscsökkenést a Vav1 C1-ben, hiszen annak treoninnal való helyettesítése után is jelentős mértékű forbol-észter affinitás észlelhető (a PKC δ C1b P11T mutánsnál). Mindez összhangban van azon korábbi kísérletes megfigyelésünkkel, melynek során a PKC δ C1b Pro¹¹ molekuláját argininre cserélve mindössze 4,4-szeres affinitáscsökkenést a detektáltunk, a [³H]PDBu iránt [24]. A korábban mért affinitáscsökkenés mértéke tehát azonos léptékű a jelenlegi kísérleteink során tapasztaltakkal.

A 22-es pozícióban lévő triptofán mutációja (W22R) nem volt hatással a PKC δ C1b molekula forbol-észter-kötésére. A W22R mutáns disszociációs konstansa ($0,16 \pm 0,02$ nM) tulajdonképpen teljesen azonos a vad típus esetében mért értékkel ($0,193 \pm 0,005$ nM). Ez az eredmény jól összeegyeztethető azon korábbi megfigyelésünkkel, mely szerint a 22-es triptofán lizinre történő cseréje csak elhanyagolható mértékű ligandszenzitivitás csökkenést okozott a PKC δ C1b doménnél [185]. Ezek alapján azt a következtetést vonhattuk le, hogy, bár csaknem az összes típusos C1 domén esetében hidrofób aminosavat találunk a 22-es pozícióban (kivéve néhány PKD izoformát), a pozitív töltéssel bíró, hidrofil aminosavak jelenléte ezen a helyen semmiféle negatív következménnyel nem jár a kötőhely ligandaffinitására nézve (legalábbis a forbol-észterek tekintetében nem). Ezzel szemben, az irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy, a PDBu-affinitással ellentétben, a DAG iránti szenzitivitás nagymértékben függ a triptofán jelenlététől ebben a pozícióban [184-186].

A 24-es pozícióban lévő leucin, illetve a 26-os pozícióban lévő lizin molekulák Vav1-szerű megfelelő mutációja (L24T és K26Y) hasonló mértékű affinitáscsökkenést váltott ki, mint az előzőekben már bemutatott mutációk (kivéve W22R). Az összehasonlító szekvenenciaanalízisből (16. ábra) ugyan az derül ki, hogy gyakorlatilag egyetlen típusos C1 domén sem rendelkezik poláros aminosavval (mint a Thr²⁴) a 24-es pozícióban (ami felveti az apoláros aminosavak jelenlétének döntő fontosságát ebben a pozícióban), a kísérletes adataink azonban egyértelműen arra utalnak, hogy a poláros aminosavak jelenléte valószínűleg (ezen a helyen) sem okozna drámai affinitáscsökkenést. Ehhez hasonlóan a 26-os pozícióban elhelyezkedő bázikus aminosavak jelenléte is meghatározó jelentőségűnek tűnt a szekvenenciaadatok alapján, hiszen a tipikus C1 domének, csaknem teljesen egységes módon,

ilyen kémiai természetű aminosavakkal rendelkeznek ezen a helyen (ezen jelegzetesség alól csak a chimaerin-ek jelentenek kivételt). Ennek ellenére a bázikus természetű lizin molekula töltéssel nem rendelkező tirozinra való cseréje csupán szerény mértékű affinitáscsökkenést okozott.

Összefoglalva, a PKC δ C1b egyszeres mutánsainak affinitásvizsgálata alapján, az alábbi lényeges következtetéseket vonhatjuk le a Vav1 C1 forbol-észter-szenzitivitásának vonatkozásában. A C1 domének szekvenciáinak összehasonlítása alapján a Vav1 C1-ben identifikált, nem-szokványos aminosavaknak a PKC δ C1b doménjába juttatása (mutációk segítségével) ugyan okozott némi affinitáscsökkenést (kb. 5-10 szerez redukció, kivéve a W22R esetében). Eredményeink alapján azonban világosan látszik, hogy ezen aminosavak közül önmagában egyetlenegy sem tehető felelőssé azért, hogy a Vav1 C1 molekula gyakorlatilag egyáltalán nem képes forbol-észter kötésre.

Az öt Vav1-szerű mutáció kombinációja drasztikusan lecsökkenti a PKC δ C1b domén PDBu iránti affinitását

Adataink alapján ugyanakkor az is valószínűsíthető, hogy a forbol-észter-affinitás teljes hiányát az egyes aminosavak (önmagukban relatíve csekély) negatív hatásainak összegződése okozhatja, ami által az önmagukban szerény strukturális hatások olyan jelentős gátló tényezővé válnak (a receptor-ligand-membrán hármas komplexének intermolekuláris kapcsolatrendszerében), amely már elegendő lehet a Vav1 C1 teljes válaszképtelenségének kiváltásához. A következő kísérleteinkben ezen hipotézisünknek szeretnénk volna utánajárni.

A fent említett mutációk azonos konstrukton belüli kombinációjával azt kívántuk megvizsgálni, hogy az önmagukban csekély affinitásváltozást okozó aminosavak együttes jelenléte milyen mértékű szenzitivitáscsökkenést képes indukálni. Ezért dupla, tripla és ötszörös PKC δ C1b mutánsokat állítottunk elő (lásd 1. táblázat), amelyek a fent említett kitüntetett pozíciókban Vav1-szerű aminosavak különböző kombinációit tartalmazták. Mivel a 22-es pozícióban létrehozott W22R mutáció nem volt hatással a domén PDBu affinitására, ezért ezt a mutációt a többszörös mutánsok esetében nem vizsgáltuk tovább. Az 1. táblázat alapján megállapítható, hogy amennyiben a ligandkötőzseb két oldalát alkotó N- és C-terminális peptidhurok „csúcsi” részeiben dupla mutációkat hoztunk létre, úgy mindkét hurok esetében jelentős affinitáscsökkenést mérhettünk. A C-terminális hurkon létrehozott L24T/K26 mutáció esetében ez a redukció kifejezettebbnek adódott (499-szeres csökkenés a vad típushoz viszonyítva), mint az N-terminális hurok M9E/S10E mutációja esetében (261-

szeres csökkenés a vad típushoz viszonyítva), bár a csökkenés mértéke tulajdonképpen azonos tartományba esett mindkettőjüknél. Érdekes módon az affinitáscsökkenés mindkét dupla mutáns esetében nagyobbak adódtak, mint a megfelelő egyszeres mutánsok esetében mért redukciók szorzata. Például az L24T mutáns esetén 13,6-szoros csökkenést, a K26Y mutánsnál pedig 5-szörös csökkenést mértünk a vad típushoz képest; azaz az affinitáscsökkenések szorzata alapján kb. 70-szeres redukciót prognosztizálhattunk az L24T/K26Y mutánsnál, de valójában 499-szeres csökkenést mértünk a vad típushoz képest. Ez azt mutatja, hogy a Vav1 C1-ben elhelyezkedő nem-szokványos aminosavak együttes jelenlétének a ligandaffinitásra kifejtett összetett hatását nem lehet egyszerűen, az egyszeres mutánsok szenzitivitáscsökkenése alapján előrejelezni.

Az N-terminális peptidhurkon létrehozott tripla mutáció (M9E/S10E/P11T) még tovább fokozta a PKC δ C1b affinitáscsökkenését (963-szoros redukció a vad típushoz képest), bár a P11T mutáció bevezetése nem okozott olyan mértékű (további) affinitáscsökkenést, mint ahogy azt a dupla mutánsok eredményei alapján vártuk volna. Végezetül bebizonyosodott, hogy az öt mutáció együttes jelenléte mellett gyakorlatilag semmiféle PDBu-kötődést sem tudtunk detektálni a PKC δ C1b doménál. Ez tulajdonképpen azt jelenti, hogy az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között az ötszörös mutáns (M9E/S10E/P11T/L24T/K26) forbol-észter affinitása több mint öt nagyságrenddel (10^5) csökkent le a vad típushoz képest (azaz az ötszörös mutáns a 10 μ M-os koncentrációtartományban sem képes [3 H]PDBu kötésre, szemben a vad típus szubnanomoláris érzékenységével).

Mindezek alapján tehát elmondható, hogy a szekvenenciaanalízis során azonosított öt nem-szokványos aminosav (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Arg²², Thr²⁴, and Tyr²⁶) együttes jelenléte a Vav1 C1 feltételezett ligandkötőzsebének környezetében már megfelelő nagyságú gátló tényezőt képviselhet ahhoz, hogy a Vav1 molekula forbol-észterek iránti teljes válaszképtelenségére indokkal szolgáljon.

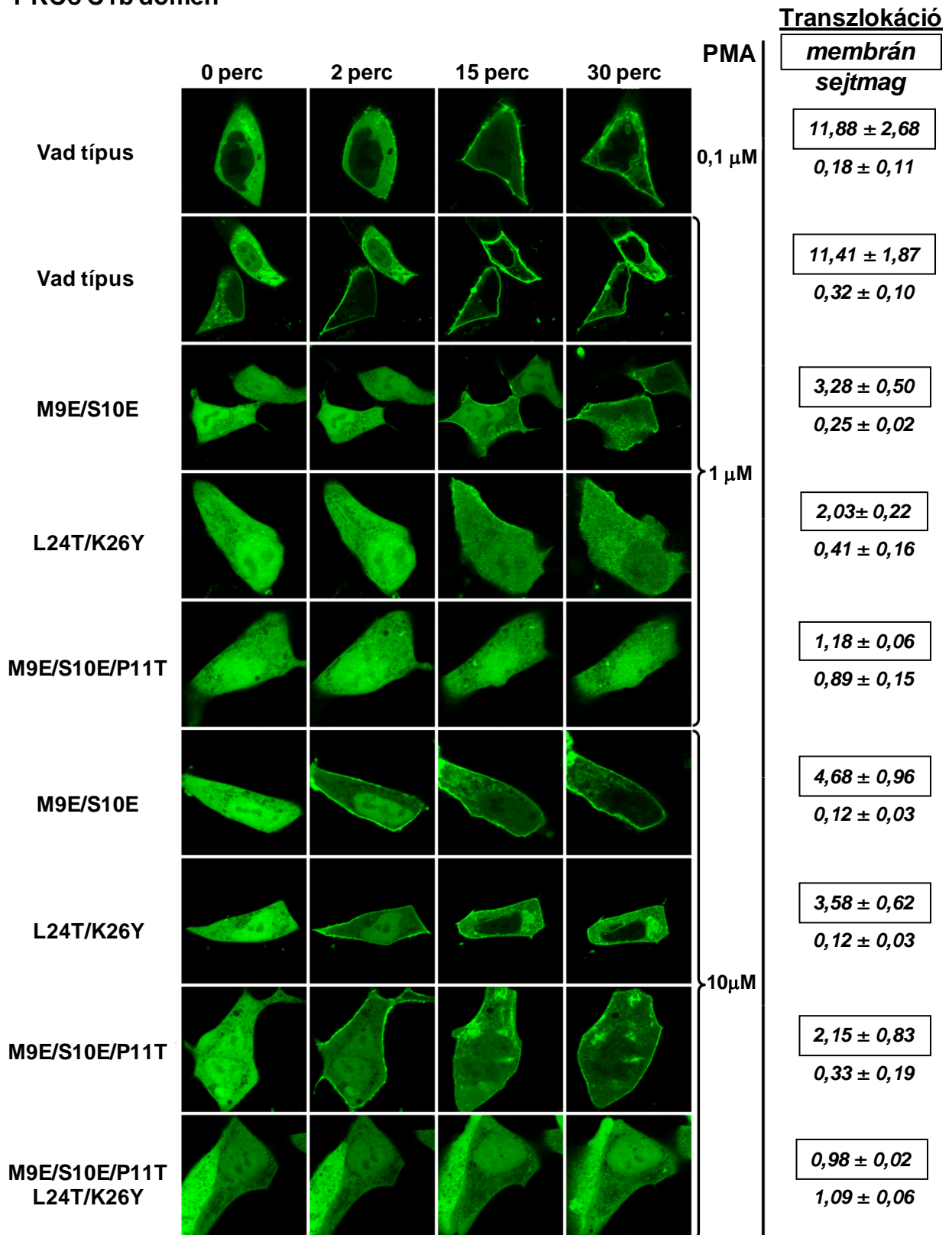
A transzlokációs kísérletek a radioaktív ligandkötési vizsgálatokhoz hasonló ligandaffinitáscsökkenést mutatnak a PKC δ C1b mutánsoknál

A következő kísérletünkben azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a fent említett mutációk hogyan befolyásolják a PKC δ C1b forbol-észterre adott válaszát az intracelluláris környezetben. Ehhez LNCaP sejteket transzfektáltunk a megfelelő mutációkat tartalmazó PKC δ C1b konstruktok GFP-jelölt változataival, majd vizsgáltuk a különböző koncentrációjú (0,1-10 μ M) PMA kezelés hatására bekövetkező membrántranszlokációs válaszokat. A 18.

ábrán látható konfokális mikroszkópos felvételek egy-egy reprezentatív kísérletet ábrázolnak. A citoplazmából a sejtmembránba, illetve a nukleoplazmából a magmembrán felé irányuló transzlokációs folyamatok mértékét az azonos körülmények között vizsgált replikátumok (3-5 minden esetben) maximális transzlokációjának átlagával jellemeztük, majd az értékeket az összetartozó képek mellett tüntettük fel. (A kvantifikálás módszerének leírását lásd az „Anyagok és módszerek” fejezetben).

A 18. ábrán látható, hogy 1 μM PMA hozzáadása után a vad típusú PKC δ C1b gyorsan a plazmamembránba transzlokál, amelyet a magmembránba történő áthelyeződés követ. A plazmamembránba irányuló redisztribúciós folyamat következtében a citoszol 5-7 perc alatt csaknem teljesen „kiürül” (nincs feltüntetve), míg a magmembránba történő áthelyeződés körülbelül 10-15 perc alatt válik teljessé. (Megjegyzés: elvileg felmerül a lehetősége a nukleoplazmából a plazma membránba illetve a citoszolból a magmembránba történő transzlokációnak is, de az egyszerűség kedvéért ezeket a lehetőségeket a továbbiak során figyelmen kívül hagytuk). Ezt követően, mintegy 15-20 perccel a ligand hozzáadása után, a fluoreszcens szignál kezd újra megjelenni a citoszolban (jelezvén a membrántranszlokáció tranziens voltát) és a 30. percben már ismét markáns expresszió detektálható a citoszolban. A vad típusú molekula transzlokációjának dinamikája egyértelmű összefüggést mutatott az alkalmazott PMA koncentrációjával; azaz amennyiben a ligand koncentrációját csökkentettük, a transzlokáció sebessége is mérséklődött. 0,1 μM PMA hatására csak nagyon gyenge transzlokációt észleltünk 2-5 perc után, és a plazmamembránba történő áthelyeződés 15 perc után vált csak igazán markánssá (ellentétben az előbb említett 1 μM -os kezelés kapcsán tapasztaltakkal). Ugyanakkor a PMA koncentrációját 10 μM -ra emelve (nincs feltüntetve) már 2 perc után csaknem teljes redisztribúciót láthattunk a citoszolból a sejtmembrán irányába, majd ezzel párhuzamosan megindult az áthelyeződés a magmembrán felé is (amelyet az 1 μM -os kezelés esetén csak később észleltünk). Ezenfelül a fluoreszcens szignál citoszolba történő visszatérése is hamarabb következett be, mint az 1 μM -os kezelés esetében (kb. 10-15 perc után). A vad típusú PKC δ C1b-vel elvégzett transzlokációs kísérletek tanúsága szerint tehát az áthelyeződés dinamikája egyértelmű összefüggést mutat az alkalmazott PMA koncentrációjával.

PKCδ C1b domén



← **18. ábra: A GFP-jelölt PKC δ C1b mutánsok intracelluláris transzlokációjának dinamikája PMA kezelés után LNCaP sejtekben.** A vad típusú PKC δ C1b-t, illetve a különböző PKC δ C1b mutánsokat expresszáló sejteket PMA-val kezeltük (0,1-10 μ M), majd a forbol-észter hatására bekövetkező transzlokációt konfokális mikroszkópia segítségével követtük nyomon. A PMA hozzáadása után 30 mp-ként készítettünk felvételeket. Az ábrákon a kezelés előtti állapot (0.perc), és a kezelés utáni 2., 15., és 30. perc reprezentatív felvételeit (3-5 kísérlet jellemző mintázata) tüntettük fel. Az egyes sorozatfelvételeken belül az adott fehérje maximális transzlokációját a legnagyobb sejtmembrán/citoplazma jelintenzitás-hányadosnövekedés („membrán”), illetve a legnagyobb sejtmag/(sejtmembrán+citoplazma) hányadoscsökkenés („sejtmag”) adta, amelyeket a kezelés előtti állapotra normálva adtunk meg. Az azonos kezelési protokollhoz tartozó replikátumok maximális transzlokációjának értékeit („membrán” vagy „sejtmag”) átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel.

A [3 H]PDBu-kötési vizsgálatok során 260-szoros affinitáscsökkenést mutató M9E/S10E dupla mutáns a transzlokációs kísérletek során is sokkal kisebb PMA-szenzitivitást mutatott, mint az előzőekben bemutatott vad típusú molekula. A dupla mutáns egyáltalán nem reagált (transzlokációval) a 0,1 μ M koncentrációban alkalmazott PMA-ra (nincs feltüntetve), emellett az 1 μ M-os ligandkoncentráció esetében is csak egy gyenge sejtmembránba történő átrendeződést detektálhattunk 15-30 perc után (amit nagyon csekély magon belüli redisztribúció kísért) (18. ábra, harmadik sor). A PMA koncentrációját 10 μ M-ra emelve (18. ábra hatodik sor) ugyanakkor már egy sokkal gyorsabb kinetikájú és jelentősebb nagyságú választ kaptunk, mely tulajdonságait tekintve hasonlított a vad típus esetében 0,1 μ M-os ligandkoncentrációnál detektált transzlokációs dinamikához: *i*) a sejtmembránba történő áthelyeződés első jelei kb. 2 perc után váltak láthatóvá; *ii*) sokkal kifejezettebb (bár nem teljes) transzlokációt detektálhattunk a későbbi időpontokban; *iii*) a sejtmagon belül is megfigyelhettünk egy jelentősebb mértékű redisztribúciót 20-30 percnél. A másik dupla mutáns (L24T/K26Y) transzlokációs mintázata is nagyban hasonlított az M9E/S10E esetében észlelt kinetikához (18. ábra negyedik és hetedik sor). Ezek az eredmények tehát alátámasztják az *in vitro* kísérletek során a két dupla mutánsnál mért két-három nagyságrendnyi (M9E/S10E: 260-szoros, illetve L24T/K26Y: 498-szoros) affinitáscsökkenést.

A dupla mutánsokkal összehasonlítva az előző, *in vitro* kísérletek tanúsága szerint a tripla mutáns (M9E/S10E/P11) affinitását még jelentősebb csökkenés jellemezte. Ezzel összhangban, a tripla mutáns a transzlokációs kísérletek során is csak alig detektálható mértékű membrán-áthelyeződést mutatott 1 μ M PMA kezelés hatására (18. ábra ötödik sor). Ugyanakkor, a dupla mutánsokhoz hasonlóan, meglehetősen gyors és viszonylag jelentékeny mértékű transzlokáció jellemezte a 10 μ M-os ligandkoncentráció hatására bekövetkező választ (18. ábra nyolcadik sor). A ligand hozzáadása után kb. 2 perccel ugyanis már

detektálható volt némi plazmamembrán felé irányuló áthelyeződés, majd a későbbiekben (20-30. percnél) még némi részleges redisztribúciót is megfigyelhettünk a sejtmagon belül. Mindezek egyfelől összhangban vannak az *in vitro* kísérletekben kapott 960-szoros affinitáscsökkenéssel, másfelől azt is jól demonstrálják, hogy egy csekély mértékű forbol-észter szenzitivitás *in vivo* (LNCaP sejtekben) is kimutatható a tripla mutánsnál (hasonlóan az *in vitro* vizsgálatokban tapasztalt alacsony [³H]PDBu-affinitáshoz).

A dupla és tripla mutánsokkal ellentétben, az ötszörös mutáns (M9E/S10E/P11/L24T/K26Y) esetében egyáltalán nem tapasztaltunk transzlokációt PMA kezelés után (18. ábra kilencedik sor). Az általunk alkalmazott koncentrációtartományban (0,1 μM-10 μM) az ötszörös mutáns egyáltalán nem reagált forbol-észter ligandra, jó összhangban az *in vitro* ligandkötődés esetében kapott eredménnyel (lásd 1. táblázat). (A 10 μM felletti ligandkoncentrációk az alapvető sejtstruktúrák olyan mértékű dezorganizációját váltották ki, hogy a molekulák transzlokációjának vizsgálatára már nem nyílt lehetőségünk.)

Összefoglalva megállapítható, hogy a PKCδ C1b mutánsok intracelluláris transzlokációjának vizsgálatára irányuló kísérleteink is alátámasztják azt a fontos felismerést, hogy a ligandkötősebb környezetében elhelyezkedő, öt nem-szokványos aminosav jelentősen hozzájárulhat a Vav1 C1 forbol-észterek iránti válaszképtelenségéhez.

A PKCδ-szerű mutációkat tartalmazó izolált Vav1 C1 ligandszenzitivitásának jellemzése

Az öt PKCδ-szerű mutáció hatására a Vav1 C1 nagy affinitású forbol-receptorra „vált”

Bár a PKCδ C1b doménjának (Vav1-szerű) mutánsaival elvégzett kísérletek azt sugallták, hogy a szekvenenciaanalízis során identifikált, öt nem-szokványos aminosav jelenléte okozza a Vav1 C1 teljes válaszképtelenségét, egyéb aminosavak szerepe sem zárható ki a csökkent ligandszenzitivitás háttérében. Ezt a kérdést a következőképpen szerettük volna megvizsgálni: a vad típusú Vav1 C1-ben létrehoztunk öt, ún. „fordított”, mutációt (E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K). Ezek a mutációk tulajdonképpen ugyanazokat a pozíciókat érintették, mint a PKCδ C1b mutánsoknál (azaz 9-es, 10-es, 11-es, 24-es és 26-os), de ebben az esetben a Vav1 C1 szekvenciájába kerültek beépítésre olyan aminosavak, amelyek eredetileg a vad típusú PKCδ C1b doménban fordulnak elő. Azaz a korábbi mutációk „megfordításával” olyan Vav1 C1 mutánst kaptunk, amely öt PKCδ-szerű aminosavval rendelkezett a fent említett, nem-szokványos aminosavak helyett. Ezt az ötszörös mutánst először GST-fúziós proteinként expresszáltattuk baktériumokban, majd a tisztított fehérjét *in*

in vitro [³H]PDBu-kötési vizsgálatoknak vetettük alá. Azt a megdöbbentő eredményt kaptuk, hogy az öt mutáció hatására a Vav1 C1 molekula képessé vált [³H]PDBu kötésére; még hozzá nagyon jelentős affinitással ($K_d = 1,05 \pm 0,15$ nM) (2. táblázat), amely majdnem teljesen megegyezett a vad típusú PKC δ C1b disszociációs konstansával ($K_d=0,193 \pm 0,005$ nM) (1. táblázat). Ezek alapján tehát elmondható, hogy sikerült azonosítanunk a Vav1 C1 forbolészter iránti válaszképtelenségéért felelős (csaknem) valamennyi fontos aminosavat. A fennmaradó csekély mértékű (5-szörös), a vad típusú PKC δ C1b és a Vav1 C1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K között fellálló affinitáskülönbséget, nagy valószínűséggel, még egy további nem-szokványos aminosav jelenléte okozhatja.

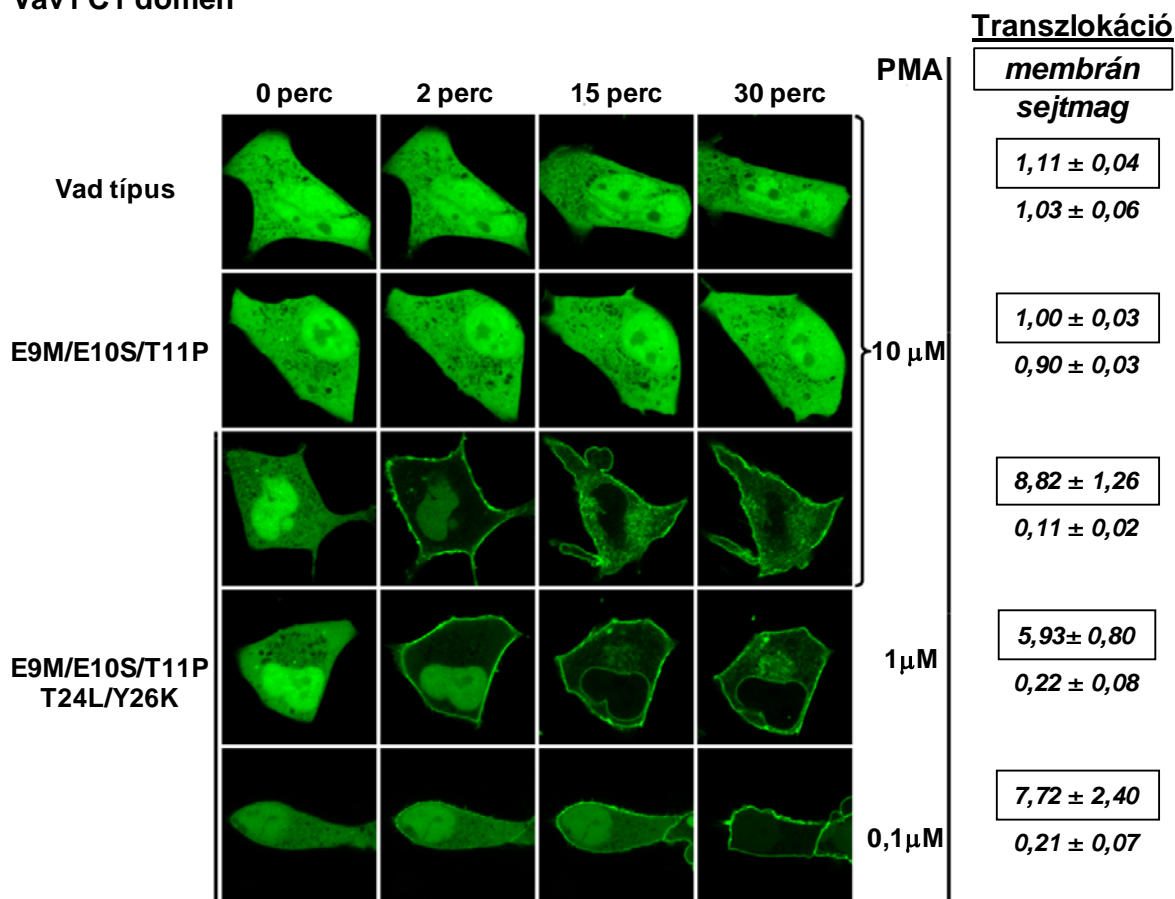
2. táblázat: A vad típusú Vav1 C1 és a Vav1 C1 mutánsok [³H]PDBu kötését jellemző K_d értékek

Bakteriális rendszerben, GST-fúziós proteinként expresszáltatott Vav1 C1 domének [³H]PDBu iránti affinitását vizsgáltuk radioaktív ligandkötés felhasználásával az „Anyagok és Módszerek” fejezetben leírtaknak megfelelően. A kötés erősségét jellemző disszociációs konstansok (K_d értékek) átlagát három független kísérlet alapján adtuk meg (átlag \pm S.E.M. formában). NK: nincs kimutatható kötődés

<i>Receptor (Vav1 C1)</i>	K_d	<i>PKCδ C1b WT -hoz képest</i>	<i>Vav1 C1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K -hoz képest</i>
	<i>nM</i>		
Vad típus (WT)	NK	NK	NK
E9M/E10S	NK	NK	NK
T24L/Y26K	NK	NK	NK
E9M/E10S/T11P	7334 \pm 491	38000 x	6985 x
E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K	1,05 \pm 0,14	5,4 x	1 x
<i>Négyszeres mutánsok</i>			
E10S/T11P/T24L/Y26K (-E9M)	975 \pm 121	5052 x	929 x
E9M/T11P/T24L/Y26K (-E10S)	26,4 \pm 2,4	137 x	25,1 x
E9M/E10S/T24L/Y26K (-T11P)	198 \pm 18	1026 x	189 x
E9M/E10S/T11P/Y26K (-T24L)	34,9 \pm 3,9	181 x	33,2 x
E9M/E10S/T11P/T24L (-Y26K)	31,4 \pm 5,1	163 x	29,9 x

Következő kísérletünkben az ötszörös mutációt (E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) tartalmazó Vav1 C1 domént, GFP-fúziós proteinként, LnCaP sejtekben expresszáltattuk, majd az intracelluláris forbolészter szenzitivitás kimutatása céljából transzlokációs vizsgálatokat végeztünk.

Vav1 C1 domén



19. ábra: A GFP-jelölt, izolált Vav1 C1 mutánsok intracelluláris transzlokációs mintázata PMA kezelés hatására LNCaP sejtekben. A vad típusú Vav1 C1 domént, valamint a háromszoros és az ötszörös (PKC δ C1b-szerű) mutációval bíró Vav1 C1 konstruktokat (Vav1 C1 E9M/E10S/T11P és Vav1 C1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) expresszáló sejteket PMA-val kezeltük (10 μ M, 1 μ M és 0,1 μ M). A transzlokáció dinamikáját konfokális mikroszkópos sorozatfelvételek (30 sec) segítségével követtük nyomon. Az ábrán a kezelés előtti állapot (0. perc), valamint a kezelés utáni 2., 15. és 30. perc reprezentatív felvételeit (3-5 kísérlet jellemző mintázata) tüntettük fel. Az egyes sorozatfelvételeken belül az adott fehérje maximális transzlokációját a legnagyobb sejtmembrán/citoplazma jelintenzitás-hányadosnövekedés („membrán”), illetve a legnagyobb sejtmag/(sejtmembrán+citoplazma) hányadoscsökkenés („sejtmag”) adta, amelyeket a kezelés előtti állapotra normálva adtunk meg. Az azonos kezelési protokollhoz tartozó replikátumok maximális transzlokációjának értékeit („membrán” vagy „sejtmag”) átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel.

Azt tapasztaltuk, hogy, ellentétben a korábban vizsgált (19. ábra, felső sor) vad típusú Vav1 C1 doménnel (amely teljes forbol-észter válaszképtelenségről tett tanúbizonyságot), az ötszörös Vav1 C1 mutáns esetében már viszonylag csekély PMA koncentrációk (0,1 μ M) mellett is szignifikáns transzlokációt detektálhattunk (19. ábra utolsó sora); ami jelentős, a vad típusú PKC δ C1b doménnel csaknem összevethető *in vivo* forbol-észter szenzitivitást sugall. Hasonlóan a vad típusú PKC δ C1b esetében tapasztaltakhoz, az ötszörös Vav1 C1

mutáns transzlokációjának kinetikája is dózis-függő módon változott a PMA koncentrációjának függvényében; azaz az emelkedő PMA koncentrációk hatására felgyorsult mind a plazma membránba irányuló transzlokáció, mind pedig a sejtmagban megvalósuló redisztribúció (19. ábra harmadik és negyedik sora).

Elmondhatjuk tehát, hogy az öt PKC δ -analóg aminosav (E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) jelenléte a Vav1 C1 domént nagy affinitású PDBu-receptorra alakítja át, amely ennek hatására csaknem akkora ligandaffinitással rendelkezik, mint a vad típusú PKC δ C1b. Ezen eredmények (összhangban a PKC δ C1b mutánsok esetében tapasztaltakkal) jól alátámasztják a korábbi röntgenkristallográfiás mérések következtetéseit [137] (valamint a 15. ábrán bemutatott szerkezeti modellek feltevéseit), melyek szerint a Vav1 C1 domén térszerkezete nagyfokú strukturális homológiát mutat a PKC δ C1b doménjének szerkezetével, így a ligandkötőseb geometriája tulajdonképpen alkalmasnak tűnik a ligandkötésre. Az általunk identifikált öt aminosav nem változtatja meg jelentősen a kötőhely háromdimenziós struktúráját; valószínűsíthető, hogy a ligandkötőseb csúcsi részén elhelyezkedő aminosavak akadályozzák a C1 domén és a membrán összekapcsolódását. Mivel a C1-domén-ligand-membrán hármas komplexének stabilizálódása alapvető jelentőséggel bír a molekula ligandaffinitása szempontjából, ezért a C1 domén és a membrán közötti intermolekuláris kapcsolatokat gátló tényezők drasztikusan csökkentik a domén DAG/forbol-észter szenzitivitását.

A nem-szokványos aminosavak ligandaffinitásra gyakorolt hatásának további részletes elemzése a Vav1 C1 doménben létrehozott dupla, tripla és négyszeres mutációk segítségével

Annak megítélése céljából, hogy vajon mind az öt általunk felismert aminosav ténylegesen hozzájárul-e a Vav1 C1 molekula forbol-észter kötésének akadályozásához, a következőkben dupla, tripla, valamint négyszeres Vav1 C1 mutánsokat hoztunk létre (lásd 2. táblázat), amelyek a megfelelő pozíciókban (hasonlóan a fent említett ötszörös Vav1 C1 mutánshoz) a PKC δ C1b-re jellemző aminosavakat tartalmaztak. (A PKC δ C1b mutánsokkal kapott eredmények ugyanis nem feltétlenül érvényesek maradéktalanul a Vav1 C1 molekula ligandaffinitására, az ötszörös Vav1 C1 mutánssal kapott eredmények alapján pedig nem lehet biztonsággal megállapítani, hogy az öt mutáció közül vajon valóban mindegyik szerepet játszik-e a Vav1 C1 ligandaffinitásának „helyreállításában”).

A Vav1 C1 feltételezett kötőhelyét alkotó N- és C-terminális peptidhurkokban létrehozott dupla mutációk (E9M/E10S és T24L/Y26K) nem bizonyultak elegendőnek ahhoz,

hogyan helyreállítsák a domén forbol-észter szenzitivitását; így az *in vitro* ligandszenzitivitási vizsgálatokban nem tudtunk [³H]PDBu-kötést detektálni (2. táblázat), illetve az *in vivo* kísérletek esetében sem figyeltünk meg transzlokációt (10 μM PMA-val történő kezelés hatására sem; ábra nincs feltüntetve). Az N-terminális hurokban létrehozott tripla mutáció (E9M/E10S/T11P) hatására ugyanakkor már ki lehetett mutatni egy nagyon gyenge ligandkötést ($K_d = 7330 \pm 490$ nM; 2. táblázat); ám mindezt csak *in vitro* vizsgálatokban tudtuk detektálni, a transzlokációs kísérletekben nem kaptunk választ forbol-észter kezelésre (19. ábra második sor). Mindezek alapján tehát elmondható, hogy megfelelő nagyságú ligandaffinitás csak abban az esetben lehetséges, ha mindkét peptidhurok csúcsi részén jelen vannak olyan aminosavak, amelyek elősegítik az intermolekuláris kapcsolatokat a C1 domén és a lipidmembrán között. Ez a megfigyelés ugyan némileg ellentmond a PKCδ C1b mutánsok esetében kapott eredményeknek (1. táblázat és 18. ábra), hiszen esetükben a dupla (M9E/S10E; L24T/K26Y) és a tripla (M9E/S10E/P11T) mutációk nem váltottak ki teljes válaszképtelenséget forbol-észterek iránt (annak ellenére, hogy ezekben az esetekben az N- vagy a C-terminális hurok a ligandkötés szempontjából teljesen inkompatibilis aminosavakkal rendelkezett). Ugyanakkor ez az ellentmondás felhívja a figyelmet arra, hogy a ligandaffinitás szempontjából a két C1 domént (PKCδ C1b *versus* Vav1 C1) alkotó egyéb aminosavak szerepe sem hanyagolható el. Elképzelhető ugyanis, hogy a PKCδ C1b esetleg rendelkezhet egyéb olyan (normál esetben redundáns) aminosavakkal, amelyek további stabilizáló funkcióval bírhatnak, ám normál körülmények között tovább nem képesek fokozni a már amúgy is nagy affinitású ligandkötést.

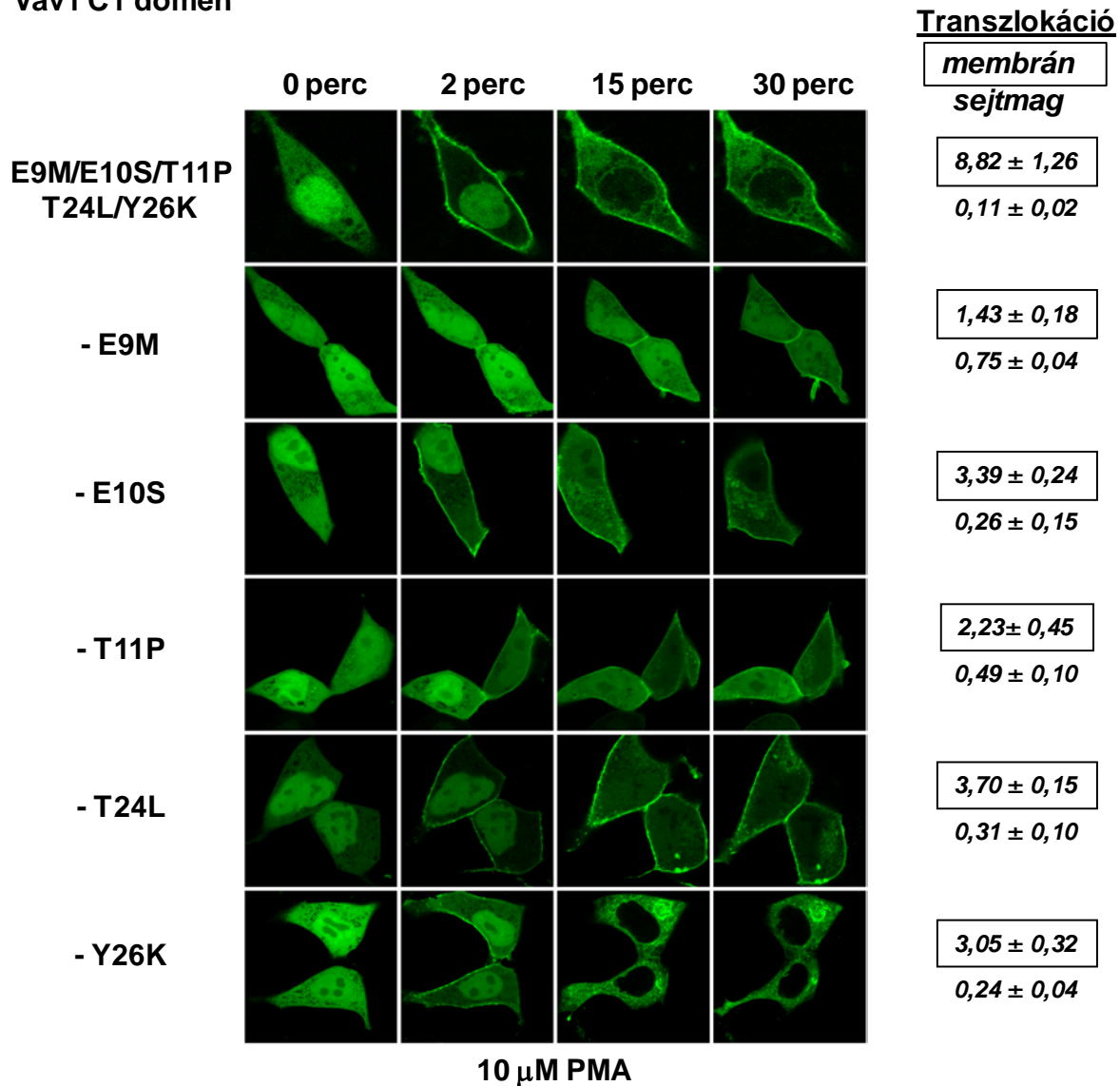
A következőkben (a 2. táblázatban felsorolt) négyszeres Vav1 C1 mutánsok segítségével szeretnénk volna részletesen megvizsgálni a fent említett, öt nem-szokványos aminosav egyedi hozzájárulásának mértékét a Vav1 C1 forbol-észter-szenzitivitásának csökkentéséhez. Azaz tisztázni kívántuk, hogy vajon az egyes aminosavak ugyanolyan mértékben járulnak-e hozzá a ligandaffinitás csökkentéséhez, amikor a Vav1 szekvenciájában foglalnak helyet, mint amikor a PKCδ C1b szekvenciájában találhatóak (amikor is, csaknem egységesen, kb. 5-15-szörös mértékben csökkentették a forbol-észter szenzitivitást). Ebben a kísérletsorozatban az ötszörös Vav1 C1 mutáns (E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) szolgált kontrollként, amely megfeleltethető a vad típusú PKCδ C1b molekulának (hiszen az öt kulcspozícióban azonos aminosavakat tartalmaznak). A 2. táblázatban szereplő négyszeres Vav1 C1 mutánsok (az analógiát tovább folytatva) megfelelhetnek az 1. táblázatban felsorolt egyszeres PKCδ C1b mutánsoknak, mivel a ligandkötés szempontjából legmegfelelőbb aminosavszekvenciához képest (a PKCδ C1b mutánsokhoz hasonlóan), eggyel kevesebb

„kompatibilis” aminosavval (vagyis eggyel több nem-kompatibilis aminosavval) rendelkeznek. (Az egyszerűség kedvéért ezeket a mutánsokat úgy fogjuk jelölni, hogy a szekvenciából hiányzó „kompatibilis” aminosav mutációja elé egy negatív előjelet teszünk, kiemelve annak hiányát az ötszörös mutánshoz képest. A 2. táblázatban megtalálható a mutánsok pontos leírása és zárójelben a rövidített jelölésük). Az eredmények alapján látható, hogy az öt négyszeres mutáns közül három esetében nagyjából azonos affinitáscsökkenést detektálhattunk. A (-E10S), (-T24L) és (-Y26K) jelzésű Vav1 C1 mutánsok egységesen, körülbelül 25-35-szörös szenzitivitáscsökkenést mutattak [³H]PDBu iránt, az ötszörös Vav1 C1 mutánshoz viszonyítva (2. táblázat). Ez az eredmény összhangban áll a PKCδ C1b egyszeres mutánsainak csaknem egyöntetű (5-13-szoros) affinitáscsökkenésével, a vad típusú molekulához viszonyítva (1. táblázat); a szenzitivitás redukciójának mértéke a Vav1 esetében egy kissé magasabbnak adódott, mint a PKCδ C1b mutánsoknál. A 9-es és 11-es pozícióban lévő, nem-szokványos aminosavak esetében ugyanakkor az affinitáscsökkenés mértéke különbözőnek adódott a két kísérletes megközelítés során. Ugyanis míg a PKCδ C1b M9E és P11T mutánsai hasonló szenzitivitáscsökkenést mutattak (a vad típusához képest), mint a többi egyszeres mutáns (1. táblázat), addig a velük analógnak tekinthető (-E9M) és (-T11P) jelzésű, négyszeres Vav1 C1 mutánsok szenzitivitáscsökkenése sokkal kifejezettebb volt (929-szeres és 189-szeres), az ötszörös Vav1 C1 mutánshoz viszonyítva (2. táblázat). Ez tehát arra utal, hogy amennyiben az öt nem szokványos aminosav ligandaffinitásban betöltött funkcióját közvetlenül a Vav1 C1 molekula alapvázának felhasználásával vizsgáltuk, úgy a Met⁹ és a Pro¹¹ molekulák (a többi aminosavhoz képest) kifejezettebb hozzájárulását detektálhattuk a ligandkötés csökkentéséhez (ellentétben a PKCδ C1b alapvázat felhasználó kísérletes elrendezés esetében tapasztaltakkal).

Ezen *in vitro* eredményekkel összhangban, a fent említett négyszeres Vav1 C1 mutánsok GFP-jelölt változataival elvégzett *in vivo* transzlokációs kísérletek megerősítették, hogy a Met⁹ és a Pro¹¹ molekulák a másik három aminosavnál (Ser¹⁰, Leu²⁴ és Lys²⁶) nagyobb jelentőséggel bírnak a ligandkötés befolyásolásában (20. ábra). 10 μM PMA alkalmazása után ugyanis gyors plazmamembrán transzlokációt detektálhattunk a (-E10S), a (-T24L) és a (-Y26K) mutánsok esetében. Ezenfelül, bár a citoszolból a plazmamembrán felé irányuló áthelyeződés nem valósult meg teljes mértékben, a PMA hozzáadása után 15 percen belül már meglehetősen kifejezett fluoreszcens jelet detektálhattunk a membránban; emellett a sejtmag belsejében is majdnem tökéletes redisztribúció zajlott le a magmembrán felé. Ezzel ellentétben a (-E9M) jelzésű mutáns sokkal kisebb mértékű és sokkal lassabb kinetikájú plazmamembrán-transzlokációt mutatott, mint az előző három mutáns; emellett az

áthelyeződés csak a membrán egyes szakaszaira korlátozódott és a sejtmagban észlelt redistribúció is nagyon korlátozott mértékű volt.

Vav1 C1 domén



20. ábra: A GFP-jelölt, izolált Vav1 C1 ötszörös és négyszeres mutánsainak transzlokációs mintázata PMA kezelés után LNCaP sejtekben. Az ötszörös (PKCδ Clb-szerű) mutációt tartalmazó Vav1 C1 domént (E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K), valamint az ábrán (és a 2. táblázatban) feltüntetett négyszeres Vav1 C1 mutánsokat expresszáló sejteket 10 μM PMA-val kezeltük. Az intracelluláris redistribúciót konfokális mikroszkópiával követtük nyomon, 30 másodpercenként elkészített sorozatfelvételekkel. Az ábrán látható reprezentatív felvételek (3-5 kísérlet jellemző mintázata) a kezelés előtti állapotot (0. perc), valamint a kezelés utáni 2., 15. és 30. percet ábrázolják. Az egyes sorozatfelvételeken belül az adott fehérje maximális transzlokációját a legnagyobb sejtmembrán/citoplazma jelintenzitás-hányadosnövekedés („membrán”), illetve a legnagyobb sejtmag/(sejtmembrán+citoplazma) hányadoscsökkenés („sejtmag”) adta, amelyeket a kezelés előtti állapotra normálva adtuk meg. Az azonos kezelési protokollhoz tartozó replikátumok maximális transzlokációjának értékeit („membrán” vagy „sejtmag”) átlag ± S.E.M. formában tüntettük fel.

A (-T11P) jelzésű mutáns transzlokációs mintázata tulajdonképpen átmenetet képviselt a három kifejezettebb választ adó mutáns (-E10S, -T24L és -Y26K), valamint a (-E9M) jelzésű mutáns között. A (-T11P) mutánsnál ugyanis egy meglehetősen gyors kezdeti plazmamembrán-transzlokációt figyelhettünk meg; ugyanakkor csupán részleges áthelyeződést láthattunk a citoszolból a membrán felé, valamint a plazmamembrán egyes területein hiányzott a transzlokációra utaló fluoreszcens szignál. Ezenfelül a sejtmag belsejében alig detektálhattunk redisztribúcióra utaló jeleket.

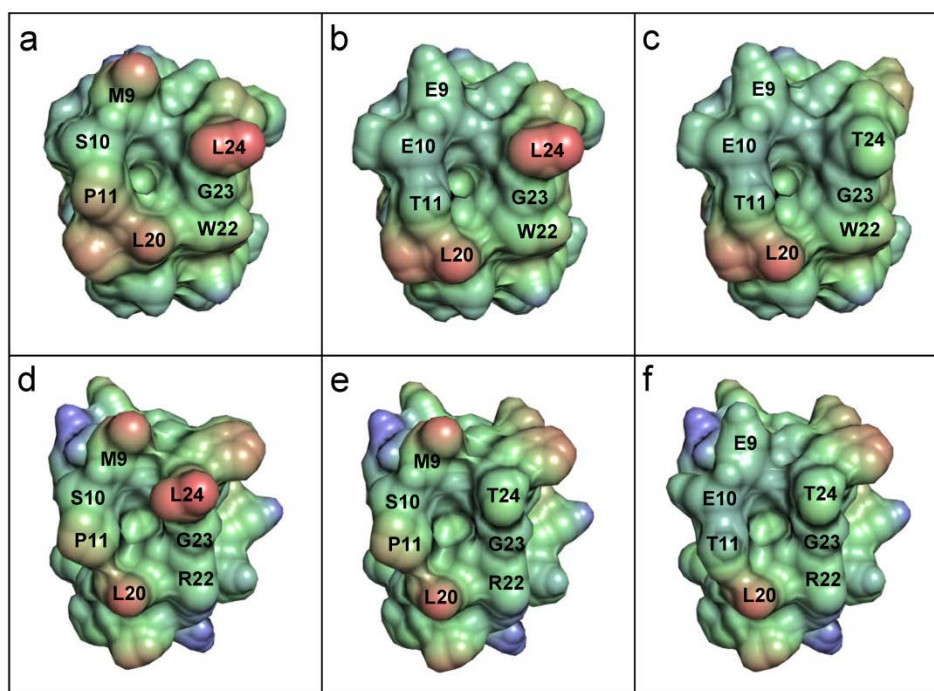
Mindezeket összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a négyszeres Vav1 C1 mutánsokkal kapott eredmények aláhúzzák a Met⁹ and Pro¹¹ aminosavak kiemelt jelentőségét az ötszörös Vav C1 mutáns (E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) nagy ligandaffinitásának kialakításában. Adataink rávilágítanak arra is, hogy a Glu⁹ és a Thr¹¹ molekula nagyobb mértékben járul hozzá a vad típusú Vav1 C1 forbol-észterek iránti teljes válaszképtelenségéhez, mint a másik három nem-kompatibilis aminosav (Glu¹⁰, Thr²⁴ és Tyr²⁶).

A „molekuláris lipofilicitás” korrelációja a forbol-észter szenzitivitással

Az eddigi eredményeink alapján azt feltételeztük, hogy a Vav1 C1 szekvenciájában identifikált öt nem szokványos aminosav szerepe abban nyilvánul meg, hogy jelenlétükkel akadályozzák a C1 domén és a membránkettősréteg asszociációját, ezáltal gátolják a receptor-ligand-membrán hármas komplexének kialakulását, így közvetve a ligandkötés stabilizálódását is. Ennek hatására a Vav1 C1 alkalmatlanná válik forbol-észter kötésre, annak ellenére, hogy a kötőhely térszerkezete önmagában nem tenné azt lehetetlenné.

A következőkben molekuláris modellek segítségével szeretnénk volna meggyőződni feltételezéseink helyességéről. (Megj.: Ahogy azt már említettem, a molekulamodelleket teljes egészében kollaborációs partnerünk, Megan L. Peach készítette, ezen modellek következtetései azonban elengedhetetlenek eredményeink megfelelő interpretálásához, ezért azokat belefoglaltam Disszertációmba és alább ismertetem őket). Létrehoztunk egy módszert, amelynek segítségével a különböző C1 domén mutánsok felszíni lipofilicitását kvantifikálni tudtuk. Kísérleteinkben azt szeretnénk volna meghatározni, hogy vajon a PDBu-affinitás, illetve a transzlokációs dinamika tekintetében az egyes mutánsok között fennálló jelentős eltérések összefügghetnek-e a ligandkötőhely külső felszínének eltérő membránaffinitásával (a különböző lipofilicitási tulajdonságok miatt).

Az egyes C1 domén mutánsok felszíni lipofilicitásának jellemzésére bevezettük az ún. „molekuláris lipofilicitási potenciál” (továbbiakban MLP) mennyiségét, amely a VASCO nevű szoftver [187] felhasználásával került meghatározásra. (A számítási módszer részletes jellemzése az értekezés alapjául szolgáló alábbi közlemény „Anyagok és Módszerek” fejezetében található: [173]). Az eljárást nagyon leegyszerűsítve, a C1 domén peptidmolekula egyes atomjainak lipofilicitását a oktanol-víz megoszlási hányados (logP érték) segítségével jellemezhetjük [188].



21. ábra: Az egyes C1 domén mutánsok (PKC δ és Vav1) ligandkötőhelyének lipofilicitása „felülnézetből”. A C1 domének külső felszínét alkotó aminosavakat a VASCO nevű szoftverrel meghatározott „molekuláris lipofilicitási potenciál” (MLP) értékek alapján láttuk el színekkel. A jelölések a kéktől (leghidrofílabb területek) a piros (leglipofilabb területek) színig terjednek. A köztes lipofilicitással bíró tartományok a zöld különböző árnyalataival vannak megjelölve. (a): vad típusú PKC δ C1b, (b): PKC δ C1b M9E/S10E/P11T, (c): PKC δ C1b M9E/S10E/P11T/L24T/K26Y, (d): Vav1 C1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K, (e): Vav1 C1 E9M/E10S/T11P, (f): vad típusú Vav1 C1. (Megjegyzés: A 26-os pozícióban lévő aminosav egyik C1 domén mutáns esetében sem látható ebből az irányból, mivel az a kötőhely „csúcsi” részét alkotó aminosavak „alatt” helyezkedik el; ezen modellek esetében tulajdonképpen „felülről” tekintünk bele a ligandkötő zsebbe).

A VASCO szoftver a C1 doméneket alkotó atomok ezen logP értékeit figyelembe véve, megfelelő algoritmus segítségével, meghatározza a molekula felszínének lipofilicitását, pontról pontra. A szoftver segítségével meghatároztuk a PKC δ C1b és a Vav1 C1 mutánsok felszíni lipofilicitását jellemző MLP értékeket [187,189,190]. A 21. ábrán az egyszeres, a

tripla és az ötszörös mutánsok külső felszíne „látható felülnézetből”, amelyet úgy kell elképzelni, mintha felülről beletekintenénk a ligandkötőzsebbe. A felszín minden egyes pontjához tartozik egy MLP érték, amelyet színek segítségével jelenítettünk meg. Látható, hogy lényegében az összes C1 domén kötőhelyének felszíne túlnyomórészt közepes fokú (átmeneti) lipofilicitást mutat (zöld szín), amelyet egyes mutánsoknál, foltokban erősebb hidrofóbicitású (piros) területek szakítanak meg. Az is nyomkövethető, hogy a vad típusú PKC δ C1b erősebb lipofilicitást mutat mint a vad típusú Vav1 C1 domén, és ez leginkább a Met⁹, a Pro¹¹ és a Leu²⁴ jelenlétének köszönhető. A vad típusú Vav1 mindössze egy erősebben lipofil területtel rendelkezik, mégpedig a Leu²⁰ aminosavnak köszönhetően. A várakozásokkal szemben a Glu⁹ és a Glu¹⁰ jelenléte nem kölcsönöz jelentős hidrophil karaktert (kék szín) a Vav1 C1 kötőhely külső felszínének, mivel a karboxilát csoportok polaritását „leárnycólják” a környező apoláros molekulák. Ehhez hasonlóan a 22-es pozícióban lévő arginin (Arg²²) sem tűnik szignifikánsan hidrophilebbnek, mint a PKC δ C1b Trp²² molekulája, mivel töltéssel rendelkező, guanidínium funkciós csoportja a kötőhely külső (felső) felszíne alatt helyezkedik el, így inkább az oldallánc metilén csoportjai lesznek azok, amelyek a kötőzseb peremének alkotásában részt vesznek.

A színek segítségével megjelenített molekuláris lipofilicitás (21. ábra) alapján már jól körvonalazható, hogy a nem-kompatibilis aminosavak egymagukban miért okoznak csak relatíve kis ligandaffinitás-csökkenést (pl. a PKC δ C1b egyszeres mutánsaiban). Látható, hogy önmagában egyik Vav1-re jellemző aminosav sem csökkenti le drámaian a kötőzseb felszínének lipofilicitását, ugyanakkor több ilyen aminosav jelenléte összességében már jelentősen csökkenti a kötőzseb felszínének össz-lipofilicitását (hasonlítsuk össze a 21.a és c vagy a 21.d és f jelzésű modelleket!); ezáltal feltehetőleg képesek teljesen meggátolni a kötőhelynek a membrán kettősrétegébe történő beágyazódását, amelynek következtében a domén ligandaffinitása drámaian lecsökken.

Az egyes C1 domén mutánsok felszíni lipofilicitása és ligandszenzitivitása közti összefüggés számszerűsítése végett a felszín egyes pontjaira jellemző MLP értékeket szummáltuk, és az így kapott, ún. „összesített lipofilicitás” értékét, a ligandaffinitás és a transzlokációs potenciál függvényében ábrázoltuk (22. ábra). (Megjegyzés: az egyes mutánsok transzlokációjának intenzitását színek segítségével jelezteztük; lsd.: az ábra alatt. Az egyszeres PKC δ C1b mutánsok esetében ugyan nem végeztünk transzlokációs vizsgálatokat, de az PDBu-kötési vizsgálatokban mutatott csekély affinitás-csökkenés alapján esetükben erőteljes transzlokációt feltételezhetünk.)

Az ötszörös Vav1 C1 mutáns kötőhelyének felszíne (kis mértékben) kevésbé lipofil, mint a vele analóg felépítésű, vad típusú PKC δ C1b molekuláé; hasonlóan, az ötszörös PKC δ C1b mutáns lipofilicitása egy kissé magasabb, mint a (kötőhelyszerkezet tekintetében hasonló) vad típusú Vav1 C1 molekuláé. Ez tehát azt jelenti, hogy az öt mutáció ugyan nem képes teljesen „átkonvertálni” az egyik C1 molekulát a másikba (a kötőhely lipofilicitásának tekintetében), de a két struktúra lipofilicitása egymáshoz nagyon közel kerül. Az MLP értékekben fennmaradó különbséget legnagyobb részben a 22-es pozícióban elhelyezkedő Trp (PKC δ) *versus* Arg (Vav1) jelenléte okozza, de (az *in vitro* PDBu-kötés alapján) ennek az aminosavnak a mutációja nem befolyásolta érdemben a forbol-észter szenzitivitást.

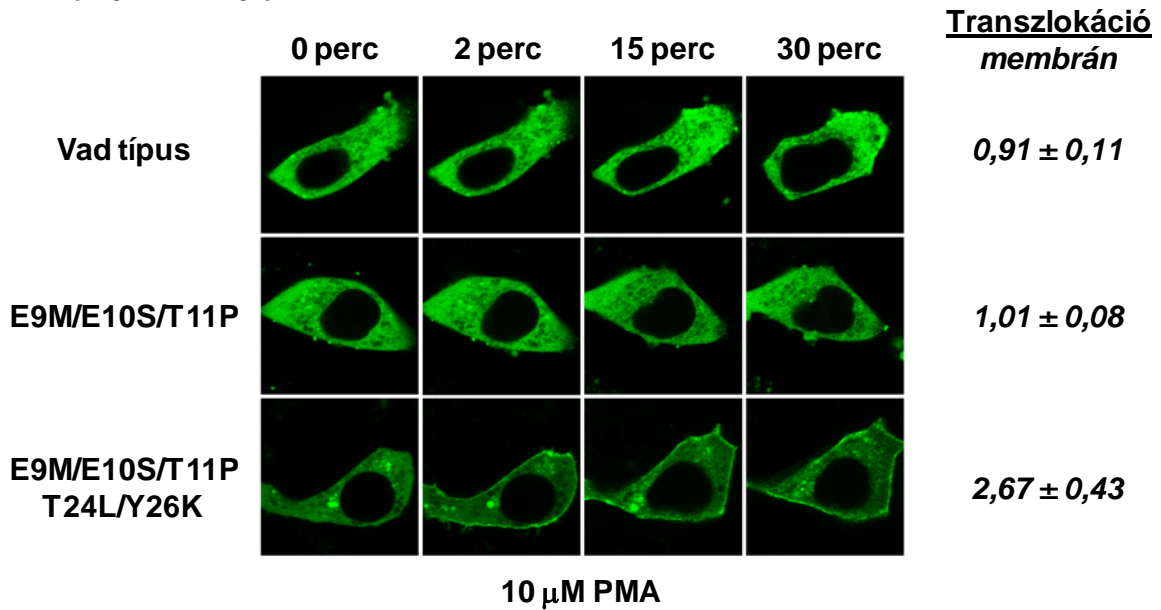
A K26Y és az S10E jelölésű egyszeres PKC δ C1b mutánsok és a velük strukturálisan analóg (-E10S) és (-Y26K) jelzésű Vav1 C1 négyszeres mutánsok mutatták a legkisebb lipofilicitás-csökkenést, a vad típusú PKC δ C1b-hez és az ötszörös Vav1 C1 mutánshoz viszonyítva. Ezért nem meglepő tehát, hogy a mutációk ellenére jelentős forbol-észter-szenzitivitást őriztek meg, az előbb említett, ideális C1-strukturákkal összehasonlítva. A többi egyszeres PKC δ C1b mutáns és a többi négyszeres Vav1 C1 mutáns lipofilicitása nagyjából azonos tartományba esett, mint a PKC δ C1b dupla és tripla mutánsé, illetve a Vav1 C1 tripla mutánsé (+10-től -10-ig terjedő tartomány). Ebben a köztes tartományban a összesített MLP értékek nem feltétlenül mutattak lineáris korrelációt a domén ligandaffinitásával és transzlokációs potenciáljával. Az MLP számítások alapján például nehezen magyarázható a PKC δ C1b dupla mutációinak (M9E/S10E és L24T/K26Y) a ligandszenzitivitásra gyakorolt, várakozásokat felülmúló negatív hatása (összehasonlítva a nekik megfelelő egyszeres mutánsokéval). Ehhez hasonló példa a (PKC δ C1b L24T/K26Y mutánssal analóg szerkezetű) Vav1 tripla mutáns (E9M/E10S/T11P) esetében mért affinitáscsökkenés, a négyszeres Vav1 mutánsokhoz képest, amelyet szintén nem magyaráz jól az MLP értéken alapuló lipofilicitásbeli különbözőség. Ugyancsak meglepő az a tény, hogy a PKC δ C1b M9E és L24T jelzésű mutánsai, valamint a (-T24L) jelzésű négyszeres Vav1 mutáns sokkal nagyobb forbol-észter-szenzitivitással rendelkeznek (az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok alapján), mint ahogy azt az MLP-értékek alapján vártuk volna. Ugyanis a leucin molekula treoninnal való felcserélése után jelentős különbségeket észlelhetünk a MLP értékekben, ugyanakkor a forbol-észter affinitást vizsgáló kísérletekben csak szerény eltéréseket láttunk (az egyszeres PKC δ C1b L24T viszonylag nagy affinitással köt PDBu-t, míg a Vav1 C1 (-T24L) megfelelő transzlokációt mutat PMA hatására). Ezek alapján felmerül, hogy a C1 domén forbol-észter-szenzitivitását alapvetően meghatározó membránasszociáció nem csupán a kötőhely összlipofilicitásának mértékétől függ, hanem nagyban befolyásolhatja a kötőhely környékén

helyet foglaló különböző hidrofób és hidrofil aminosavak pontos térbeli elhelyezkedése is, amely ezáltal meghatározza a membránhoz való illeszkedés szempontjából legkedvezőbb térbeli „lipofilicitás-mintázatot”.

Az ötszörös mutáció hatására a Vav1 C1 doménje a teljes fehérjemolekulán belül is képes forbol-észter kötésre és a membránba történő áthelyeződés indukciójára

A következő kísérletünkben a teljes nagyságú Vav1 protein C1 doménjában hoztuk létre ugyanazt az öt PKC δ -szerű mutációt, (E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K), mint az izolált Vav1 C1 domén esetében. Ezzel a módosítással azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy vajon a C1 domén ligandkötősebe a teljes molekulán belül is képes-e forbol-észtert kötni a megfelelő mutációk birtokában. Azt feltételeztük, hogy amennyiben más domének nem „torlaszolják el” a ligandkötőhelyet, úgy az öt kulcspozícióban lévő aminosav mutációja a teljes Vav1 molekulát is képessé teszi majd a forbol-észter kötésre. A kérdés eldöntéséhez a teljes Vav1 molekulát (a vad típust, a tripla és az ötszörös mutánst) N-terminális GFP-t tartalmazó eukarióta expressziós vektorba klónoztuk, majd LNCaP sejtekben vizsgáltuk az expresszált GFP-fúziós proteinek transzlokációjának dinamikáját, forbol-észter kezelés után. (A megfelelő mennyiségű tisztított protein előállításának technikai nehézségei miatt a teljes Vav1 fehérjét nem állt módunkban *in vitro* ligandkötési vizsgálatokban tesztelni). A 23. ábrán látható, hogy hasonlóan az izolált Vav1 C1 esetében megfigyeltekhez, az öt nem-kompatibilis aminosav (PKC δ -szerű) mutációja a teljes Vav1 molekulát (Vav1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) is képessé teszi forbol-észter kötésre, hiszen 10 μ M PMA alkalmazása után plazmamembrán irányú transzlokációt detektálhattunk. Az ötszörös mutánssal ellentétben ugyanakkor sem a vad típusú Vav1 molekula, sem pedig a tripla mutáns (Vav1 E9M/E10S/T11P) nem mutatott a citoszolból a membránba történő redisztribúciót (amely ugyancsak megfelelt az izolált Vav1 C1 doménnél tapasztaltaknak.) Ezen eredmények tehát egyértelműen bizonyítják, hogy amennyiben PKC δ -szerű (kompatibilis) aminosavakkal helyettesítjük a Vav1 C1 doménjának 9-11-es, valamint a 24-es és 26-os pozícióiban helyet foglaló aminosavakat, úgy a teljes Vav1 molekula is forbol-észter szenzitívvé válik.

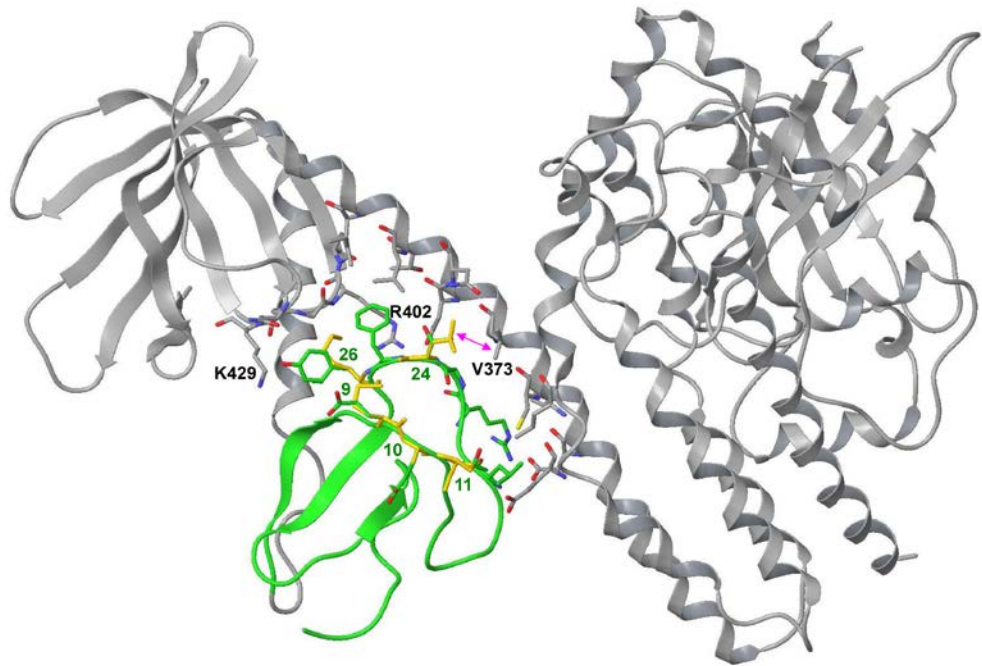
Vav1 (teljes fehérje)



23. ábra: A GFP-fúziós proteinként LNCaP sejtekben expresszált, teljes nagyságú Vav1 molekulák (vad-típus, háromszoros és ötszörös mutáns) transzlokációs mintázata PMA kezelés hatására. A teljes Vav1 fehérje vad típusú változatát, valamint a háromszoros- és ötszörös mutánsokat expresszáló sejteket konfokális mikroszkópia segítségével vizsgáltuk, 10 μ M PMA hozzáadása után. Harminc másodpercenként detektáltuk a GFP-jelölt proteinek intracelluláris lokalizációját. Az ábrán látható reprezentatív felvételek (3-5 kísérlet jellemző mintázata) a kezelés előtti állapotot (0. perc) valamint a kezelés utáni 2., 15. és 30. percet ábrázolják. Az egyes sorozatfelvételeken belül, az adott fehérje maximális transzlokációját a legnagyobb sejtmembrán/citoplazma jelintenzitás-hányadosnövekedés adta, amelyet a kezelés előtti állapotról normalizáltunk. Az azonos kezelési protokollhoz tartozó replikátumok maximális transzlokációjának értékeit („membrán”) átlag \pm S.E.M. formában tüntettük fel.

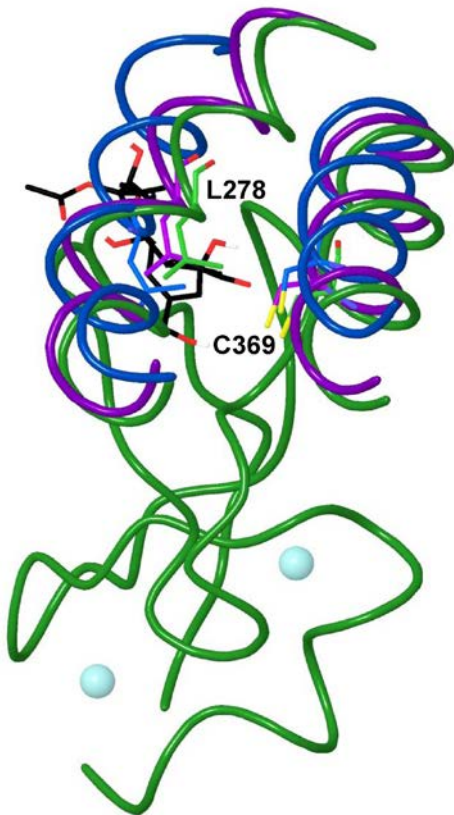
Ezután molekuláris modellek segítségével szeretnénk meghatározni, hogy az egyes mutációk hogyan befolyásolhatják a Vav1 molekula negyedleges szerkezetét kialakító intramolekuláris kapcsolatokat. A C1 domén és a szomszédos DH/PH domének közötti interakciókat bemutató modell alapján (24.A ábra) jól látható, hogy a ligandkötőhely N-terminális peptidhurokban helyet foglaló három mutáns aminosav oldalláncai a polipeptid molekula külső felszíne felé tekintenek, ezért ezen pozíciók mutációja, nagy valószínűséggel, nem gátolná a protein eredeti kvaterner struktúrájának kiépülését. Ugyanakkor, a C-terminális hurokban helyet foglaló két mutáns aminosav jelenléte feltehetően előnytelenül befolyásolná a C1 és DH/PH domének közötti intramolekuláris interakciók kialakulását, így nagy eséllyel megváltoztatná a protein kvaterner struktúráját.

A



24. ábra: A Vav1 C1 kötőszabének C-terminális peptidhúrján létrehozott mutációk megzavarják a szomszédos DH doménnal kialakított intermolekuláris kapcsolatokat. A kötőhelyre illeszkedő ligand szintén gátolhatja ezen kapcsolat kialakulását. A: A Vav1 C1 domént a szomszédos DH és PH doménnal együtt ábrázoltuk. Zöld szín: C1 domén; szürke szín: DH és PH domének. A mutáns aminosavakat a vad-típusú Vav1 molekulában helyet foglaló aminosavakra vetítettük; a sárgán jelölt részek jelzik a két struktúra között (a mutációk hatására) fennálló különbségeket. A DH és a PH doménekben kiemeltük azon aminosavakat (V373, R402, K429), amelyek a mutációk hatására kedvezőtlen szterikus pozícióba kerülnének az eredeti kvaterner struktúrában belül. A bíborvörös kettős nyíl a Val³⁷³ és a C1 domén 24-es pozíciójában lévő leucin összeütközését jelzi. B: A Vav1 C1 domén, a kötőhelyre illeszkedő forbol-13-actetát és a doménnal intramolekuláris kapcsolatokat kialakító DH domén szakaszok ($\alpha 3$ és $\alpha 6$ hélixek) interakcióinak modellezése. Látható, hogy a DH domén $\alpha 3$ és $\alpha 6$ hélicei úgy helyezkednek el a Vav1 molekulán belül, hogy bizonyos aminosav molekulák (főként L278 és C369) ütköznek a C1 domén kötőhelyére beilleszkedő forbol-észter molekula oldalláncjaival. (Az ábrán a DH domén protein adatbázisban szereplő három különböző kristályszerkezetét tüntettük fel egymásra vetítve (hasonlóan a 15. ábrához). Mindhárom esetben igaz a fenti megállapítás. PDB azonosítók: 2VRW (zöld); 3KY9 (kék); 3BJI (lila)).

B



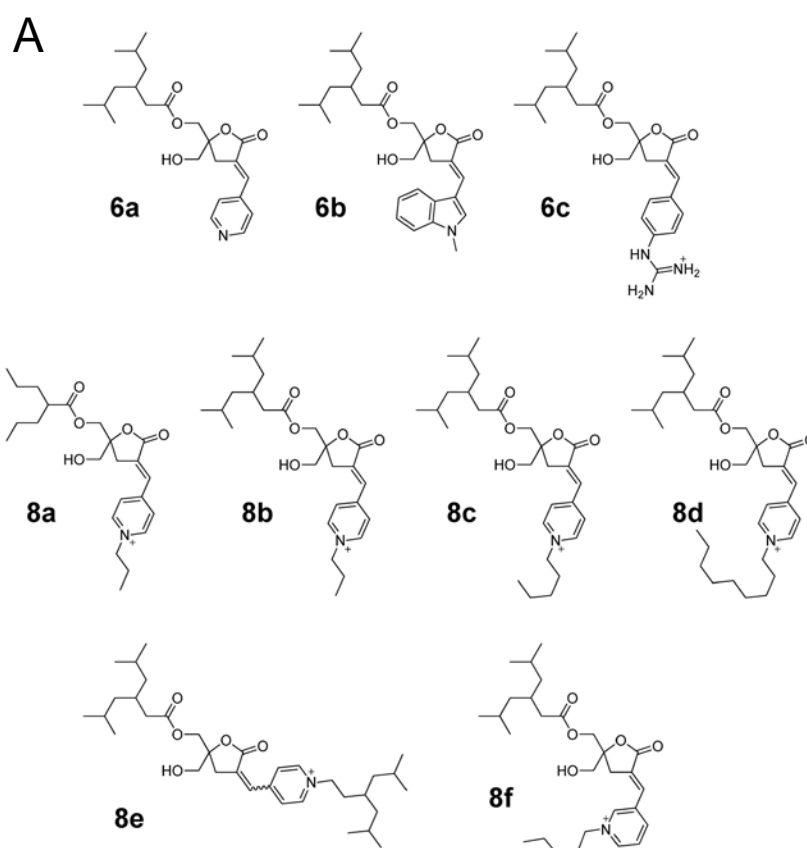
A T24L mutáció hatására például a C1 doménben kifejeződő leucin molekula „összeütközne” a DH domén $\alpha 6$ hélixének 373-as pozíciójában lévő valin molekulával; a Y26K mutáció pedig kedvezőtlenül befolyásolná a domének közötti elektrosztatikus kölcsönhatásokat, hiszen a tirozin helyett expresszázó lizin molekula taszítaná a 402-es pozícióban lévő arginin molekulát vagy a 429-es pozícióban lévő lizin molekulát. Ez tehát azt jelenti, hogy bár mindkét peptidhurok (N- és C-terminális) kulcspozícióinak mutációja szükséges ahhoz, hogy a Vav1 megfelelő forbol-észter-affinitásra tegyen szert (azáltal, hogy kompatibilis aminosavak révén a kötőseb csúcsi részének membránasszociációja megfelelően tud lezajlani), úgy tűnik, hogy a C-terminálisan elhelyezkedő két aminosav mutációja megnehezítené, illetve esetlegesen teljesen meggátolná a Vav1 molekula megfelelő kvaterner struktúrájának felépülését.

Egy másik megközelítésből vizsgálva a C1 domén ligandkötőhelyének kapcsolatát a környező struktúrákkal, a következő szerkezeti modellben azt kívántuk megjeleníteni, hogy a kötősebbe beilleszkedő ligand molekula (forbol-13-acetát) hogyan befolyásolná a C1 domén interakcióit a DH domén $\alpha 3$ és $\alpha 6$ hélixekkel. A modell alapján azt a fontos következtetést vonhattuk le, hogy mivel a ligandkötőhelyet alkotó C-terminális peptidhurok nagyon közel helyezkedik el a DH domén $\alpha 6$ hélixéhez, megfelelő nagyságú ligandmolekula bekötődése esetén a két domén közötti szoros intramolekuláris kapcsolatok zavart szenvedhetnek. (A 24.B ábrán például jól látható, hogy a ligandkötőhelyre beilleszkedő forbol-13-acetát molekula egyes részei „összeütköznek” a DH domén L278-as és C369-es aminosav molekulájával). Mivel ezen interakciók alapvető fontosságúak az enzimaktivitás szempontjából kitüntetett szereppel bíró DH domén szakaszok optimális konformációjának stabilizálásában (és ezáltal a GNE funkció megfelelő aktivitásának fenntartásában [137]), ezért felmerül annak a lehetősége, hogy a kötőhelyre beilleszkedő, (egyelőre) hipotetikus ligand Vav1 enziminhibitoraként funkcionálhatna.

A Vav1 C1 különleges struktúráját célzó DAG-laktonok szelektivitásának összehasonlítása

Következő kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy vajon lehetséges-e a Vav1 C1 domén különleges struktúráját célzó, specifikus ligandok létrehozása; amelyek, a fentebb említettek szerint, nagy eséllyel befolyásolhatnák a Vav1 enzimatikus funkcióját. A molekuláris modellezés és az irányított mutagenézis eredményei alapján megállapítható, hogy az N-terminális peptidhurok negatívan töltött glutamát molekuláinak „semlegesítése”

szükséges (bár nem elégséges) feltétele annak, hogy a Vav1 forbol-észter-szenzitivitását helyreállíthassuk. Feltevésünk szerint pozitív töltésekkel rendelkező ligandok képesek lehetnek a molekulák negatív töltéseinek „semlegesítésére”. Ezáltal a kötőhely csúcsi részének a hidrofóbicitása megnövekedhetne, és így a membránhoz történő kapcsolódás könnyebbé válna. Köztudomású, hogy a molekulák közötti, ionpárokra alapuló elektrosztatikus kölcsönhatások (az ún. sóhidak) növelik a kialakuló komplex lipofilitását, ezáltal elősegítvén a lipidkettősréteggel történő interakciót [191]. A gyógyszergyártásban ugyanezt a stratégiát alkalmazzák a töltéssel rendelkező gyógyszer-molekulák intesztinális felszívódásának megkönnyítésére [192].



25. ábra: A pozitívan töltött DAG-lakton-származékok kémiai szerkezete

Ezen hipotézisünket megvizsgálandó, a következő kísérletünkben pozitív töltéssel rendelkező DAG-laktonok kötődését teszteltük. A DAG glicerín vázának ciklizálásával előállított, öttagú gyűrűt tartalmazó DAG-laktonokról (korábbi kísérleteink alapján) már bebizonyosodott, hogy: *i*) a megfelelő oldalláncokkal ellátott alapstruktúra (a forbol-észterekhez hasonló) nagy affinitással (nanomoláris szenzitivitás) kötődik C1 doménekhez;

ii) a DAG-lakton alapszerkezet viszonylag egyszerű kémiai szintézise alkalmassá teszi a molekulát arra, hogy templátként szolgáljon a különböző oldalláncok modifikációjával előállított, novel C1 ligandok sorozatainak előállításához [8,10]. A vizsgált DAG-laktonszármazékok kémiai szerkezete a 25. ábrán látható. Közös jellemzőjük, hogy pozitívan töltött guanidínium (**6c**) és piridínium (**8a-f**) oldalláncokkal rendelkeznek az *sn-2* pozícióban. Ezenkívül az összehasonlítás kedvéért neutrális piridin (**6a**) és metilindol (**6b**) oldalláncokkal bíró vegyületeket is vizsgáltunk.

A Vav1-C1-struktúra iránti relatív szelektivitás vizsgálatához kompetitív ligandkötési kísérleteket végeztünk, a PKC δ C1b dupla (M9E/S10) és tripla (M9E/S10/P11T) mutánsainak felhasználásával. Azért választottuk ezt a két a Vav1 C1 struktúrára közepes fokban hasonlító PKC δ C1b mutánst, mert még viszonylag jelentős maradék ligandaffinitással rendelkeznek, amely (a módszer ligandkompetíción alapuló természete miatt [174]) elengedhetetlenül fontos előfeltétele annak, hogy a jelöletlen kompetitív ligandok emelkedő koncentrációinak alkalmazása mellett is képesek legyünk [^3H]PDBu-kötést detektálni. Ugyanakkor a Vav1 C1-szerű aminosavak beépülése miatt ezen mutánsok már jelentősen csökkent ligandaffinitással rendelkeznek a vad típusú PKC δ C1b-hez képest, ezért a Vav1 C1 elfogadható modelljéül szolgálhatnak. (Bár ideális lenne az izolált, vad típusú Vav1 C1-et közvetlenül vizsgálni, azonban radioaktívan nem jelölt vegyületekkel ez természetesen nem lehetséges. Ezenfelül mivel egyáltalán nem kötnek [^3H]PDBu-t, a fentiek értelmében kompetíciós vizsgálatokra sem alkalmasak). Ezen kísérletek a bevezető lépéseit jelentik azon vizsgálat sorozatnak, amely (a későbbiekben) a Vav1 C1 doménjának specifikus strukturális sajátosságait célzó, szelektív vegyületek előállítását kívánja megvalósítani.

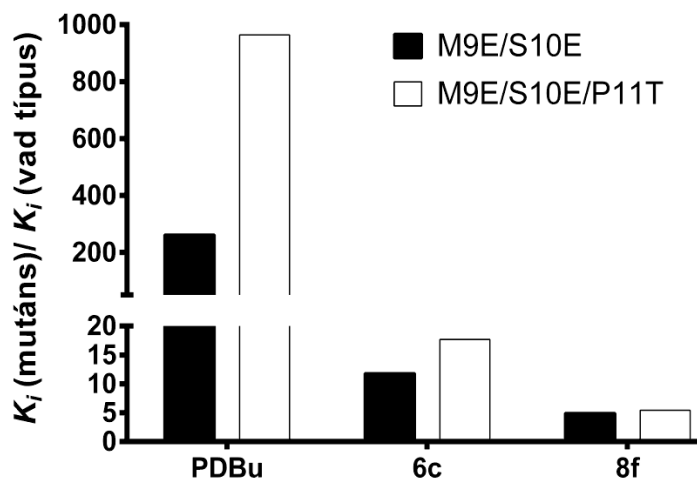
Amint az a 3. táblázat első oszlopának adatai alapján látható, pozitívan töltött oldalláncokat építve a DAG-lakton alapstruktúrába olyan vegyületeket kaptunk, amelyeknek a vad típusú PKC δ C1b-vel szemben mutatott affinitása a 83-szorostól (**6c**) egészen a 30.000-szeresig (**8a**) terjedő csökkenést mutatott (a [^3H]PDBu-hoz képest). Ugyanakkor, a dupla vagy a tripla mutánsokkal szemben (második és harmadik oszlop) ugyanezen pozitívan töltött DAG-laktonok jóval kisebb affinitáscsökkenést mutattak, mint a neutrális [^3H]PDBu vagy a neutrális DAG-laktonok. A [^3H]PDBu affinitása a dupla és a tripla mutánsokkal szemben 261-szeres, illetve 968-szoros csökkenést mutatott, a vad típusúval szembeni affinitáshoz képest. A **6a** és a **6b** jelölésű neutrális DAG laktonoknak a dupla mutánsokkal szembeni affinitáscsökkenése 45-szörösnek, illetve 82-szeresnek adódott. (Megj.: a tripla mutáns esetében ezen vegyületeket nem vizsgáltuk.) Ezzel szemben, a piridínium csoporttal rendelkező, **8f** jelű DAG-lakton affinitása csupán 5-szörösére csökkent a dupla mutánsokkal (M9E/S10) szemben,

és csak 5,5-szeresére a tripla mutánsnal (M9E/S10/P11T) szemben. A guadínium csoporttal bíró **6c** jelzésű lakton esetében pedig ehhez nagyon hasonló affinitáscsökkenéseket detektálhattunk (12-szeres és 17-szeres csökkenés a dupla és tripla mutánsnal szemben).

3. táblázat. A különböző DAG lakton származékok kötődése a PKC δ C1b dupla- és tripla mutánsaihoz. „Kompetitív” ligandkötődés vizsgálat segítségével meghatároztuk az egyes DAG laktonok affinitását a PKC δ C1b M9E/S10E és az M9E/S10E/P11T mutánsokhoz radioaktív [3 H]PDBu jelenlétében. A kötődés erősségét jellemző „inhibitorikus” disszociációs konstans az „Anyagok és Módszerek” fejezetben leírt módon határoztuk meg. Az értékek átlag \pm S.E.M. formában lettek ábrázolva. (N=3 független kísérlet). NK: nincs kimutatható kötődés, NM: meghatározás nem történt.

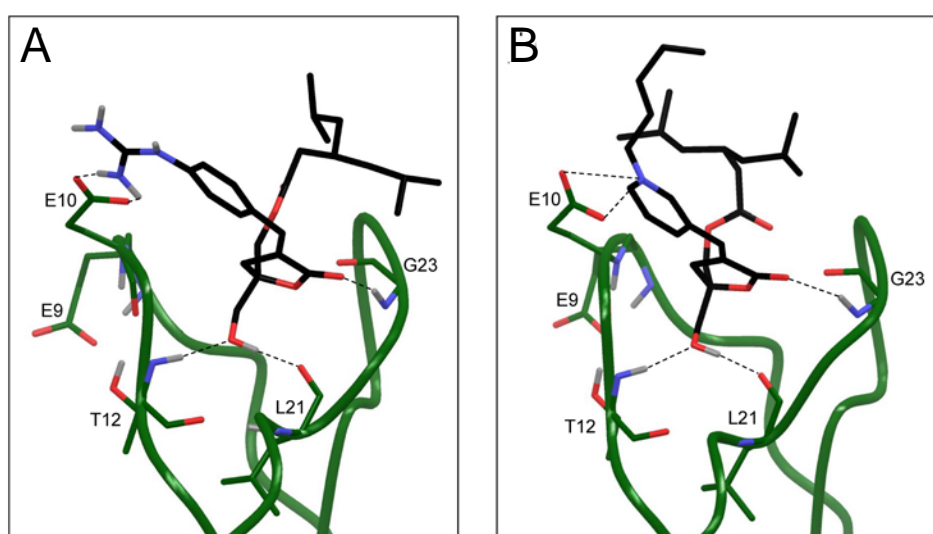
<i>Ligand neve</i>	Receptor PKC δ C1b WT	Receptor PKC δ C1b M9E/S10E	Receptor PKC δ C1b M9E/S10E/P11T
	<i>K_i (nM)</i>	<i>K_i (nM)</i>	<i>K_i (nM)</i>
	<i>nM</i>	<i>nM</i>	<i>nM</i>
[3 H]PDBu	0,193 \pm 0,005	50,5 \pm 2,1	186,1 \pm 6,0
6a	10,0 \pm 1,5	451 \pm 70	NM
6b	0,66 \pm 0,6	54,0 \pm 4,1	n/a
6c	16,1 \pm 1,7	191 \pm 15	285 \pm 28
8a	5813 \pm 417	NK	NM
8b	714 \pm 97	6686 \pm 552	NM
8c	215 \pm 19	1755 \pm 142	NM
8d	792 \pm 67	11675 \pm 837	NM
8e	25,2 \pm 1,3	1061 \pm 27	NM
8f	27,7 \pm 6,2	137 \pm 15	151 \pm 36

Az utóbbi két pozitívan töltött DAG-lakton, valamint a [3 H]PDBu relatív affinitásváltozásait mutatja be a 26. ábra, amelyen az egyes vegyületek dupla, illetve tripla mutánsokkal szembeni affinitását a vad típusal szemben mutatott affinitásukra normálva adtuk meg.



26. ábra: A [³H]PDBu, valamint a 6c és a 8f jelzésű DAG-laktonok relatív affinitása a PKCδ C1b dupla és tripla mutánsai iránt. Az említett ligandok M9E/S10E (fekete oszlopok) és M9E/S10E/P11T (üres oszlopok) mutánsokkal szembeni affinitását a vad típusú PKCδ C1b domén iránti affinitásuk arányában fejeztük ki. (A [³H]PDBu esetében K_i értékeket, míg a 6c és a 8f jelzésű DAG-laktonok esetében K_i értékeket határoztunk meg radioaktív ligandkötődési vizsgálatainkban.)

Látható, hogy a pozitívan töltött vegyületek (6c és 8f) affinitáscsökkenése a három (Vav1 C1-szerű) mutációval rendelkező struktúra felé haladva jóval elmarad a [³H]PDBu esetében tapasztalttól. Ez alapján tehát elmondható, hogy a két vegyületnek a Vav1-specifikus aminosavakat tartalmazó C1-domén-struktúrával szembeni relatív affinitása jelentősen meghaladja a [³H]PDBu esetében tapasztalt mértéket. A különböző DAG-laktonok C1 doménnel szemben mutatott affinitását vizsgáló korábbi kísérleteink alapján megállapíthattuk, hogy a DAG-lakton alapvázhoz csatlakozó oldalláncok szerkezetének apró eltérései is jelentős mértékű különbségeket okozhatnak a receptorstruktúra iránti affinitás, így az egyes vegyületek által indukált biológiai válaszok tekintetében [171,193,194].



27. ábra: A 6c (A) és a 8f (B) jelzésű DAG-laktonok bekötődése a PKCδ C1b M9E/S10E/P11T tripla mutáns ligandkötőhelyére. A molekulák között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatásokat szaggatott vonalakkal jelöltük.

Az egyes piridínium (**8a-f**) oldalláncokkal rendelkező DAG-laktonok affinitásértékei között tapasztalt eltérések szintén alátámasztják ezt a korábbi megfigyelést. Ezen vegyületek (valamint a guanidínium (**6c**) oldalláncokkal bíró vegyületek) alkil oldalláncainak további kémiai modifikációjával tehát képesek lehetünk olyan ligandok létrehozására, amelyek még jelentősebb affinitást mutatnak majd a Vav1-C1-struktúrával szemben.

A következőkben molekuláris modellezés segítségével azt kívántuk megjeleníteni, hogy a tripla mutáns (PKC δ C1b M9E/S10E/P11T) szemben legnagyobb relatív affinitást mutató **6c** és **8f** jelzésű, pozitívan töltött DAG-laktonok milyen lehetséges orientációban illeszkedhetnek a receptor kötőhelyére. (A kötőzsebbe történő „virtuális beillesztés” során az alkalmazott algoritmus konstans receptor alapszerkezet mellett olyan ideális ligand-, illetve aminosav-oldallánc-konformációk (kötőhely aminosav molekulái) után kutat, amelyek a ligand-receptor interakciók szempontjából előnyösek.) A 27. ábrán látható, hogy a 10-es pozícióban lévő glutamát könnyen kialakíthat ionos kötéseket, mind a **8f** jelű DAG-lakton piridínium csoportjában helyet foglaló, mind pedig a **6c** jelzésű vegyület guanidínium csoportjában elhelyezkedő, pozitívan töltött nitrogén molekulával. Emellett a **8f** vegyület piridínium gyűrűjéhez kapcsolódó alkil oldallánc egy hidrofób fedőréteget is létrehozhat a kötőzseb csúcsi felszíne fölött, amely megkönnyítheti a receptor-ligand komplexnek a membrán kettősrétegébe történő beágyazódását. (Megjegyzendő, hogy ez tény esetlegesen magyarázatot adhat a **8f** vegyület kissé magasabb affinitására.)

Az eredmények alapján tehát elmondható, hogy a megfelelő oldalláncokkal rendelkező DAG-lakton alapstruktúra elviekben képes lehet sóhidakat alkotni a C1 domén kötőhelyén található, töltéssel rendelkező aminosav oldalláncokkal. Bár az általunk szintetizált és vizsgált DAG-laktonok a Vav1 C1 doménjának specifikus szerkezetét célzó, szelektív molekulák szintézisének egyelőre csak a kezdeti lépéseit reprezentálják, mégis úgy tűnik, hogy a (9-es és 10-es pozíciókban helyet foglaló Vav1-specifikus) glutamát molekulák negatív töltéseivel kialakított elektrosztatikus interakciók kiaknázása a molekulatervezés fontos stratégiai eleme lehet a jövőben.

DISZKUSSZIÓ

Egyes PKC izoenzimek specifikus szerepe a humán sebocyták biológiai folyamatainak szabályozásában

A másodlagos messenger DAG molekula jelátviteli útvonalának elsőként azonosított (és máig legfontosabb) effektorai a PKC családba tartozó izoformák, amelyek kiemelkedő szerepet töltenek be a sejtorsokat alapvetően meghatározó szignáltranszdukciós mechanizmusokban, hiszen számos sejt- és szövetfeleség esetében képesek a sejtek növekedési ütemének, az érési folyamatok sebességének és a programozott sejthalál szabályozására [20,22,128]. A Disszertáció első részében (a PKC rendszernek a bőr biológiai folyamataiban betöltött szerepét vizsgáló kísérletsorozataink keretein belül) azon eredmények kerültek bemutatásra, amelyek (az irodalomban elsőként) a faggyúmirigy sejtjeinek esetében jellemzik az enzimes család jelátviteli rendszerekben betöltött szabályozó funkcióját. Vizsgálatainkban elsőként a faggyúmirigy sebocytáinak jellegzetes PKC izoenzim-mintázatát határoztuk meg (magas expressziós szinttel rendelkező cPKC α , nPKC δ és aPKC ζ izoenzimek, valamint a kisebb mennyiségű nPKC ϵ és η izoformák), amely mintázat jelentős átfedést mutatott a bőr keratinocytáinak esetében korábban leírt izoforma-készlettel [50-52,60]. Eredményeink továbbá rávilágítottak a sebocytákban magas expressziós szinttel bíró PKC izoenzimek központi (és, más sejt típusoknál tapasztaltakhoz hasonlóan, izoforma-specifikus és antagonisztikus) szerepére a faggyúmirigy olyan alapvető biológiai folyamatainak szabályozásában, mint a sejtosztódás vagy a holokrin szekréció kulcsfontosságú tényezőit jelentő lipidszintézis és terminális differenciálódás.

Megállapítottuk, hogy a PKC rendszer aktivációja fokozza a sebocyták lipidtermelését. Farmakológiai módszerek, valamint különböző sejt- és molekuláris biológiai technikák segítségével rámutattunk, hogy a forbol-észter stimuláció celluláris hatásának jelátvitelében a cPKC α és az nPKC δ izoformák vesznek részt. PKC inhibitorokkal és PMA-val végzett szimultán kezelések során azt tapasztaltuk, hogy mindegyik gátlószer képes volt valamilyen mértékben csökkenteni a forbol-észter lipidszintézis-fokozó hatását (7.C ábra), amely alapján több izoforma szerepe is felvetődött a jelátviteli útvonalban. A klasszikus PKC izoformákat szelektíven gátló Gö6976 anyag hatékonysága a PMA hatás csökkentésében felvetette a cPKC α közreműködését, hiszen a klasszikus csoportból csak ezen izoforma expresszióját sikerült kimutatnunk. Mivel a klasszikus és novel izoformákat hasonló szelektivitással gátló

GF109203X erőteljesebben gátolta a PMA-indukálta lipidtermelést, mint a csak klasszikus izoformákat gátló Gö6976; ezért felmerült a novel izoformák (leginkább a legmarkánsabb expressziót mutató nPKC δ) szerepe is a jelátviteli útvonalban. Az nPKC δ gátlószer Rottlerin hatékonysága a PMA lipidszintézis-fokozó hatásának csökkentésében alátámasztani látszott a δ izoforma aktivációjának fontosságát a forbol-észter hatásmechanizmusában. A Gö anyag és a Rottlerin kumulatív inhibitorikus hatása, valamint az a tény, hogy a két inhibitor kb. azonos gátló hatást ért el, mint a klasszikus és a novel izoformákat egyaránt gátló GF anyag, azt sugallta, hogy a PMA hatásának közvetítésében valószínűleg a cPKC α és az nPKC δ egyaránt részt vesz. (Megjegyzendő ugyanakkor, hogy mivel egyetlen inhibitor-kombináció sem tudta a kontroll szintre visszaszorítani a PMA által indukált lipidszintézis fokozódást, felmerül a PKC izoformáktól különböző jelátviteli útvonalak aktiválásának lehetősége is). Mivel egyes tanulmányok rámutatnak az említett PKC inhibitorok szelektivitásának hiányosságaira [176-178], ezért a következőkben specifikusabb módszerek segítségével vizsgáltuk tovább az egyes izoformák funkcióját. A különböző izoenzimek PMA általi aktivációját a sejten belüli transzlokáció (konfokális mikroszkópia) és az aktiválódást kísérő down-reguláció (Western blot) kimutatásával azonosítottuk. Bebizonyosodott, hogy a PMA kezelés aktiválja a cPKC α és az nPKC δ izoformákat (hiszen mindkét izoenzim esetében detektálhattunk transzlokációt és down-regulációt; lsd 9. és 10. ábra); ugyanakkor a várakozásunknak megfelelően nem befolyásolja az atípusos C1 doménnel rendelkező aPKC ζ aktivitását. Ezenfelül, az izoformák expressziójának szelektív gécscsendesítése (RNS interferencia) segítségével azt is bizonyítottuk, hogy az α és a δ izoformák forbol-észter által kiváltott aktivációja valóban fontos eleme a PMA által indukált lipidszintézis-fokozódás szignáltranszdukciós útvonalának, hiszen ezen lipidtermelés-fokozó hatás mindkét izoenzim expressziójának visszaszorítása következtében lecsökkent. A többféle kísérletes megközelítés alapján tehát egyértelműen megállapítható, hogy a sebocyták fokozott lipidtermelését elősegítő tényezők sejthatásainak jelátviteli mechanizmusában szerepet játszhat a cPKC α és az nPKC δ izoforma aktiválása (is). A holokrin szekréció folyamán a lipidtermelés fokozódása a sebocyták terminális differenciálódásának egyik központi elemét jelenti [104,115,126]. Fontos megjegyeznünk, hogy a két izoforma sejt differenciálódást serkentő hatásairól már számos korábbi tanulmány beszámolt humán epidermális keratinocyták esetében [50,59,60,63,65]. Ezen irodalmi adatok és saját kísérletes eredményeink fényében tehát megállapíthatjuk, hogy a cPKC α és az nPKC δ központi (pozitív) szabályozó szereppel bír a bőr különböző sejtfeleségeinek differenciálódási programjában.

Fontos megfigyelésünk volt emellett, hogy a két izoforma (cPKC α és nPKC δ) aktivitásának gátlása (RNS interferencia vagy PKC inhibitor farmakonok segítségével) nem befolyásolta a sejtek bazális lipidszintézisét, és nem változtatta meg a sejtek növekedési ütemét sem. Ezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a sebocyták endogén cPKC α és nPKC δ aktivitása bazális körülmények között nem játszik meghatározó szerepet sem a differenciálódást, sem pedig a sejtproliferációt befolyásoló jelátviteli útvonalakban. Ugyanakkor a sebocyták által expresszált receptorkészlet (membránreceptorok: az EGF, az IGF, az inzulin, a GH és a CRH receptorai, valamint kannabinoid receptorok és tranziens receptor potenciál TRP ioncsatornák; magreceptorok: az androgén, az ösztrogén, a D-vitamin receptorai, valamint a PPAR, az RXR és az LXR receptorok) sokszínűsége alapján már korábban nyilvánvalóvá vált, hogy számtalan parakrin (pl. EGF, IGF-I, gyulladáscsökkentő citokinek, endokannabinoidok, AA stb.), endokrin (pl. androgének, ösztrogének, calictriol, növekedési hormon, CRH, ACTH, glükokortikoidok stb.) és neurokrin (pl. Substance-P, ACh) mediátor képes a faggyúmirigy alapvető biológiai funkcióinak befolyásolására [87,89,104,195]. Ismert, hogy ezen mediátorok közül számos anyag szignáltranszdukciós útvonalában felmerült a fent említett PKC izoformák funkcionális szerepe.

Az androgének, a PPAR ligandok és egyes (neuro)endokrin mediátorok (CRH, ACTH, GH, inzulin) mellett [91-93,96,98,99,101,196] jónéhány parakrin mediátorról (IGF, FGF, lipidmediátorok) is bebizonyosodott, hogy képes fokozni a sebocyták lipidtermelését, elősegítvén a sejtek differenciálódási folyamatait [89,99,197-200]. A faggyúmirigy biológiáját célzó saját kutatásaink szempontjából a „lipogén” hatású lipidtermészetű parakrin mediátorok (pl. linolsav, AA, endokannabinoidok) több szempontból is kiemelkedő jelentőséggel bírnak.

Korábbi kísérleteink során kimutattuk ugyanis, hogy a faggyúmirigy sejtjei funkcionális endocannabinoid rendszerrel (ECS) bírnak. A sebocytákról kiderült, hogy egyrészt képesek prototípusos endocannabinoid vegyületek (pl., anandamid (AEA) és 2-arachidonoil-glicerol (2-AG)) termelésére, másrészt sejtmembránjukban kannabinoid receptort (CB2) expresszálnak, amelyen keresztül ezen endocannabinoid vegyületek autokrin-parakrin módon képesek fokozni a sebocyták terminális differenciálódását (lipidszintézis fokozódás) és az apoptotikus folyamatokat. Ráadásul úgy tűnik, hogy ezen endogén ligandok által közvetített konstitutív CB2-receptoraktiváció kulcsszereppel bír a bazális lipidtermelés és a differenciálódás folyamatának regulációjában [195].

Kémiai struktúráját tekintve az endocannabinoid AEA-val és 2-AG-val rokon vegyület – mitöbb, ezen anyagok szintetikus-metabolikus útvonalainak egyik köztes

vegyületeként is számontartott [201,202]) – a sebocytákban szintén nagy fontossággal bíró parakrin lipidmediátorról, az AA-ról számos tanulmány bizonyította, hogy képes a sebocyták lipidszintézisének fokozására, a sejt differenciálódás elősegítésére és az apoptotikus folyamatok indukálására [115,118,179]. A foszfolipáz A₂ enzim aktivációjának (és egyéb alternatív útvonalak) hatására a membrán foszfolipidjeiből felszabaduló AA számos gyulladási mediátor prekursoraként szolgál. A ciklooxygenáz és a lipoxigenáz útvonalakon keresztül olyan fontos gyulladási mediátorok keletkeznek, mint például a prosztaglandinok, a leukotriének, a tromboxán A₂ vagy a vérlemezke aktiváló faktor (PAF), melyek a gyulladási kaskád számos fontos mechanizmusát képesek szabályozni (erek permeabilitásának fokozása, az erek lokális tágítása, neutrophil granulocyták kemotaxisa, eosinophil sejtek aktiválása, stb.) [203-207]. A lipidszintézis és az apoptózis fokozásán túl az AA a sebocytákban is képes különböző gyulladási mediátorok termelését kiváltani. A faggyúmirigy sejtjeiben, *in situ*, a ciklooxygenáz és a lipoxigenáz útvonal számos enzimét mutatták ki, amelyek egy részéről az is bebizonyosodott, hogy celluláris expressziójuk jelentősen megemelkedik olyan gyulladási kórállapotokban, mint például az *acne*. Az AA kezelés hatására ezeken az útvonalakon keresztül számos eikozanoid mediátor (LTB₄, PGE₂) termelődik sebocytákban. Ezenfelül pedig az AA jónéhány pro-inflammatórikus citokin (IL-6, IL-8) termelését is képes indukálni a sejtekben [115]. Ezek alapján érthető, hogy az AA (és származékai) által indukált jelátviteli útvonalak központi jelentőséggel bírnak az olyan megváltozott sebocyta-funkciókkal összefüggésbe hozható kórállapotokban (pl. seborrhea, *acne*, stb.), amelyekben patogenetikai faktorként a megnövekedett lipidszintézis, a fokozott sejt-turnover, valamint a sebocyták által termelt gyulladási mediátorok megemelkedett szintje egyaránt közrejátszik.

Bár a sebocyták lipidszintézisére gyakorolt hatásában felmerült az egyes PPAR-ok közvetlen aktivációja [89,115], az AA sejthatásainak pontos szignáltranszdukciós mechanizmusa munkánk kezdetekor még nem volt kellően tisztázva. Munkánk során ezért arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy vajon a sebocytákban expresszálandó PKC izoenzimek aktiválódása részt vesz-e az AA celluláris hatásainak közvetítésében. Az AA-ról több munkacsoport kísérletei is kimutatták, hogy képes fokozni a PKC enzimek aktivitását mind sejtmentes rendszerekben, mind pedig intakt sejtek esetében [4,208-210]. Bár az enzimaktiváció pontos mechanizmusa még nem ismert teljesen, egyes kutatások felvetik az AA közvetlen kötődését bizonyos PKC izoenzimek C1 doménjához, amelynek hatására bekövetkezhet a molekula transzlokációja és a kináz aktivitás fokozódása [17,211].

Az SZ95 sebocytákon elvégzett kísérleteink alapján bebizonyosodott, hogy faggyúmirigy sejtekben az nPKC δ izoforma kulcsfontosságú szerepet játszik az AA jelátviteli útvonalában, hiszen az enzimaktiváció többféle módszerrel (PKC inhibitorok, szelektív géncsendesítés) történő gátlása/csökkentése egyaránt visszaszorította a lipidmediátor által indukált sebocyta-sejtválaszokat (lipidszintézis fokozódás, apoptózis indukció). A farmakológiai vizsgálatok alapján (lásd 13. ábra) már feltételezhető volt, hogy az nPKC δ aktivációja valószínűleg közrejátszik az AA által kiváltott sejthatásokban, ugyanakkor a cPKC α szerepe nem tűnt valószínűnek a folyamatban; a klasszikus és a novel izoformákat egyaránt gátló GF109203X inhibitor és a Rottlerin ugyanis közel azonos hatékonysággal gátolta az AA által megnövelt lipidakkumulációt, míg a klasszikus cPKC α -t gátló Gö6976 teljesen hatástalannak mutatkozott az AA lipogén funkciójának visszaszorításában. A lipidszintézis mellett az AA által indukált apoptotikus folyamatok farmakológiai vizsgálata is hasonló eredményeket mutatott; a három inhibitor közül ebben az esetben is csak a GF109203X és a Rottlerin tudta kivédeni az AA-kezelés hatására bekövetkező mitokondriális membránpotenciál-csökkenést, míg a Gö6976 nem befolyásolta az apoptotikus folyamatokat. Az izoforma-specifikus funkciók pontosabb és megbízhatóbb azonosítása (a PMA-hoz hasonlóan) az AA jelátviteli útvonala esetében is további módszerek alkalmazását tette szükségessé. Az AA-kezelés hatására bekövetkező szelektív nPKC δ aktivációt mind Western blot, mind pedig konfokális mikroszkópia segítségével sikerült bizonyítanunk (9. és 10. ábrák). Mindemellett a specifikus siRNS-sel történő szelektív géncsendesítése után elvégzett funkcionális vizsgálataink (lipidszintézis, apoptózis; 14.A és B ábra) arra is rávilágítottak, hogy az AA által aktivált nPKC δ izoforma (ellentétben a cPKC α és az aPKC ζ izoenzimekkel) valóban fontos szerepet játszik a lipidmediátor sebocyta-funkciókra kifejtett parakrin hatásának jelátviteli mechanizmusában; azaz az nPKC δ expressziójának szelektív csökkentése visszaszorította az AA-kezelés hatására bekövetkező lipidtermelés-növekedést és apoptózis-fokozódást, míg (az előzőekkel összhangban) a cPKC α és az aPKC ζ izoformák kifejeződési szintje nem befolyásolta az AA ezen sejthatásait.

Az AA-val elvégzett kísérleteink alapján tehát az alábbi fontos következtetést vonhattuk le a PKC rendszer sebocytákban betöltött funkcionális szerepéről: *i)* A sejtekben legmagasabb expressziós szinttel bíró nPKC δ izoforma, a lipidszintézist serkentő jelátviteli útvonalak mellett, pro-apoptotikus szignálok közvetítésében is részt vesz. *ii)* Bár a cPKC α , az nPKC δ -hoz hasonlóan, szintén részt vehet lipogén mediátorok szignáltranszdukciós útvonalában (a PMA-val kapott eredmények alapján), az AA sejthatásainak közvetítésében nem játszik szerepet, hiszen expressziójának szelektív csökkentése nem volt hatással az AA

által indukált lipidszintézis fokozódásra. (A második megállapítást azon megfigyelésünk is alátámasztja, amely szerint az AA-kezelés mellett szimultán alkalmazott PMA (13.B ábra) tovább fokozta az AA által megnövelt lipidtermelést; ennek egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy míg az AA-kezelés hatására csak az nPKC δ izoforma aktiválódik, addig a PMA-val való együttes kezelés további lipidtermelés-fokozódást okozhat a cPKC α aktiválásán keresztül.)

A faggyúmirigy biológiai funkciójának szempontjából az AA harmadik fontos celluláris hatása (a lipidszintézis fokozásán és az apoptotikus folyamatok indukálásán túl) a sebocyták által termelt gyulladáshoz vezető lipidmediátorok, pro-inflammatórikus citokinek és antimikrobiális ágensek felszabadulásának fokozása. Munkacsoportunk jelenlegi kísérletsorozatai intenzíven vizsgálják az AA kezelés hatására felszabaduló gyulladáshoz vezető mediátorok jellegzetességeit, illetve a PKC izoenzimek részvételét. Előzetes (nem publikált) eredményeink alapján (Q-PCR) elmondható, hogy SZ95 sebocytákban az AA kezelés fokozza az interleukin csoportba tartozó IL-6 és IL-18 [212,213], valamint az antimikrobiális ágensként ismert β -defenzin-1 termelését [214]. Az AA elősegíti továbbá a pentraxin-3 expressziójának fokozódását, amelyről ismert, hogy a természetes és az adaptív immunitás hatékony együttműködésének egyik fontos regulátora [215]. Bár ezen a területen még további kutatások szükségesek, az előzetes eredmények alapján számos esetben felmerül a PKC rendszer aktiválásának közreműködése ezen mediátorok fokozott expressziójának jelátviteli mechanizmusában.

Végezetül fontos megemlítenünk, hogy a cPKC α és az nPKC δ izoformáknak a sebocyták biológiai folyamataiban betöltött funkcionális szerepén túl a PKC rendszer egy további tagjáról bizonyosodott be, hogy fontos szerepet játszik a faggyúmirigy alapvető funkcióinak szabályozásában. A molekuláris biológia eszköztárának (siRNS) felhasználásával lehetőségünk nyílt a sebocytákban második legmagasabb expressziós szinttel bíró izoforma, az aPKC ζ funkcióinak vizsgálatára is, amelyre farmakológiai módszerek segítségével nem nyílt lehetőség. Ezen vizsgálatok során derült fény arra, hogy az aPKC ζ expresszió szelektív csökkentése (gécscsökkentés) jelentősen fokozta a sebocyták lipidtermelését és apoptotikus folyamatait (12. és 14. ábra). Ezek alapján tehát elmondható, hogy a cPKC α és az nPKC δ lipidszintézist fokozó (differenciálódást elősegítő) hatásával, valamint az nPKC δ proapoptotikus funkciójával ellentétben az aPKC ζ enzimaktivitása feltételezhetően gátolja a sejtek lipidszintézisét és apoptotikus folyamatait. Az aPKC ζ -val kapott eredmények tehát azt sugallják, hogy ezen izoforma endogén aktivitása konstitutívan gátolja a differenciálódás és az apoptózis irányába mutató jelátviteli folyamatokat, ezáltal elősegítvén a sejtek túlélését és a (fiziológiás) sejtproliferációt. Ennek fontos szerepe lehet

például a faggyúmirigy acinusainak ún. perifériás zónájában elhelyezkedő, nagy mitotikus potenciállal bíró sejtek funkciójában, hiszen ezen sejtek proliferációs aktivitása biztosítja a holokrin szekréció során folyamatosan pusztuló, terminálisan differenciálódott és apoptózizált sejtállomány utánpótlását.

Jelen kísérleteink alapján tehát elmondhatjuk, hogy a $cPKC\alpha/nPKC\delta$ és az $aPKC\zeta$ izoformák sebocytákban tapasztalt funkcionális antagonizmusa újabb példát szolgáltat a PKC rendszerrel kapcsolatban, korábban már számos egyéb sejt-és szövetféleség esetében leírt „jellegzetességre”; ezek szerint a PKC családot alkotó izoformák az enzimatis funkció szempontjából egyáltalán nem tekinthetők egységes csoportnak, hiszen akár azonos sejt típus esetén is képesek különböző, sőt akár teljesen ellentétes folyamatokat aktiválni. Ezen jelenség egyik legismertebb és legjobban jellemzett példája a számos szövetben magas expressziós szinttel bíró novel PKC izoformák, a δ és az ϵ , antagonisztikus funkciója. (Míg az $nPKC\delta$ a legtöbb sejt féleségben proapoptotikus és anti-proliferatív funkcióval bír, addig, ezzel ellentétben, az $nPKC\epsilon$ elősegíti a sejtproliferációt és gátolja az apoptotikus folyamatokat [22].) A két izoforma ezen funkcionális antagonizmusának finom egyensúlya lényeges szerepet játszik a sejt sorsokat meghatározó folyamatok érvényre jutásában, emiatt egyes közlemények egyfajta molekuláris „yin és yang” effektusként említik őket [20]. Az irodalmi eredményekkel összhangban, munkacsoportunk korábbi vizsgálatai a bőr keratinocytáinak esetében is leírták a PKC rendszer izoforma-specifikus és antagonisztikus szerepét a keratinocyták túlélését meghatározó sejt folyamatokban (a $cPKC\alpha/nPKC\delta$ izoformák elősegítik a keratinocytá differenciálódást és apoptózist, míg a $cPKC\beta/nPKC\epsilon$ izoformák a proliferációs szignálokat közvetítenek) [63,74]. Jelen munkánkban a bőr egy újabb sejt féleségében, a faggyúmirigy sebocytáiban sikerült részletesen jellemeznünk a PKC rendszer egyes izoformáinak funkcionális szerepét; azaz rávilágítottunk a $cPKC\alpha$ és $nPKC\delta$ aktiváció fontosságára a terminális differenciálódást elősegítő folyamatokban, valamint az $aPKC\zeta$ jelentőségére a sejtek életképességét elősegítő folyamatokban. Kísérleteink eredményeképpen tehát, a PKC rendszer izoforma-specifikus funkcióinak részletes megismerése által, egy újabb sejt féleség esetében válhat lehetővé a terápiás szempontból lényeges sejt funkciók PKC rendszeren keresztüli farmakológiai befolyásolása. A faggyúmirigyből kiinduló bőrbetegségek esetében a PKC rendszer modulációja, a patogenezis függvényében, számos új terápiás megközelítésre kínálhat potenciális lehetőséget.

Milyen betegségek és patológiás kórképek esetében lehet a sebocytá-funkciók modulációjának terápiás haszna? Ahogy azt a „Bevezetésben” már említettük, a

faggyúmirigy sejtjeinek megváltozott proliferációs és differenciációs képessége számos bőrbetegség etiológiájában játszhat központi szerepet. A patogenezis szempontjából ezen betegségek egy csoportjára faggyúmirigy-hiperfunkció jellemző, amely sebum túltermelésben nyilvánul meg és a folyamatot rendszerint fokozott gyulladáshoz vezető válaszok is kísérik (pl. seborrhoea, *acne*) [106,107,111,122]. Más kórképekben jellegzetes vonás a mirigy hyperplasiája; ilyen a perzisztáló erythémával és teleangiectasiákkal járó rosacea, amelyben gyakorta előfordul a faggyúmirigy extrém fokú túlbujánzása az orr (rhinophyma) vagy az áll (gnatophyma) területén [108,109]. Ezek mellett ritka esetekben előfordul a sebocyták neoplasztikus hyperproliferációja is, amely faggyúmirigy eredetű carcinomák (sebaceous carcinoma) kialakulásához vezethet [110].

Ezen kórképek közül messze a leggyakoribb a komplex patogenezisű *acne*. Számos faktor (faggyúmirigy dysfunctio, hyperkeratosis, patogén baktériumok, stb.) kóroki szerepét bizonyították a betegség kialakulásában és fenntartásában, ugyanakkor a legújabb kutatások a fokozott sebumtermelést (hyperseborrhoea) és a gyulladáshoz vezető folyamatok egyensúlyának megbomlását emelik ki központi patogenetikai tényezőként [106,107,112,113]. A faggyúmirigy mindkét tényező tekintetében kulcsfontosságú szereplő. Egyfelől a sebocyták (különböző endokrin és parakrin mediátorok hatására indukálódó) kóros mértékű lipidszintézise létrehozza azt a (hyper)seborrhoeás állapotot, amely, többek között, kiváló táptalajt nyújt a patogén baktériumok elszaporodásához. Másfelől a sebocyták számos gyulladáshoz vezető mediátor termelésével járulnak hozzá az inflammatorikus reakciók kialakulásához és krónikus fenntartásához. Az általuk expresszált enzimműködés segítségével képesek mind a ciklooxygenáz, mind pedig a lipoxigenáz útvonalon termelődő eikozanoidok (pl. PGE₂, LTB₄) termelésére [115]. Ezen gyulladáshoz vezető lipidmediátorok mellett számos pro-inflammatorikus citokint (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8/CXCL8, TNF α) is képesek felszabadítani [112]. A saját kutatásaink és más munkacsoportok korábbi vizsgálatai alapján a parakrin lipidmediátor és gyulladáshoz vezető prekursor AA központi patogenetikai szerepe nyilvánvaló mind a megnövekedett sebocytalipidszintézis, mind a gyulladáshoz vezető mediátorok termelésének vonatkozásában [115,118,179]. Jelen munkánk eredményei arra is rávilágítottak, hogy a sebocytákban legmagasabb expressziós szinttel bíró nPKC δ részt vesz ezen kulcsfontosságú mediátor szignáltranszdukciós útvonalában. Vizsgálataink alapján az is bebizonyosodott, hogy az nPKC δ izoformán kívül a cPKC α is közreműködhet különböző extracelluláris szignálok lipidtermelést indukáló celluláris hatásainak kifejlődéséhez, annak ellenére, hogy az α izoforma szerepe az AA-hatás jelátvitelében nagy valószínűséggel kizárható. Ugyanakkor a szintén magas expressziót mutató aPKC ζ izoenzimről kiderült, hogy aktivitása

hatékonyan fékezheti a terminális differenciálódás irányába mutató folyamatokat, vagyis képes visszaszorítani a sebocyta-lipidszintézist és az apoptotikus folyamatokat. Az *acne*-ellenes terápia szempontjából ezek alapján felmerülhet az nPKC δ (illetve a cPKC α) aktivitás szelektív gátlásának hasznossága, hiszen ezáltal képesek lehetünk visszaszorítani a betegség patogenezisének egyik központi elemét képező fokozott sebumtermelést. Ugyanakkor az antagonistikus funkcióval rendelkező aPKC ζ aktivitásának fokozásával (aPKC ζ agonisták segítségével) elviekben szintén képesek lehetünk ugyanezen terápiás célpont elérésére. Ezzel ellentétben, a sebocytákból kiinduló tumoros túlburjánzás esetében a PKC funkcion keresztüli terápiás megközelítésnek nyilvánvalóan az előzőtől eltérő célokat kell maga elé tűznie, hiszen a neoplasztikus folyamatok esetében az aPKC ζ aktivitás gátlásától és/vagy a cPKC δ/α funkció aktiválásától várhatunk megfelelő eredményeket; mindkét megközelítés ugyanis alkalmas lehet a terminális differenciálódás irányába terelni a fokozott proliferációs aktivitást mutató sejtpopulációt, visszaszorítván ezáltal a tumoros növekedést.

Összefoglalásképpen tehát elmondhatjuk, hogy a PKC rendszer sejt- és izoforma-specifikus funkcióinak részletes jellemzése számos új terápiás stratégia előtt nyithatja meg a lehetőséget mind a bőrt (és azon belül a faggyúmirigyet), mind pedig egyéb szerveket és szöveteket érintő kórképek széles skálájának vonatkozásában.

A protein kináz C és egyéb (lehetséges) DAG-effektor proteinek farmakológiai befolyásolásának lehetőségei a C1 domén targetálásán keresztül

A PKC enzimeket involváló jelátviteli útvonalak pontos feltérképezése mellett az enzimcsalád szerepére irányuló vizsgálatok másik fő vonulatát azon kutatások jelentik, amelyek (már a kezdetektől) az enzimaktivitás farmakológiai befolyásolásának lehetőségeire összpontosítanak, a potenciális terápiás előnyök kihasználásának reményében. Kutatásaink második részében a Blumberg munkacsoporthoz (National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA) csatlakozva ezen kérdéskörrel nyílt lehetőségem behatóan foglalkozni. Bár az ezirányú vizsgálatok kezdetben kizárólag a PKC funkciók farmakológiájára összpontosítottak (hiszen ekkoriban a PKC család volt az egyetlen ismert DAG/forbol-észter-szenzitív molekulacsalád), a későbbi kutatások jónéhány egyéb molekulacsaládot azonosítottak, amelyekről bebizonyosodott, hogy szintén aktiválhatók DAG-gal és exogén analógjaikkal (forbol-észterek stb.) [7,8,13]. Ezen felfedezések természetesen jelentősen megnövelték a DAG útvonal komplexitását, így a szelektív farmakonok kifejlesztésére irányuló törekvések

kihívásait is; ugyanakkor egyidejűleg fontos, új terápiás célpontokkal gazdagították a DAG-szenzitív szignál-proteinek farmakológiájával foglalkozó kutatási területet.

A Disszertáció második részében, az intracelluláris DAG-effektorok befolyásolását célzó kutatások keretein belül, egy ilyen új potenciális DAG-target molekula, a Vav1 ligandaffinitásának karakterizálása került bemutatásra, amely a Blumberg munkacsoport évtizedekre visszamenő, kiterjedt molekuláris farmakológiai kutatássorozatának egyik fontos állomását képviseli. A munkacsoport úttörő munkásságának korai (1980-as évek) eredményei (a japán Nishizuka munkacsoport munkásságával egyetemben) meghatározó jelentőségűnek bizonyult a PKC rendszer és a DAG jelátviteli mechanizmusának kutatása terén, hiszen nagyrészt ezen két munkacsoport vizsgálatai alapján váltak nyilvánvalóvá a következők: *i)* A PKC enzimek képezik a tumor promóter tulajdonságokkal bíró forbol-észter molekulák intracelluláris targetjeit. *ii)* A PLC enzimeket aktiváló jelátviteli útvonalak során keletkező DAG molekula tulajdonképpen a forbol-észterekkel azonos helyre (a későbbiekben C1 doménként azonosított intramolekuláris receptorstruktúrához) bekötődve aktiválja ezen szignál-proteineket [41-43,128].

Hangsúlyozandó továbbá, hogy ezen eredmények jelentették az első meggyőző kísérletes bizonyítékát annak, hogy protein kinázok részt vehetnek a karcinogenezis folyamatában. Az elkövetkezendő évek intenzív kutatásai számos malignus elváltozás esetében bizonyították, hogy a PKC rendszer fiziológiástól eltérő működése kulcsfontosságú patogenetikai tényezőt jelent ezekben a kórképekben. A kutatások alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a PKC rendszer központi szereppel bír olyan alapvető sejtprocesszuszok szabályozásában mint a sejtproliferáció, a differenciálódás, az apoptózis és az angiogenezis [9,20]. Ennek fényében nem meglepő, hogy a PKC enzimesalád vonzó terápiás célpontjává vált a daganatellenes gyógyszerek kifejlesztésére irányuló törekvéseknek. A PKC funkció befolyásolására többféle stratégiát fejlesztettek ki. Ezek közül a legismertebbek: *i)* a molekula katalitikus doménjének gátlása ún. kináz inhibitorok (pl. staurosporin és származékai, a midostaurin, enzastaurin, GF109203X és Gö6976) segítségével; *ii)* az enzimaktivitás modulálása a C1 doménon keresztül (forbol-észterek, bryostatino**k**, DAG analógok felhasználásával); és újabban *iii)* az egyes PKC enzimek intracelluláris expressziójának gátlása *antisense* oligonukleotidokkal (aprinocarsen, ISIS9606). Ezen vegyületek közül számos anyag lépett be a rákellenes gyógyszerek kutatásának klinikai fázisaiba (Fázis I, II és III). (A PKC rendszerre ható farmakonok tulajdonságairól, valamint a preklinikai/klinikai vizsgálatokban kapott eredményekről adnak összefoglaló képet az alábbi publikációk: [8,11,18]). A katalitikus domén inhibitorainak kifejlesztése során felmerülő egyik jelentős

probléma a specificitás kérdése. Ezen kompetitív antagonisták ugyanis a molekulák kináz doménjén található ATP-kötő régióhoz (C3 a PKC enzimekben) kötődnek, leszorítván onnan a foszforilációhoz szükséges ATP molekulát. Irodalmi adatok szerint ugyanakkor a humán genomban több mint 500 különböző kináz enzim található [216], amelyek erősen konzerválódott ATP-kötő régiói nagyfokú homológiát mutatnak egymással. Ebből következően az egyes enzimekre specifikus gátlók kifejlesztése jelentős kihívásokat tartogat a molekulaszintézissel foglalkozó vegyészek számára. A C1 doménnel rendelkező szignál-proteinek ugyanakkor már jóval kisebb számban fordulnak elő a sejtekben, amely tény már önmagában is csökkenti az aspecifikus moduláció lehetőségét. Azt sem szabad azonban elfelejtenünk, hogy a C1 doménhez kapcsolódó ligandumok enzimaktivációt okoznak, ellentétben a kináz-inhibitorok enzimgátló funkciójával. A PKC izoformák antagonistikus funkcióinak ismeretében ugyanakkor ez egyáltalán nem zárja ki ezen farmakoterapiás megközelítés létjogosultságát a daganatellenes gyógyszerek kutatásában, hiszen a proapoptotikus és antiproliferatív hatásokat közvetítő izoformák aktivációja - elméletileg - ugyanazt a hatást válthatja ki, mint az antagonistikus (proliferációt serkentő, antiapoptotikus) izoformák gátlása. Amennyiben sikerülne az egyes PKC izoformák C1 doménjéhez szelektíven kötődő, így izoforma-specifikus aktivációt megvalósító farmakonokat kifejlesztenünk, úgy az egyes izoformák célzott aktivációján keresztül lehetőségünk nyílhat többek között a faggyúmirigyből kiinduló egyes kórfolyamatok terápiás befolyásolására is. Ahogy azt fentebb már említettük, az aPKC ζ aktivitásának fokozása például visszaszoríthatja a sebocyták lipidszintézisét, amely a sebumtermelés csökkentésén keresztül kedvező hatással lehet például az *acne* patogenezisére. Az nPKC δ (és/vagy cPKC α) szelektív farmakológiai aktivációja pedig olyan kórfolyamatokban lehet kedvező hatású, amelyekben a sejteknek a terminális differenciálódás irányába való elköteleződésére van szükség. Ezáltal például a faggyúmirigyből kiinduló daganatok esetében elősegíthetjük a tumorosan transzformált sebocyta klónok érési folyamatait, amelynek segítségével visszaszoríthatjuk neoplasztikus túlburjánzásukat.

A PKC enzimek (és egyéb C1 domén tartalmú jelátviteli fehérjék) C1 doménon keresztüli modulációjának kutatása képezi a laboratóriumunk munkásságának egyik fő irányvonalát. Ezen kiterjedt témakör keretein belül intenzív kutatómunka irányul a különböző C1 domén ligandumok (természetes és szintetikus vegyületek) pontos celluláris hatásmechanizmusainak feltérképezésére. Az ezirányú kutatások fontosságát aláhúzza az a tény, hogy a C1 doménhez kötődő vegyületek közül számos anyag található jelenleg is klinikai vizsgálatok különböző fázisaiban (Fázis I, II, III). Ezen vegyületek első

generációjának közös sajátossága, hogy a csoport tagjai természetes (nagyreszt növényekből kivont) anyagok. Az ingenol-3-angelate-ot (más néven PEP005-öt) például az *Euphorbia antiquorum* nevű növényből nyerték ki, és jelenleg az aktinikus keratózis és a bőr nem-melanoma eredetű karcinómáinak kezelésében tesztelik klinikai hatékonyságát [18,217]. A tengeri szivacsból (*Bugula neritina*) kivont Bryostatin 1 az egyik legintenzívebben vizsgált vegyület ebben a csoportban. Számos klinikai vizsgálatban tesztelik daganatellenes farmakoterápiás potenciálját, önmagában alkalmazva vagy egyéb farmakonokkal kombinációban [9,18,218]. Az *Euphorbia prostrata* növényből kivont prostratin (12-deoxyforbol-13-acetát) hatását a HIV/AIDS terápiában vizsgálják [18,219,220]. A forbol-észterek prototípusát, a *Croton tiglium* nevű növényből előállított PMA-t (differenciálódást indukáló hatása miatt) malignus haematológiai kórképek kemoterápiájában vizsgálják [221-223]. Annak ellenére, hogy ezen C1 doménhez kötődő természetes vegyületek egyes klinikai vizsgálatokban reményteljes eredményeket mutatnak, nem szabad elfelejtenünk azt a tényt, hogy komplex hatásmódjuk jelenleg még nincs részletesen feltérképezve.

A PKC rendszer biológiai funkcióját vizsgáló kutatások alapján mára már egyértelművé vált, hogy a számos izoformával rendelkező enzimsalád rendkívül összetett módon képes szabályozni a sejtfolyamatokat. A különböző izoformák adott sejttípusok esetében tapasztalt ellentétes biológiai funkcióin túl az egyes izoenzimekről az is bebizonyosodott, hogy különböző sejtféleségekben eltérő módon befolyásolhatják ugyanazon sejtfolyamatokat [20]. Ezen tények már önmagukban is jelentősen bonyolítják a PKC funkció szelektív farmakológiai befolyásolására irányuló törekvéseket. A rendszer komplexitása azonban nem merül ki ennyiben, hiszen az utóbbi évek kutatásainak köszönhetően hat másik molekulacsaládot azonosítottak, amelyek tagjairól bebizonyosodott, hogy mindannyian rendelkeznek a (klasszikus és novel) PKC enzimek C1 doménjével szerkezetileg homológ, típusos C1 doménnel. Ide tartoznak a kináz aktivitással bíró PKD, DGK és MRCK enzimek, a kis GTP-ázok aktivációs/deaktivációs mechanizmusában szerepet játszó RasGRP és chimaerin molekulacsalád, valamint a „scaffold” funkciót ellátó Munc-13 proteinek [8,13]. A DAG/forbol-észter-szenzitív szignál-proteinek egyre növekvő száma (jelenleg több mint 20 tagot magába foglaló molekulacsalád) érthetően egyre nagyobb kihívás elé állítja a szelektív C1 domén ligandumok kifejlesztésére, valamint a PKC funkció C1 doménon keresztüli szelektív befolyásolására irányuló kutatásokat. Különösen annak a fényében igaz ez megállapítás, hogy a nagy affinitású ligandkötőhelyek nagyfokú strukturális homológiát mutatnak a csoportba tartozó C1 doméneken belül, mivel a ligandkötésre alkalmas szerkezet erősen konzerválódott a molekulák evolúciója során. Nem szabad elfelejtenünk ugyanakkor,

hogy a C1 doménnel rendelkező molekulák nagycsaládjának sokszínűsége jóval elmarad a több mint 500 különböző enzimet magába foglaló protein kináz szupercsalád heterogenitásától, amelynél a katalitikus domének nagyfokú homológiája miatt a szelektív kináz inhibitorok kifejlesztése rendkívüli nehézségeket jelent (lásd fent).

Az utóbbi években azonosított DAG/forbol-észter-szenzitív C1 doménnel rendelkező szignál-proteinek egyre bővülő köre azonban nemcsak a kutatási terület kihívásait növelte, hanem egyben újabb izgalmas farmakoterápiás lehetőségek előtt nyitotta meg a kapukat, hiszen ezek a molekulák számos központi jelentőségű szignáltranszdukciós folyamatban játszanak alapvető szerepet [7,8,13]. A ligandszenzitív C1 domének jelenlétének kimutatása az említett szignál-proteinekben tehát új potenciális lehetőségeket adhat a kutatók kezébe, hogy egy új aspektusból, a C1 doménon keresztül próbálják meg ezeket a jelátviteli útvonalakat farmakológiailag befolyásolni. Bár az ezirányú fejlesztések jelenleg még gyerekcipőben járnak, a Blumberg laboratórium Victor E. Marquez (National Cancer Institute, Frederick, USA) vegyész-munkacsoportjával karöltve már számos értékes eredményt könyvelhet el ezen a kutatási területen. A C1 ligandumok kifejlesztésének első célkitűzése egy olyan szintetikus platform létrehozása volt, amelynek segítségével, viszonylag egyszerű és könnyen reprodukálható szintetikus lépéseken keresztül, olyan nagy affinitású ligandumokat állíthatunk elő, amelyekkel beható módon vizsgálhatók a ligandum struktúra és a biológiai aktivitás összefüggései. Mivel a természetben található C1 ligandumok (forbol-észterek, indolaktámok, bryostatinok) legtöbb esetben igen bonyolult kémiai struktúrával rendelkeznek, ezért ezen vegyületek alapvázának előállítása csak rendkívül hosszadalmas és költséges szintézis árán valósulhat meg. Ezen felül a legtöbb ilyen vegyület természetes anyagokból való előállítása (növényekből való kivonása stb.), számos esetben, csak kis mennyiségben lehetséges [8]. Ezért a fent említett molekulaszintézis alapvegyületeként az egyszerű szerkezetű DAG molekula került kiválasztásra. Az endogén DAG molekula ugyanakkor a forbol-észterekhez és a bryostatinokhoz képest kisebb C1-affinitással rendelkezik, valamint kevésbé stabil molekula. Az eredeti szerkezet ciklizálásával azonban sikerült egy olyan alapvázat létrehozni, amelynek segítségével jóval stabilabb és nagyobb affinitású DAG származékok szintézisére nyílt lehetőség [171]. Ezen öttagú gyűrűs szerkezet, az ún. DAG lakton alapváz felhasználásával sikerült olyan ligandumokat kifejleszteni, amelyeknek a C1 doménnel szembeni affinitása gyakorlatilag megegyezett a forbol-észterek affinitásával (azaz a (szub)nanomólos tartományban mozgott). Ehhez szükség volt a templátként funkcionáló DAG-lakton alapváz megfelelő oldalláncainak elágazó szénláncú hidrofób csoportokkal való szubsztitúciójára [224]. A DAG-lakton templát kémiai

szintézisének optimalizálása, majd az oldallánc-szubsztitúció lépéseinek kidolgozása megnyitotta a lehetőséget azelőtt, hogy egy sor nagy affinitású DAG származék segítségével vizsgálhassuk a ligandok C1 doménnal szembeni affinitását, valamint a szelektivitást meghatározó központi szerkezeti tényezőket [10,225]. A vizsgálatsorozatban sikerült például olyan DAG lakton vegyületet kifejleszteni (130C037 jelzésű), amely szignifikánsan nagyobb affinitással (vagyis szelektívebben) kötődött a RasGRP molekulák C1 doménjához, mint a PKC molekulák C1 doménjához. A 130C037 anyaggal történő kezelés hatására a RasGRP molekulák szelektív transzlokációját tapasztalták LnCaP sejtekben, valamint RasGRP-n keresztül megvalósuló ERK foszforilációt, amely bizonyítottan nem az előzetes PKC aktiváció következménye volt [163]. Ez a példa is jól mutatta, hogy a szelektív C1 ligandumok további kutatása rendkívül hasznos farmakonok kifejlesztéséhez vezethet el; ezek egyrészt hozzásegíthetnek minket a DAG-szignalizációs útvonalak részletesebb feltérképezéséhez, másrészt jelentős terápiás lehetőségekkel is kecsegtetnek a megfelelő C1 domén tartalmú molekulák targettálása által.

A C1 domén ligandjainak affinitását és szelektivitását meghatározó strukturális determinánsok (pl. oldalláncok nagysága, elhelyezkedése, kémiai szerkezete, stb.) részletes vizsgálata mellett nem szabad megfeledkeznünk a receptorstruktúra (C1 domén) ligandkötését meghatározó szerkezeti tényezők pontosabb feltérképezéséről sem. Bár a domén-ligand-membránlipid (nPKC δ C1b + forbol-13-acetát + lipid) hármas komplexét leíró krisztallográfiás analízis és molekuláris modellezés alapján [131] már jelentős ismeretek birtokában vagyunk a ligand-receptor interakciókat meghatározó kulcsfontosságú tényezőket illetően: *i*) a hidrofób aminosavak jelenlétének fontossága a kötőhely „felső harmadában”; *ii*) a ligand bekötődésének meghatározó szerepe a csúcsi rész folytonos hidrofób felszínének kialakításában, így a receptor-ligand komplexének a membrán lipidkettősrétegébe történő beágyazódásában; *iii*) a C1 domén középső harmadában található pozitívan töltött aminosavak és a membrán fosfolipid molekuláinak anionos csoportjai között kialakuló interakciók jelentősége a létrejött hármas komplex stabilizálásában), a különböző C1 domének ligandfelismerésének finom eltéréseit, így a ligandszelektivitás molekuláris alapjait meghatározó szerkezeti tényezők pontos és részletes feltérképezése még várat magára.

A C1 doménnal rendelkező szignál-proteinek osztályozása jelenleg még erősen leegyszerűsített. Mint ahogyan azt már a „Bevezetésben” említettük, a ligandkötés képességét tekintve ezen molekuláknak eredetileg két csoportját különítették el. A DAG/forbol-észter ligandok iránt affinitással bíró doméneket típusos C1 doméneknek nevezzük, a ligandaffinitással nem rendelkező C1 doméneket pedig az atípusos csoportba soroljuk

[12,13]. A tényleges helyzet ugyanakkor ennél árnyaltabb. A típusos csoportban például előfordulnak olyan szignál-proteinek amelyek kisebb affinitással kötnek ligandot, mint a többi ide tartozó molekula. Ilyenek például az MRCK családba tartozó molekulák, amelyek a típusos C1 doménnel rendelkező család legújabbban azonosított tagjai [226]; ide tartozik továbbá az nPKC θ molekula C1a doménja is [227], amely a többi (klasszikus és novel) PKC molekula C1 doménjához képest kisebb affinitással köt ligandot. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy az atípusos csoport tagjait sem tekinthetjük uniformisnak. Munkacsoportunk korábbi vizsgálatait (az atípusos C1 doménnel rendelkező aPKC ζ és ι izoformákkal [24]) már felvetettük annak a lehetőségét, hogy ezt a csoportot tulajdonképpen két további alcsoportra lehetne osztani. Az első alcsoportba azon C1 doménnel rendelkező szignál-proteinek tartoznának, amelyeknél a kötőhely nyilvánvaló strukturális torzulásai összeegyeztethetetlenek a ligandkötéssel (ilyen C1 doménnel rendelkeznek például a c-Raf és a KSR proteinek). A másik alcsoportba pedig az aPKC enzimek és az azokhoz hasonló szerkezetű C1 doménnel rendelkező proteinek kerülhetnek, amelyek közös tulajdonsága, hogy a ligandkötőhelyük geometriai felépítése nem mutat semmiféle torzulást, tehát a kötőseb szerkezete alapján DAG/forbol-észter kötésre alkalmasnak tűnnek. Esetükben a hiányzó (vagy jelentősen lecsökkent) ligandaffinitást egyéb gátló faktorok jelenléte, és nem a kompatibilis konformáció hiánya okozza. Az aPKC-k esetében például négy arginin molekula jelenléte (a kötőhely csúcsának peremén) tehető felelőssé az affinitás drámai csökkenéséért. Ezen aminosavak oldalláncai bizonyos konformációkban „belóghatnak” a kötősebbe (ezáltal kompetitíven gátolva a ligand bekötődését), illetve a kötőhely csúcsi részének töltéseloszlását megváltoztatva előnytelenül befolyásolhatják a membránasszociációt. A ligandaffinitásért felelős alapvető kötőhely-struktúra ugyanakkor jelen van az aPKC-k C1 doménjában is, emiatt tulajdonképpen jelentősen legyengített affinitású receptoroknak tekinthetők. Az alacsony affinitásért felelős strukturális determinánsok pontos ismerete rendkívül értékes információkat nyújthat az aPKC-szelektív ligandok kifejlesztésén fáradozó vegyészek számára, hiszen ezen aminosavak targettálása által (például megfelelően módosított oldalláncokkal rendelkező DAG-laktonok segítségével) lehetővé válhat az aPKC enzimaktivitás C1 doménon keresztüli szelektív befolyásolása. (A csökkent ligandaffinitásért felelős különleges struktúrák jelenléte, paradox módon, tulajdonképpen elő is segítheti a szelektív ligandok kifejlesztését, hiszen ezek az aminosavak más C1 doménekben nem fordulnak elő; így azok a ligandumok, amelyek képesek velük interakcióba lépni, nagyon specifikusak lesznek az őket tartalmazó ligandkötőhelyre, és más C1 doménekhez elviekben csak jóval kisebb affinitással, vagy egyáltalán nem kötődnek.

Ennek persze előfeltétele, hogy sikerüljön olyan ligandokat létrehozni, amelyek megfelelő affinitással kötődnek ezen struktúrákhoz.) Az aPKC-k ligandszenzitivitására irányuló vizsgálatok eredményeit felhasználva a Blumberg laboratórium, a Marquez munkacsoporttal együtt, jelenleg olyan DAG-laktonok kifejlesztésén és biológiai rendszerekben való tesztelésén dolgozik, amelyek megvalósíthatják ezt a célkitűzést. Az előzetes eredmények biztatóak, hiszen már sikerült olyan DAG-laktonokat kifejleszteni, amelyek fokozott affinitást mutatnak az aPKC-szerű C1 domént hordozó PKC proteinek iránt (arginin mutációt tartalmazó nPKC δ , illetve cPKC α) (nem publikált eredmények). A tényleges aPKC izoformákhoz szelektíven kötődő vegyületeket egyelőre még nem sikerült előállítanunk, de amennyiben sikerrel járnak az ezirányú kutatások, úgy megnyílhat a lehetőség az aPKC izoenzimek által közvetített jelátviteli útvonalak szelektív befolyásolására. Ismét visszautalnék itt arra a megállapításra, hogy az aPKC ζ aktivitásának szelektív fokozása, a sebocyták lipidszintézisének visszaszorításán keresztül, jótékony hatással lehet az *acne* tüneteinek kezelésében, hiszen a (hyper)seborrhoeás állapot a betegség egyik legfontosabb patogenetikai tényezője.

Az „atípusos” C1 doménnel rendelkező Vav1 DAG/forbol-észter „érzéketlenségét” meghatározó molekuláris jellegzetességek

A C1 domének molekulaszervezetének vizsgálata alapján úgy tűnik, hogy az aPKC izoformákon kívül számos egyéb atípusos csoportba sorolt szignál-protein rendelkezik olyan kötőhely-struktúrával, amely alapvetően összegegyeztethető a nagy ligandaffinitással; ezért, az aPKC izoformákkal együtt, az atípusos C1 doménnel rendelkező proteinek külön alcsoportját alkothatják. Ide tartozik például a Vav proteincsalád három izoformája (Vav1, 2 és 3) és a RasGRP2 molekula, amely a többi RasGRP izoformával (RasGRP1, 3 és 4) ellentétben nem mutat DAG/forbol-észter-affinitást [228]. Jelen munkánkban a Vav1 molekula C1 doménjének ligandaffinitását meghatározó tényezőket karakterizáltuk. A közelmúltban elvégzett, nagy pontosságú röntgenkristallográfiás szerkezetvizsgálatok [137] is kimutatták, hogy a Vav1 gyakorlatilag teljesen azonos felépítésű C1 doménnel rendelkezik, mint a nagy affinitású DAG/forbol-észter receptor, az nPKC δ C1b. Ennek ellenére, a ligandaffinitásra irányuló korábbi kísérletes bizonyítékok [162] azt támasztották alá, hogy a Vav1 nem képes ligandkötésre, így a molekulát az atípusos C1 doménnel rendelkező

fehérjékhez sorolták (bár az irodalomban találunk ligandszenzitív GEF aktivitásról beszámoló közleményt is [229]).

A Disszertációban részletezett kísérletek során sikerült rávilágítanunk a ligandkötés hiányának hátterében álló molekuláris mechanizmusokra. Elsőként azt bizonyítottuk, hogy az affinitás hiánya nem abból adódik, hogy a molekula C1 doménjének ligandkötőhelyét egyéb domének elfednék a molekulán belül (tehát nem a felszínen való exponáltság hiánya okozza a ligandkötésre való képtelenséget), hiszen *i*) az izolált Vav1 C1 domén sem mutat ligandszenzitivitást; ugyanakkor *ii*) a megfelelő mutációk birtokában a teljes nagyságú Vav1 molekula is képessé válik ligandkötésre (23. ábra). Ezen felül az egyik legfontosabb megfigyelésünk az volt, hogy a Vav1 C1 doménjának kötőhelye (a molekuláris modellezés tanúsága szerint) a típusos C1 doménekhez képest csökkent hidrofóbicitást mutat a ligandkötőzseb „csúcsi” felszínén, amely ezáltal akadályozó tényezőként jelenik meg a domén membránhoz történő asszociációja során, hiszen ebben a folyamatban a hidrofób kölcsönhatásoknak kulcsfontosságú szerepük van [131]. Mivel a C1 domén tulajdonképpen a lipiddkettősréteggel együttesen alkotja a ligand stabil kötésére alkalmas nagy affinitású receptorstruktúrát, ezért könnyen belátható, hogy a C1-domén-ligand-membrán hármas komplexének kialakulását gátló bármely szerkezeti tényező jelenléte (az adott esetben a hidrofil aminosavak a Vav1 C1 domén ligandkötő zsebének peremén) azzal a következménnyel jár, hogy csökken (a Vav1 esetében drasztikus mértékben) a molekula ligandaffinitása. Kísérleteink során a Vav1 molekulája C1 doménjában négy olyan hidrofil természetű aminosavat azonosítottunk, amelyekről bebizonyosodott, hogy felelőssé tehető a ligandkötőzseb hidrofóbicitásának csökkentéséért és a következményes affinitáscsökkenésért (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Thr²⁴). Ezen felül egy további tényezőt is azonosítottunk, amely szintén a membránhoz való kötődés gyengítésén keresztül fejtette ki a ligandaffinitást csökkentő hatását. A korábbi molekulászerkezeti vizsgálatok tanúsága szerint [131] a C1 domének kötőhelyének hidrofób csúcsi felszíne alatt egy jórészt pozitívan töltött aminosavakból álló „gyűrű” található, amely azáltal segíti a domén membránhoz való kötődését, hogy ionos kölcsönhatásokat alakít ki a membrán foszfolipid molekuláinak anionos „feji” csoportjaival. Ebben a régióban identifikáltunk egy olyan pozíciót (26-os, a C1 nomenklátúra szerint), amelyben a típusos C1 domének esetében szinte kizárólag Lys, Arg és His (vagyis pozitív oldalláncokkal bíró) aminosavak fordulnak elő. A Vav1 C1 doménjában ezen a helyen ugyanakkor Tyr található, amelynek jelenléte (a fentiek értelmében) lecsökkenti az említett ionos kapcsolatok létrejöttét, így a C1-domén-membrán interakció gyengítésén keresztül csökkenti a molekula ligandaffinitását.

Fontos megfigyelés mind a Vav1, mind pedig (korábban) az aPKC enzimek ligandkötőhelyének szerkezetét illetően, hogy egyik molekulánál sem tudtunk egy olyan kitüntetett aminosavat azonosítani, amely önmagában jelentős torzulást okozott volna a kötőseb geometriai felépítésében (ezáltal lehetetlenné téve a ligandkötést). Ehelyett mindkét molekula esetében az volt a jellemző, hogy több, önmagában szerény befolyással bíró aminosav negatív hatása kumulálódott, mely végül azt eredményezte, hogy sem a Vav1, sem pedig az aPKC-k nem rendelkeznek kimutatható ligandszenzitivitással. Az egyes aminosavak relatív hozzájárulása a Vav1 ligandaffinitásának csökkentéséhez némileg eltérőnek adódott annak függvényében, hogy az nPKC δ vagy a Vav1 alapvázát használtuk a mutációs kísérletek templát molekulájaként. Ugyanis az nPKC δ C1b egyszeres mutánsaival kapott eredmények (1. táblázat) azt sugallták, hogy az egyes nem-kompatibilis (Vav1-szerű) aminosavak jelenléte csaknem azonos mértékben gyengíti a ligandszenzitivitást. Ezzel szemben a Vav1 négyszeres mutánsainak (amelyek ebben a megközelítésben analógnak tekinthetők az nPKC δ C1b egyszeres mutánsaival) adatai alapján arra következtethettünk, hogy a 9-es és a 11-es pozíciókban található Glu és Pro molekulák nagyobb hatással vannak a ligandaffinitásra, mint a másik három (Glu¹⁰, Thr²⁴ Tyr²⁶) nem kompatibilis molekula. (Emellett megjegyzendő még, hogy az utóbbi megközelítés szerint az öt aminosav egyenként is jelentősebb csökkenést okozott a ligandkötésben, mint ahogyan azt az nPKC δ C1b egyszeres mutánsainak eredményei alapján vártuk volna.) A két megközelítésből adódó különbségek felhívhatják a figyelmet a kötőseb molekuláris környezetének fontosságára; nevezetesen arra, hogy a ligandkötés szempontjából nem kulcspozícióban elhelyezkedő aminosavak is módosíthatják a C1 domén ligandszenzitivitását. Ez összhangban van a molekuláris lipofilicitás meghatározásának eredményeivel, mely szerint a vad típusú nPKC δ C1b doménjának össz-lipofilicitása (22. ábra) felülmúlja az ötszörös mutáns Vav1 C1 lipofilicitását annak ellenére, hogy az öt kulcspozícióban mindkettő azonos aminosavakat tartalmaz.

A Vav1 molekula mellett munkacsoportunk a Vav2, a Vav3 és a RasGRP2 esetében is elkezdte vizsgálni (nem publikált adatok), hogy a Vav1 esetében azonosított strukturális tényezők szerepet játszhatnak-e ezen molekulák ligandszenzitivitásának csökkentésében is, hiszen (ahogy azt fentebb említettük) az elemzések szerint nagy valószínűséggel ezen molekulák atípusos C1 doménjei is teljesen kompatibilis geometriai szerkezetű ligandkötősebbel rendelkeznek, amely alapján nagy ligandszenzitivitást várhatnánk tőlük. (A Vav2, a Vav3 és a RasGRP2 molekulákkal kapott eredményeink még nem kerültek közlésre). Az előzetes eredmények alapján azonban elmondhatjuk, hogy a Vav1

ligandkötőzsebének csúcsi peremén azonosított kulcsfontosságú pozíciók a Vav2 és a Vav3 esetében is meghatározó jelentőségűek, hiszen az ott található aminosavak mutációjával (nPKC δ C1b-szerű aminosavakra cserélve az eredeti molekulákat), sikerült nagy affinitású DAG/forbol-észter-receptorra „változtatnunk” mind a Vav2, mind a Vav3 C1 doménjét. Ezek alapján tehát elmondhatjuk, hogy a kötőzseb csúcsi felszínének hidrofóbicitása a Vav2 és a Vav3 esetében is fontos a csökkent ligandaffinitás vonatkozásában. A Vav3 C1 doménjáról ezenfelül az is bebizonyosodott, hogy a ligandkötőhelyének szerkezete közelebb áll a típusos C1 domének szerkezetéhez, mint a Vav1 molekuláé; ezesetben ugyanis a 9-es és a 10-es pozíciókban található Thr és Arg molekulák nem hatnak negatívan a ligandkötésre, és csupán három mutáció (a 11-es, a 24-es és a 26-os pozíciókban) elég ahhoz, hogy a Vav3 elérje az ötszörös Vav1 mutáns és a vad típusú nPKC δ (szub)nanomoláris ligandaffinitását. A Vav2 esetében ugyanakkor úgy tűnik, hogy további kulcsfontosságú aminosavak is jelen lehetnek a C1 domén struktúrájában, amelyek csökkentik a ligandaffinitást, mivel az ötszörös Vav2 mutáns szenzitivitása legalább egy nagyságrenddel alatta marad az nPKC δ ligandaffinitásának. Ezen aminosavak pontos azonosítása és az affinitáscsökkentő hatásmechanizmus részletes jellemzése további vizsgálatokat igényel.

A három rokon Vav enzimen kívül a RasGRP2 C1 doménjának affinitásvizsgálata is fontos felfedezésekhez vezetett (nem publikált adatok). Mindenekelőtt sikerült bizonyítanunk, hogy a vad típusú molekula is rendelkezik egy nagyon alacsony, de még detektálható mértékű szenzitivitással, amely az *in vitro* vizsgálatok alapján a mikromoláris tartományba esik. Ezen felül sikerült két olyan pozíciót (8-as és 19-es a C1 nomenklátúra szerint) is azonosítanunk a RasGRP2 C1 doménjében, amelyek mutációjával (szintén az nPKC δ C1b doménjében található kompatibilis aminosavra cserélve az eredeti aminosavat) jelentős ligandszenzitivitás-növekedést érthetünk el a RasGRP2-nél is (bár ebben az esetben sem értük el az nPKC δ -nál tapasztalt (szub)nanomoláris tartományt). Egyértelmű, hogy mindhárom molekula (Vav2, Vav3 és RasGRP2) esetében szükség van még további vizsgálatokra a ligandaffinitást meghatározó tényezők pontos karakterizálásához (főként az egyéb lehetséges affinitáscsökkentő hatások azonosításához). Az eddigi eredmények alapján azonban úgy tűnik, hogy ezen molekulákat a Vav1, valamint az aPKC ζ és ι enzimek mellett [24] egy olyan új alcsaládba sorolhatjuk az atípusos C1 doménnel rendelkező szignálproteinek csoportján belül, amelynek tagjai mindenképpen elkülönülnek a többi atípusos C1 doménnel rendelkező molekulától (c-Raf, KSR) abban a tekintetben, hogy ligandkötőhelyük nem mutat strukturális torzulást, így megfelelő körülmények között alkalmas lehet módosított DAG/forbol-észter ligandok befogadására. Ezen alcsalád láthatóan egyre szaporodó tagjainak

további vizsgálata számos értékes információt nyújthat a ligand-receptor interakciókat meghatározó kulcsfontosságú tényezőket illetően, így a ligandok strukturális determinánsainak feltérképezésére irányuló kutatások mellett [8,10] jelentősen hozzájárulhatnak a jelátviteli folyamatokban központi szerepet játszó szignál-proteinek C1 doménen keresztüli farmakológiai befolyásolásának eredményességéhez. A C1 doménhez kötődő ligandumok klasszikus molekuláris célpontjai (a PKC enzimek és egyéb típusos C1 doménnel rendelkező szignál-proteinek) mellett ugyanakkor ezen atípusos, de kompatibilis szerkezetű C1 doménnel rendelkező proteinek új, izgalmas targetjei lehetnek a sejtfunkciók szabályozására irányuló farmakoterápiás fejlesztéseknek; különösen abban az esetben, amennyiben bebizonyosodik, hogy C1 doménjaik fontos szereppel bírnak az adott jelátviteli molekula biológiai funkciójának szabályozásában.

A Vav1 C1 doménjának az enzimaktivitás (GNE aktivitás) szabályozásában betöltött központi szerepét számos tanulmány felvetette [158-161]. A londoni Rittinger munkacsoport legfrissebb röntgenkrisztallográfiás vizsgálatai [137] kimutatták, hogy a Vav1 molekulán belül egy extenzív intramolekuláris kapcsolatrendszer áll fenn a PH-C1 régió és a DH domén között, amely stabilizálja a DH domén $\alpha 6$ jelölésű peptidszakaszának (az enzimaktivitás szempontjából) optimális konformációját, ezáltal elősegítvén a Vav1 protein maximális GNE aktivitását. A C1 domén ligandkötőhelyének „bejárata” ugyanakkor a közvetlen közelében helyezkedik el azoknak a peptidszakaszoknak, amelyek ezeket a szoros kötéseket kialakítják a molekulán belül. Ráadásul a molekulaszakasz részletes vizsgálata, többek között, arra is rávilágított, hogy a C1 domén C-terminális peptidhurkának alkotásában részt vevő Leu²⁰, Arg²² és Phe²⁵ aminosavak (számozás a C1 terminológia szerint) jelentősen hozzájárulnak az említett intramolekuláris kapcsolatok kialakításához azáltal, hogy kötéseket létesítenek a DH domén $\alpha 6$ hélixében helyet foglaló Asp³⁶⁵ és Asp³⁷⁶ molekulákkal (számozás a teljes Vav1 terminológiája szerint). Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a C1 domén ligandkötőhelyének peremén elhelyezkedő nem-szokványos aminosavak lecsökkentik a csúcsi felszín hidrofóbicitását, így megakadályozzák a domén membránasszociációját; ugyanakkor a Vav1 C1 kötőhelyének strukturális felépítése nem zárja ki a ligand bekötődésének potenciális lehetőségét. Könnyű belátni, hogy a fent említett három aminosav (Leu²⁰, Arg²² és Phe²⁵) közreműködésével létrejött DH-C1 kapcsolatok is könnyen felbomolhatnak a ligand megkötésének hatására fellépő esetleges C1 konformációváltozás következtében. Emiatt az $\alpha 6$ hélix optimális konformációját stabilizáló kapcsolatok zavart szenvedhetnek, ami végső soron az enzimaktivitás csökkenéséhez vezethet. A DH és a C1 domén között kialakult kapcsolatok megzavarásának egy másik lehetséges módját tárja elénk

a 24.B ábra, amelyen a forbol-13-acetát bekötődésének lehetséges strukturális hatásait elemezzük a DH domén ideális konformációjának vonatkozásában. Látható, hogy a C1 domén ligandkötőhelye és a DH domén megfelelő peptidszakaszai olyan szoros közelségben helyezkednek el egymás mellett, hogy a forbol-13-acetát molekulának a kötőhelyre való beilleszkedése következtében egyes atomok „összeütköznek” egymással; vagyis a bekötődés csak abban az esetben lehetséges, amennyiben a DH domén megfelelő peptidszakaszai eredeti pozíciójukból elmozdulnak. Ez természetesen ismét azzal járna, hogy a ligandkötés következtében megváltozna az enzimaktivitás szempontjából kritikus fotosságú α hélix optimális konformációja, így lecsökkenne a Vav1 GNE aktivitása. Mindezek alapján tehát úgy tűnik, hogy amennyiben sikerülne a Vav1 C1 doménjához stabilan kötődő ligandokat kifejleszteni, úgy joggal várhatnánk azt, hogy ezek a ligandok a DH-C1 kötések megzavarása révén lecsökkentsék az enzimaktivitást, vagyis a Vav1 enziminhibitoraiként funkcionáljanak.

A Vav1 C1 ligandaffinitásának karakterizálása során azonosított nem-kompatibilis aminosavak ismerete nagyban elősegítheti az ezirányú fejlesztéseket. Nem kérdéses, hogy a specifikus Vav1-C1-ligandok kifejlesztéséhez érdemes olyan vegyületek alapvázát felhasználni, amelyek bizonyítottan nagy affinitással rendelkeznek a C1 struktúra iránt. Ilyen vegyületek például a forbol-észterek, a DAG, vagy a bryostatinok [8,10]. Mivel a Vav1 C1 doménje megőrizte a nagy ligandaffinitást mutató C1 domének alapvető strukturális jegyeit, logikus elgondolás, hogy a molekulatervezés során úgy módosítsuk ezen klasszikus C1 ligandok kémiai szerkezetét, hogy képesek legyenek kapcsolatot létesíteni a Vav1 C1 kötőhelyének különleges (azaz csak itt előforduló) aminosav molekuláival. Ez a megközelítés azzal az előnnyel is kecsegtet, hogy amennyiben ezen nem-szokványos aminosavak targetálásán keresztül sikerülne a Vav1 C1 doménjához stabilan kötődő ligandumot létrehozni, úgy valószínűleg jelentős szelektivitást is elérhetnénk, hiszen a sejtekben előforduló több mint 20 típusos C1 domén [13] egyike sem rendelkezik ilyen aminosavösszetétellel a ligandkötőhely környékén (16. ábra). Az ezirányú munkálataink során, az aPKC enzimek esetében már említett, DAG-lakton molekulákat használtuk fel templátként, kihasználva azt a kedvező körülményt, hogy a DAG-lakton alapváz szintézise jóval olcsóbb és egyszerűbb, mint a jelentősen bonyolultabb struktúrával bíró forbol-észter vagy bryostatin alapvázak szintézise [8,10]. Ugyanakkor a megfelelő oldalláncok birtokában a DAG-laktonok is képesek nagy affinitással kötődni a C1 doménhoz, így az alapvázhoz csatlakozó oldalláncok szerkezetének kémiai modifikációjával lehetőségünk adódik a különböző C1 domén struktúrákkal szemben potenciális szelektivitást mutató DAG-laktonok

tesztelésére. Az volt az elképzelésünk, hogy amennyiben pozitívan töltött oldalláncokat (jelen esetben guanidínium (**6c**) és piridínium csoportokat (**8a-f**); lásd 25. ábra) kötünk a DAG-lakton alapvázra, nagy eséllyel semlegesíthetjük a Vav1 C1 doménjának 9-es és 10-es pozíciójában helyet foglaló glutamát molekulák negatív töltéseit, ezáltal növelve a felszíni hidrofóbicitást és elősegítve a membránasszociációt. Bár a legtöbb, pozitív oldallánccal rendelkező DAG-lakton csupán közepes affinitással kötődött, néhány közülük (a prototípusos forbol-észter PDBU-val összehasonlítva) jelentősen emelkedett relatív szelektivitást mutatott a Vav1-szerű aminosavakat tartalmazó C1 domén struktúrával szemben (amelyet jelen esetben az nPKC δ C1b dupla és tripla mutánsai képviseltek; ezek a mutánsok a vad típusú Vav1 C1 domént helyettesítették, az „Eredmények” fejezetben említett technikai megfontolások miatt). Így viselkedtek a **6c** és a **8f** jelzésű DAG-lakton molekulák, amelyek, a 27. ábrán látható molekuláris modellek tanúsága szerint, valóban képesek lehetnek ionos kötések kialakítására a Vav1 C1 doménban található negatívan töltött glutamát aminosavakkal; ennek eredményeképpen hatékonyan semlegesíthetik azok töltéseit, így pozitívan befolyásolhatják a szenzitivitás szempontjából kulcsfontosságú membránasszociációt. A kezdeti biztató eredmények ellenére fontos hangsúlyoznunk, hogy a pozitívan töltött DAG-lakton vegyületek egyelőre csupán a kezdeti lépését jelentik a szelektív Vav1 C1 ligandumok kifejlését célzó farmakológiai vizsgálatoknak.

Ezek után joggal merülhet fel bennünk a kérdés, hogy lehetséges-e közvetlenül vizsgálni a C1-ligandok hatását a Vav1 enzimatis aktivitására. Sejtes rendszerekben ez természetesen jelentős nehézségekbe ütközne, az ilyen ligandokra szenzitív C1 doménnel rendelkező szignál-proteinek relatíve nagy száma miatt. Ugyanakkor a rekombináns technikával előállított és tisztított Vav1 molekulák, illetve Vav1 fragmentumok felhasználásával az enzimatis GNE aktivitás fluorimetriás módszerekkel vizsgálható [159-161,230,231]. Ezek a módszerek olyan fluoreszcensen jelölt GDP vagy GTP analógokat alkalmaznak, amelyek emissziós spektruma megváltozik annak függvényében, hogy valamely kis GTP-áz molekulához (a Vav1 molekula szubsztrátjához) kötötteen vagy az oldatban szabadon találhatók. A fluoreszcenciaintenzitás-változásának nyomonkövetése tehát lehetőséget ad a nukleotidcsere sebességének mérésére, így az enzimaktivitás megítélésére. A londoni Rittinger munkacsoport sikerrel alkalmazta ezt a módszert különböző Vav1 fragmentumok enzimaktivitásának mérése során [137]. Munkacsoportunk azt a célt tűzte ki maga elé, hogy meghatározza az Ac, a DH, a PH és a C1 doméneket tartalmazó Vav1 fragmentum (Vav1-Ac-DH-PH-C1) vad típusának, illetve ötszörös mutáns változatának GNE aktivitását különböző C1 ligandumok jelenlétében. Sajnos a rekombináns génexpresszió,

valamint a bakteriális rendszerben expresszált proteinek tisztításának nehézségei miatt (főként a mutáns proteinek esetében) mindeközéig nem sikerült megbízható és reprodukálható eredményeket felmutatnunk ezen vizsgálatsorozatban. Ezen „tisztá” rendszerek használata a jövőben ugyanakkor nagyon hasznos kísérletes módszernek bizonyulhat, hiszen a génextpresszió optimalizálásával olyan rekombináns Vav1 fragmentumokat állíthatunk elő, amelyek segítségével közvetlenül vizsgálhatók mind a C1 domén mutációk, mind pedig a (potenciálisan Vav1-szelektív) C1 ligandok lehetséges hatásait az enzimatis funkciókra.

Az irodalmi adatok alapján nyilvánvaló, hogy a Vav1 funkció farmakológiai modulálása számos területen járhat jelentős terápiás haszonnal [133,135,146,149]. A Vav1 molekula szignáltranszdukciós útvonalakban betöltött sokoldalú szabályozó szerepét az immunrendszer működésének számos pontján leírták. A molekula egyik legfontosabb funkciója a T-sejtek érésének és aktivációjának szabályozása [135,138]. Csökkent Vav1 expresszió esetén a T-lymphocyták érési folyamatai zavart szenvednek a thymusban. A molekula GNE aktivitásának fontos szerepe van a T-sejt-receptorok aktiválásának hatására létrejövő citoskeleton átépülésében is, amely az immunológiai szinapszis kialakulásának, így az antigénre adott hatékony T-sejt válasznak az egyik kulcsfolyamata. Ezenfelül a Vav1 (részben GNE aktivitásán, részben adapter funkcióján keresztül) részt vesz a T-sejtekben kiemelkedő jelentőségű transzkripciós faktor az NFAT aktiválásában, amely pl. immunválaszban kulcsfontosságú interleukinek termelődését irányítja [149]. A T-sejt funkciók jelátviteli folyamataiban betöltött központi szerepe mellett a Vav1 részt vesz számos egyéb immunsejt aktivációs mechanizmusában. Szerepét leírták a B-sejt funkciók szabályozásában, a Natural Killer sejtek citotoxikus funkciójának jelátvitelében, valamint a makrofágok migrációjának és fagocitotikus aktivitásának regulációjában [232]. Ezek alapján joggal merülhet fel a Vav1-funkciót gátló farmakonok potenciális szerepe az immunszuppresszív terápiában, amely a transzplantációs medicina egyik alappillére. Az olyan immunszuppresszív szerek, mint a cyclosporin A vagy a tacrolimus forradalmasították a szervtranszplantációval foglalkozó tudományterületet, hiszen nagyon effektív farmakológiai eszközöket adtak a klinikusok kezébe a beültetett szervek rejekciójának megelőzésére és kezelésére. Ismert, hogy az említett gyógyszerek az NFAT-aktivitás gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat. Használatuk során ugyanakkor, jótékony hatásai mellett, természetesen egy sor mellékhatással is számolnunk kell (vérképzőszervi, emésztőrendszeri, idegrendszeri tünetek, stb.), amelyek egy része összefüggésben lehet az NFAT molekula gátlásával a lymphocytáktól eltérő sejtekben [146]. Mivel a Vav1 molekula, fiziológias körülmények közt, kizárólag haemopoetikus eredetű sejtekben expresszálódik, ezért az NFAT-aktivitás

Vav1-funkción keresztüli gátlása kézenfekvő terápiás haszonnal járhat az immunszuppresszív kezelés mellékhatásainak redukálását illetően.

Az immunrendszer sejtjeiben betöltött funkcionális szerepén túl a Vav1 molekulát összefüggésbe hozták bizonyos humán tumorok patogenezisével is [146,149]. Bár onkogén potenciállal bíró, mutáns Vav1 expressziót eddig egyetlen tumor esetében sem sikerült kimutatni, a vad típusú molekula aberráns expressziója számos malignus folyamatban volt kimutatható (pl. melanoma malignum, pancreas ductalis adenocarcinoma); ezek alapján feltételezhető a Vav1 patogenetikai szerepe a tumorgenezisben és a tumorprogresszióban. A citoskeletális struktúra átépülésének befolyásolásán keresztül (a Rho/Rac1 fehérjék aktiválása által) pedig hozzájárulhat a neoplasztikusan transzformált sejtek invazivitásának és metasztatikus potenciáljának fokozásához [134]. Ezek alapján tehát nyilvánvaló, hogy a Vav1 fontos terápiás célpontja lehet az új kemoterápiás gyógyszerek kifejlesztésére irányuló kutatásoknak is.

Mindezekén túl a legújabb kutatások alapján a Vav1 és a Vav3 izoformák szerepe a trombocita-funkciók szabályozásában is előtérbe került. Számos trombocita-aktivációt indukáló mediátorról (pl. trombin, trombopoetin, kollagén, stb.) mutatták ki korábban, hogy jelátviteli útvonalában a Vav1/Vav3 aktiváció is fontos szereppel bír [233-236]. A legfrisebb kutatások emellett összefüggést találtak vérlemezkékben a Vav1/Vav3 működés és a hiperlipidémia hatására fennálló protrombotikus állapot között. A hiperlipidémiás állapotokban a vérben keringő oxidált LDL molekulák képesek a CD36 receptorhoz kötődve aktiválni a trombocitákat; ezen jelátviteli útvonal egyik fontos tényezőjeként azonosították a Vav1/Vav3 aktivációt [237]. Mivel a hiperlipidémia és a következményes atherosclerosis központi jelentőségű a kardiovaszkuláris kórképek patogenezisében, ezért ezen kórállapotok esetében a protrombotikus faktorok ellensúlyozása alapvető terápiás jelentőséggel bírhat, elősegítve a medicina küzdelmét a fejlett világ legnagyobb mortalitással és morbiditással járó betegségei, a szív- és érrendszeri kórképek ellen.

Konklúzió

Megállapításainkat összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a DAG útvonal első (és máig egyben legfontosabb) intracelluláris effektorainak, a PKC enzimeknek a felfedezése és DAG/forbol-észter receptorként való identifikálása óta [41-43,128], a több évtizedes intenzív kutatómunka eredményeképpen, rendkívül jelentős tudás halmozódott fel a DAG effektorok

egyre bővülő nagycsaládjának biológiai funkcióit illetően. Az ismeretek bővülésével ugyanakkor az is nyilvánvalóvá vált, hogy a DAG-effektor funkciók (kezdetben csak PKC funkciók) farmakológiai modulálásának terápiás célú felhasználása nem csekély nehézségekbe ütközik, hiszen a molekulacsalád tagjairól idővel kiderült, hogy jóval kiterjedtebb és bonyolultabb hálózatot alkotnak, mint ahogy azt a kezdetekben gondolták. Elsőként a PKC rendszer jelentős komplexitására derült fény (izofорма-specifikus funkciók, jelentős sejt- és szövetspecifitás, gyakran antagonisztikus szerepek) [17,20,22]; később, a további DAG-szenzitív molekulák és molekulacsaládok azonosításával, jelentősen nőtt az intracelluláris lipidmediátor (és exogén analógjainak, a forbol-észtereknek) felismerésére képes szignál-proteinek száma, ami érthetően még tovább növelte a jelátviteli hálózat összetettségét [7,13,20]. Bebizonyosodott továbbá, hogy a bonyolult jelátviteli hálózat komplexitása több szinten is nyomon követhető, hiszen fény derült például arra, hogy nemcsak az egyes PKC izoformák rendelkeznek antagonisztikus funkciókkal, hanem a különböző DAG-szenzitív molekulacsaládok is képesek egymással ellentétes sejt-folyamatokat indukálni (pl. a DAG kinázok lebontják a sejtben keletkezett DAG molekulát, ezáltal megszüntethetik például a PKC enzimek aktiválását). A hálózat egyes elemei emellett enzimikus funkcióik révén képesek más DAG-effektor családok jelátviteli útvonalait közvetlenül is befolyásolni, azok „upstream” regulátoraként működve. Jellemző példája ennek az a megfigyelés, hogy a PKC enzimek protein-foszforiláció segítségével aktiválhatják a PKD és a RasGRP enzimeket [8]. A DAG-ra épülő jelátviteli hálózat jelentős komplexitásának ismeretében tehát felmerülhet a kérdés, hogy vajon az egyes sejtek szintjén miként dől el az, hogy az extracelluláris szignál hatására felszabaduló DAG molekula a jelátviteli hálózat melyik elemét aktiválja? Továbbá kérdés, hogy vajon sikerülhet-e olyan ligandokat kifejleszteni, amelyek e bonyolult hálózat bizonyos tagjait szelektíven képesek befolyásolni? Az elmondottak alapján érthető, hogy az egyes molekulák C1 doménon keresztüli farmakológiai modulációja jelentős kihívásokat tartogat az ezen a területen tevékenykedő kutatók számára. Ugyanakkor, mivel a PKC enzimekkel egyetemben a többi molekulacsalád tagjai is olyan jelentős sejt-folyamatok szabályozásában vesznek részt mint pl. a sejtproliferáció, a differenciálódás, az apoptózis és az ingerületátvitel, ezért az ezirányú kutatások mindenképpen központi jelentőséggel bírnak. Véleményünk szerint a C1 doménnal rendelkező jelátviteli molekulák funkcióját vizsgáló kutatásoknak a következő „kettős” célkitűzést kell a jövőben szem előtt tartaniuk: *i)* A C1 doménnal rendelkező molekulacsaládok jelátviteli útvonalakban betöltött izoforma-specifikus szerepének még részletesebb és pontosabb jellemzése a különböző sejt- és szövetfeleségek esetében; valamint

ii) Az egyes molekulák C1 doménjának ligandszenzitivitását meghatározó szerkezeti tényezők felismerése, mind a kötőhely struktúrájának, mind pedig a ligandok kémiai felépítésének aspektusából. Jelen munkánk ehhez a kettős célhoz járult hozzá a Disszertációban bemutatott eredményekkel. Egyfelől, a bőr egy speciális „mini-szervjében”, a faggyúmirigyben sikerült bizonyítanunk a PKC rendszer kulcsfontosságú szerepét a sejtfunkciók szabályozásában, valamint rávilágítanunk az egyes izoformák specifikus szerepére a sebocyták túlélését és terminális differenciálódási programját meghatározó jelátviteli útvonalakban. Másrészt, az atípusos C1 doménnel rendelkező, sokoldalú szignáltranszducer molekula, a Vav1, ligandszenzitivitásának karakterizálásával tovább szélesítettük a C1 domének affinitását meghatározó strukturális tényezőkről szerzett eddigi ismereteket. Emellett, reményeink szerint, megtettük a kezdeti lépéseit azon farmakoterápiás fejlesztésnek, amely (eddig főként az immunrendszer és bizonyos tumorok esetében) figyelemreméltó jelátviteli molekulának az enzimatis funkcióját a C1 domént célzó, szelektív ligandok segítségével kívánja befolyásolni.

ÖSSZEFOGLALÁS

A másodlagos messenger molekula diacil-glicerol (DAG) és intracelluláris effektorai (a C1 domént tartalmazó szignál-proteinek) meghatározó szerepet játszanak olyan jelátviteli folyamatok szabályozásában, mint a sejtproliferáció, a differenciálódás, az apoptózis és a tumorigenezis. A Disszertáció első részében a protein kináz C (PKC) rendszer (az egyik legfontosabb DAG-effektor molekulacsalád) tagjainak izoforma-specifikus és antagonisztikus szerepét elemeztük a faggyúmirigy biológiai folyamatainak szabályozásában. A PKC rendszer forbol-észter (PMA) általi aktivációja fokozta a humán sebocyták lipidszintézisét, amely a sejtek terminális differenciálódásának indikátora. Farmakológiai módszerek (PKC inhibitorok felhasználása), valamint sejt- és molekuláris biológiai technikák segítségével megállapítottuk, hogy a sebocytákban expresszálandó öt PKC izoforma (cPKC α , nPKC δ , ϵ , η és aPKC ζ) közül a PMA hatásának közvetítésében a cPKC α és az nPKC δ izoformák vesznek részt. További fontos megfigyelésünk volt emellett, hogy az nPKC δ részt vesz az ismert gyulladáshoz vezető prekursor, az arachidonsav lipidszintézist fokozó és apoptózist indukáló celluláris hatásainak szignáltranszdukciós útvonalában is. Az aPKC ζ -ről emellett bebizonyosodott, hogy konstitutív enzimaktivitásával visszaszorítja a terminális differenciálódás (lipidfelhalmozás) és az apoptózis sejtfolymatait. A Disszertáció második részében a sokoldalú intracelluláris szignáltranszducer, a Vav1 molekula ligandkötési sajátosságait elemeztük. A DAG-felismerő intramolekuláris alegységként funkcionáló C1 domén a Vav1 molekulában is megtalálható és központi szerepet játszik a guanin nukleotid cserélő enzimaktivitás szabályozásában. A forbol-észter-kötés hiánya miatt ugyanakkor az atípusos C1 domének közé lett besorolva annak ellenére, hogy a domén ligandkötőhelyének geometriai felépítése gyakorlatilag teljesen homológ a PKC enzimek típusos C1 doménjével (amelyek nagy affinitással kötnek forbol-észtert). Rekombináns géntechnológia és irányított mutagenézis segítségével sikerült azonosítanunk öt aminosavat (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Thr²⁴ és Tyr²⁶) a kötőzseb peremén, amelyek kumulatív módon csökkentik a ligandaffinitást. Molekuláris modellezés felhasználásával megállapítottuk továbbá, hogy ezen inkompatibilis aminosavak lecsökkentik a kötőhely csúcsának hidrofóbicitását, miáltal a kötőhely membránasszociációja zavart szenved és gátlódik a ligand-C1-domén-membrán hármas komplexének kialakulása. A szerkezeti sajátosságok felhasználásával olyan DAG-analóg molekulák (DAG-laktonok) kifejlesztését kezdtük el, amelyek a Vav1 C1-specifikus aminosavak targetálásán keresztül szelektíven befolyásolhatják az enzimátikus funkciót.

SUMMARY

The lipophilic second messenger diacylglycerol (DAG) and its intracellular effectors (C1 domain containing proteins) play a substantial role in signaling events controlling cell proliferation, differentiation, apoptosis and tumor formation. In the first part of the Dissertation, we demonstrate the pivotal, isoform-specific, differential and antagonistic role of protein kinase C (PKC), one the most important family of DAG-effector molecules, in the regulation of sebaceous gland biology. We report that the phorbol-ester-(PMA)-driven activation of the PKC system stimulates the lipid synthesis (hallmark of terminal differentiation of sebocytes) of human sebocytes. Our pharmacological (using PKC inhibitors) as well as cell and molecular biological approaches revealed that, among the five isoforms (cPKC α , nPKC δ , ϵ , η and aPKC ζ) expressed by the sebocytes, the activation of cPKC α and nPKC δ participate in mediating the lipogenic effects of the PKC activator. Of further importance, using the above mentioned methods, nPKC δ was also found to play a major role in the cellular transduction of the lipogenic and apoptosis-inducing effects of arachidonic acid (a well-known inflammatory precursor). Finally, endogenous aPKC ζ activity was shown to constitutively suppress basal lipid synthesis and apoptosis. In the second part of our studies, we characterized the ligand binding properties of the C1 domain (highly conserved intramolecular recognition motif of DAG) of Vav1, a versatile signal transducer with guanine nucleotide exchange activity toward small GTPases. The C1 domain of Vav1, which plays a key role in the regulation of Vav activity, is classified as atypical (non-phorbol-responsive), despite the fact that it retains a binding pocket geometry homologous to that of the typical (phorbol-responsive) C1 domains of PKCs. Using recombinant gene technology and site-directed mutagenesis approaches, we have clarified the basis for its failure to bind ligands and have identified five crucial residues (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Thr²⁴ and Tyr²⁶) along the rim of the binding pocket, which weaken binding potency in a cumulative fashion. With the help of computer modeling, we predicted that these unique residues in Vav1 decrease the hydrophobicity of the rim of the binding cleft, impairing membrane association and thereby preventing formation of the ternary C1-ligand-membrane binding complex. Initial design of DAG-lactones to exploit these Vav1-unique residues showed enhanced selectivity for C1 domains incorporating these residues, suggesting a strategy for the development of ligands targeting Vav1 activity.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325
2. Carrasco, S., and Merida, I. (2007) Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem Sci* **32**, 27-36
3. Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**, 607-614
4. Nishizuka, Y. (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* **9**, 484-496
5. Wakelam, M. J. (1998) Diacylglycerol--when is it an intracellular messenger? *Biochim Biophys Acta* **1436**, 117-126
6. Newton, A. C. (1995) Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* **270**, 28495-28498
7. Kazanietz, M. G. (2002) Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol Pharmacol* **61**, 759-767
8. Blumberg, P. M., Kedei, N., Lewin, N. E., Yang, D., Czifra, G., Pu, Y., Peach, M. L., and Marquez, V. E. (2008) Wealth of opportunity - the C1 domain as a target for drug development. *Curr Drug Targets* **9**, 641-652
9. Hofmann, J. (2004) Protein kinase C isozymes as potential targets for anticancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **4**, 125-146
10. Marquez, V. E., and Blumberg, P. M. (2003) Synthetic diacylglycerols (DAG) and DAG-lactones as activators of protein kinase C (PK-C). *Acc Chem Res* **36**, 434-443
11. Mackay, H. J., and Twelves, C. J. (2007) Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer* **7**, 554-562
12. Hurley, J. H., Newton, A. C., Parker, P. J., Blumberg, P. M., and Nishizuka, Y. (1997) Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci* **6**, 477-480
13. Colon-Gonzalez, F., and Kazanietz, M. G. (2006) C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 827-837
14. Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1989) Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 4868-4871
15. Newton, A. C. (2009) Lipid activation of protein kinases. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S266-271
16. Newton, A. C. (2010) Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**, E395-402
17. Steinberg, S. F. (2008) Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* **88**, 1341-1378
18. Boije af Gennas, G., Talman, V., Yli-Kauhaluoma, J., Tuominen, R. K., and Ekokoski, E. (2011) Current status and future prospects of C1 domain ligands as drug candidates. *Curr Top Med Chem* **11**, 1370-1392
19. Hennings, H., and Boutwell, R. K. (1970) Studies on the mechanism of skin tumor promotion. *Cancer Res* **30**, 312-320
20. Griner, E. M., and Kazanietz, M. G. (2007) Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 281-294
21. Gould, C. M., and Newton, A. C. (2008) The life and death of protein kinase C. *Curr Drug Targets* **9**, 614-625
22. Reyland, M. E. (2009) Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci* **14**, 2386-2399
23. Newton, A. C. (2001) Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* **101**, 2353-2364
24. Pu, Y., Peach, M. L., Garfield, S. H., Wincovitch, S., Marquez, V. E., and Blumberg, P. M. (2006) Effects on ligand interaction and membrane translocation of the positively charged arginine residues situated along the C1 domain binding cleft in the atypical protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* **281**, 33773-33788
25. Goodnight, J., Mischak, H., and Mushinski, J. F. (1994) Selective involvement of protein kinase C isozymes in differentiation and neoplastic transformation. *Adv Cancer Res* **64**, 159-209
26. Gutcher, I., Webb, P. R., and Anderson, N. G. (2003) The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1061-1070
27. Nishizuka, Y. (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**, 661-665

28. Nishizuka, Y. (1989) The Albert Lasker Medical Awards. The family of protein kinase C for signal transduction. *JAMA* **262**, 1826-1833
29. Cardell, M., Landsend, A. S., Eidet, J., Wieloch, T., Blackstad, T. W., and Ottersen, O. P. (1998) High resolution immunogold analysis reveals distinct subcellular compartmentation of protein kinase C gamma and delta in rat Purkinje cells. *Neuroscience* **82**, 709-725
30. Shimohama, S., Uehara-Kunugi, Y., Terai, K., Taniguchi, T., Kimura, J., and Saitoh, T. (1991) Expression of protein kinase C isozymes in primary neuronal cultures of the rat cerebellum. *J Neurosci Res* **29**, 261-270
31. Boczan, J., Biro, T., Czifra, G., Lazar, J., Papp, H., Bardos, H., Adany, R., Mechler, F., and Kovacs, 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
32. Boczan, J., Boros, S., Mechler, F., Kovacs, L., and Biro, T. (2000) Differential expressions of protein kinase C isozymes during proliferation and differentiation of human skeletal muscle cells in vitro. *Acta Neuropathol* **99**, 96-104
33. Czerwinski, R., Aulabaugh, A., Greco, R. M., Olland, S., Malakian, K., Wolfrom, S., Lin, L., Kriz, R., Stahl, M., Huang, Y., Liu, L., and Chaudhary, D. (2005) Characterization of protein kinase C theta activation loop autophosphorylation and the kinase domain catalytic mechanism. *Biochemistry* **44**, 9563-9573
34. Osada, S., Mizuno, K., Saïdo, T. C., Suzuki, K., Kuroki, T., and Ohno, S. (1992) A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* **12**, 3930-3938
35. Berry, N., and Nishizuka, Y. (1990) Protein kinase C and T cell activation. *Eur J Biochem* **189**, 205-214
36. Helfrich, I., Schmitz, A., Zigrino, P., Michels, C., Haase, I., le Bivic, A., Leitges, M., and Niessen, C. M. (2007) Role of aPKC isoforms and their binding partners Par3 and Par6 in epidermal barrier formation. *J Invest Dermatol* **127**, 782-791
37. Murray, N. R., Baumgardner, G. P., Burns, D. J., and Fields, A. P. (1993) Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. Evidence that beta II protein kinase C is required for proliferation. *J Biol Chem* **268**, 15847-15853
38. Cacace, A. M., Guadagno, S. N., Krauss, R. S., Fabbro, D., and Weinstein, I. B. (1993) The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene* **8**, 2095-2104
39. Mischak, H., Goodnight, J. A., Kolch, W., Martiny-Baron, G., Schaehtle, C., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., Pierce, J. H., and Mushinski, J. F. (1993) Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem* **268**, 6090-6096
40. Barrett, J. C. (1993) Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect* **100**, 9-20
41. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **257**, 7847-7851
42. Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R., and Nishizuka, Y. (1983) Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **258**, 11442-11445
43. Leach, K. L., James, M. L., and Blumberg, P. M. (1983) Characterization of a specific phorbol ester aporeceptor in mouse brain cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4208-4212
44. Reddig, P. J., Dreckschmidt, N. E., Ahrens, H., Simsiman, R., Tseng, C. P., Zou, J., Oberley, T. D., and Verma, A. K. (1999) Transgenic mice overexpressing protein kinase Cdelta in the epidermis are resistant to skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* **59**, 5710-5718
45. Reddig, P. J., Dreckschmidt, N. E., Zou, J., Bourguignon, S. E., Oberley, T. D., and Verma, A. K. (2000) Transgenic mice overexpressing protein kinase C epsilon in their epidermis exhibit reduced papilloma burden but enhanced carcinoma formation after tumor promotion. *Cancer Res* **60**, 595-602
46. Jansen, A. P., Dreckschmidt, N. E., Verwiebe, E. G., Wheeler, D. L., Oberley, T. D., and Verma, A. K. (2001) Relation of the induction of epidermal ornithine decarboxylase and hyperplasia to the different skin tumor-promotion susceptibilities of protein kinase C alpha, -delta and -epsilon transgenic mice. *Int J Cancer* **93**, 635-643
47. Grossoni, V. C., Falbo, K. B., Kazanietz, M. G., de Kier Joffe, E. D., and Urtreger, A. J. (2007) Protein kinase C delta enhances proliferation and survival of murine mammary cells. *Mol Carcinog* **46**, 381-390

48. Jackson, D. N., and Foster, D. A. (2004) The enigmatic protein kinase Cdelta: complex roles in cell proliferation and survival. *FASEB J* **18**, 627-636
49. Czifra, G., Toth, I. B., Marincsak, R., Juhasz, I., Kovacs, I., Acs, P., Kovacs, L., Blumberg, P. M., and Biro, T. (2006) Insulin-like growth factor-I-coupled mitogenic signaling in primary cultured human skeletal muscle cells and in C2C12 myoblasts. A central role of protein kinase Cdelta. *Cell Signal* **18**, 1461-1472
50. Breitkreutz, D., Braiman-Wiksmann, L., Daum, N., Denning, M. F., and Tennenbaum, T. (2007) Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *J Cancer Res Clin Oncol* **133**, 793-808
51. Denning, M. F. (2004) Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1141-1146
52. Papp, H., Czifra, G., Lazar, J., Gonczi, M., Csernoch, L., Kovacs, L., and Biro, T. (2003) Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* **12**, 811-824
53. Fischer, S. M., Lee, M. L., Maldve, R. E., Morris, R. J., Trono, D., Burow, D. L., Butler, A. P., Pavone, A., and Warren, B. (1993) Association of protein kinase C activation with induction of ornithine decarboxylase in murine but not human keratinocyte cultures. *Mol Carcinog* **7**, 228-237
54. Fisher, G. J., Tavakkol, A., Leach, K., Burns, D., Basta, P., Loomis, C., Griffiths, C. E., Cooper, K. D., Reynolds, N. J., Elder, J. T., and et al. (1993) Differential expression of protein kinase C isoenzymes in normal and psoriatic adult human skin: reduced expression of protein kinase C-beta II in psoriasis. *J Invest Dermatol* **101**, 553-559
55. Fuchs, E. (1990) Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* **111**, 2807-2814
56. Mehrel, T., Hohl, D., Rothnagel, J. A., Longley, M. A., Bundman, D., Cheng, C., Lichti, U., Bisher, M. E., Steven, A. C., Steinert, P. M., and et al. (1990) Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell* **61**, 1103-1112
57. Eckert, R. L., Sturniolo, M. T., Broome, A. M., Ruse, M., and Rorke, E. A. (2005) Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol* **124**, 481-492
58. Fuchs, E., and Raghavan, S. (2002) Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet* **3**, 199-209
59. Lee, Y. S., Dlugosz, A. A., McKay, R., Dean, N. M., and Yuspa, S. H. (1997) Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C alpha in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes. *Mol Carcinog* **18**, 44-53
60. Lee, Y. S., Yuspa, S. H., and Dlugosz, A. A. (1998) Differentiation of cultured human epidermal keratinocytes at high cell densities is mediated by endogenous activation of the protein kinase C signaling pathway. *J Invest Dermatol* **111**, 762-766
61. Denning, M. F., Dlugosz, A. A., Williams, E. K., Szallasi, Z., Blumberg, P. M., and Yuspa, S. H. (1995) Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell Growth Differ* **6**, 149-157
62. Dlugosz, A. A., Mischak, H., Mushinski, J. F., and Yuspa, S. H. (1992) Transcripts encoding protein kinase C-alpha, -delta, -epsilon, -zeta, and -eta are expressed in basal and differentiating mouse keratinocytes in vitro and exhibit quantitative changes in neoplastic cells. *Mol Carcinog* **5**, 286-292
63. Papp, H., Czifra, G., Bodo, E., Lazar, J., Kovacs, I., Aleksza, M., Juhasz, I., Acs, P., Sipka, S., Kovacs, L., Blumberg, P. M., and Biro, T. (2004) Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1095-1105
64. Cataisson, C., Joseloff, E., Murillas, R., Wang, A., Atwell, C., Torgerson, S., Gerdes, M., Subleski, J., Gao, J. L., Murphy, P. M., Wiltout, R. H., Vinson, C., and Yuspa, S. H. (2003) Activation of cutaneous protein kinase C alpha induces keratinocyte apoptosis and intraepidermal inflammation by independent signaling pathways. *J Immunol* **171**, 2703-2713
65. Li, L., Lorenzo, P. S., Bogi, K., Blumberg, P. M., and Yuspa, S. H. (1999) Protein kinase Cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol Cell Biol* **19**, 8547-8558
66. Jansen, A. P., Verwiebe, E. G., Dreckschmidt, N. E., Wheeler, D. L., Oberley, T. D., and Verma, A. K. (2001) Protein kinase C-epsilon transgenic mice: a unique model for metastatic squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **61**, 808-812
67. Humphries, M. J., Limesand, K. H., Schneider, J. C., Nakayama, K. I., Anderson, S. M., and Reyland, M. E. (2006) Suppression of apoptosis in the protein kinase Cdelta null mouse in vivo. *J Biol Chem* **281**, 9728-9737

68. Denning, M. F., Wang, Y., Tibudan, S., Alkan, S., Nickoloff, B. J., and Qin, J. Z. (2002) Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C. *Cell Death Differ* **9**, 40-52
69. D'Costa, A. M., Robinson, J. K., Maududi, T., Chaturvedi, V., Nickoloff, B. J., and Denning, M. F. (2006) The proapoptotic tumor suppressor protein kinase C-delta is lost in human squamous cell carcinomas. *Oncogene* **25**, 378-386
70. Chida, K., Hara, T., Hirai, T., Konishi, C., Nakamura, K., Nakao, K., Aiba, A., Katsuki, M., and Kuroki, T. (2003) Disruption of protein kinase Ceta results in impairment of wound healing and enhancement of tumor formation in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* **63**, 2404-2408
71. Wang, H. Q., and Smart, R. C. (1999) Overexpression of protein kinase C-alpha in the epidermis of transgenic mice results in striking alterations in phorbol ester-induced inflammation and COX-2, MIP-2 and TNF-alpha expression but not tumor promotion. *J Cell Sci* **112** (Pt 20), 3497-3506
72. Neill, G. W., Ghali, L. R., Green, J. L., Ikram, M. S., Philpott, M. P., and Quinn, A. G. (2003) Loss of protein kinase Calpha expression may enhance the tumorigenic potential of Gli1 in basal cell carcinoma. *Cancer Res* **63**, 4692-4697
73. Tibudan, S. S., Wang, Y., and Denning, M. F. (2002) Activation of protein kinase C triggers irreversible cell cycle withdrawal in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **119**, 1282-1289
74. Szegedi, A., Payer, E., Czifra, G., Toth, B. I., Schmidt, E., Kovacs, L., Blumberg, P. M., and Biro, T. (2009) Protein kinase C isoenzymes differentially regulate the differentiation-dependent expression of adhesion molecules in human epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol* **18**, 122-129
75. Li, L. F., Guo, J., and Gao, Z. F. (2003) Overexpression of skin protein kinase C-alpha in anagen hair follicles during induced growth of mouse hair. *Clin Exp Dermatol* **28**, 429-433
76. Li, L. F., Fiedler, V. C., and Kumar, R. (1999) The potential role of skin protein kinase C isoforms alpha and delta in mouse hair growth induced by diphenylprone-allergic contact dermatitis. *J Dermatol* **26**, 98-105
77. Harmon, C. S., Nevins, T. D., and Bollag, W. B. (1995) Protein kinase C inhibits human hair follicle growth and hair fibre production in organ culture. *Br J Dermatol* **133**, 686-693
78. Eicheler, W., Huth, A., Happle, R., and Hoffmann, R. (1997) Phorbol-myristate-acetate, but not interleukin-1 beta or insulin-like growth factor-I, regulates protein kinase C isoenzymes in human dermal papilla cells. *Acta Derm Venereol* **77**, 361-364
79. Koizumi, H., Kohno, Y., Osada, S., Ohno, S., Ohkawara, A., and Kuroki, T. (1993) Differentiation-associated localization of nPKC eta, a Ca(++)-independent protein kinase C, in normal human skin and skin diseases. *J Invest Dermatol* **101**, 858-863
80. Ferraris, C., Cooklis, M., Polakowska, R. R., and Haake, A. R. (1997) Induction of apoptosis through the PKC pathway in cultured dermal papilla fibroblasts. *Exp Cell Res* **234**, 37-46
81. Thody, A. J., and Shuster, S. (1989) Control and function of sebaceous glands. *Physiol Rev* **69**, 383-416
82. Smith, K. R., and Thiboutot, D. M. (2008) Thematic review series: skin lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe? *J Lipid Res* **49**, 271-281
83. Picardo, M., Ottaviani, M., Camera, E., and Mastrofrancesco, A. (2009) Sebaceous gland lipids. *Dermatoendocrinol* **1**, 68-71
84. Pappas, A. (2009) Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol* **1**, 72-76
85. Pochi, P. E., and Strauss, J. S. (1977) Studies on the sebaceous glands in acne and endocrine disorders. *Bull N Y Acad Med* **53**, 359-367
86. Zouboulis, C. C. (2009) The skin as an endocrine organ. *Dermatoendocrinol* **1**, 250-252
87. Zouboulis, C. C., and Bohm, M. (2004) Neuroendocrine regulation of sebocytes -- a pathogenetic link between stress and acne. *Exp Dermatol* **13 Suppl 4**, 31-35
88. Zouboulis, C. C., Baron, J. M., Bohm, M., Kippenberger, S., Kurzen, H., Reichrath, J., and Thielitz, A. (2008) Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Exp Dermatol* **17**, 542-551
89. Toth, B. I., Olah, A., Szollosi, A. G., Czifra, G., and Biro, T. (2011) "Sebocytes' makeup": novel mechanisms and concepts in the physiology of the human sebaceous glands. *Pflugers Arch* **461**, 593-606
90. Schneider, M. R., and Paus, R. (2010) Sebocytes, multifaceted epithelial cells: lipid production and holocrine secretion. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 181-185
91. Thody, A. J., and Shuster, S. (1989) Control and function of sebaceous glands. *Physiol Rev* **69**, 383-416
92. Chen, W., Thiboutot, D., and Zouboulis, C. C. (2002) Cutaneous androgen metabolism: basic research and clinical perspectives. *J Invest Dermatol* **119**, 992-1007
93. Thiboutot, D., Jabara, S., McAllister, J. M., Sivarajah, A., Gilliland, K., Cong, Z., and Clawson, G. (2003) Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in

- epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1). *J Invest Dermatol* **120**, 905-914
94. Fritsch, M., Orfanos, C. E., and Zouboulis, C. C. (2001) Sebocytes are the key regulators of androgen homeostasis in human skin. *J Invest Dermatol* **116**, 793-800
 95. Seiffert, K., Seltmann, H., Fritsch, M., and Zouboulis, C. C. (2007) Inhibition of 5alpha-reductase activity in SZ95 sebocytes and HaCaT keratinocytes in vitro. *Horm Metab Res* **39**, 141-148
 96. Rosenfield, R. L., Deplewski, D., Kentsis, A., and Ciletti, N. (1998) Mechanisms of androgen induction of sebocyte differentiation. *Dermatology* **196**, 43-46
 97. Makrantonaki, E., and Zouboulis, C. C. (2007) Testosterone metabolism to 5alpha-dihydrotestosterone and synthesis of sebaceous lipids is regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor ligand linoleic acid in human sebocytes. *Br J Dermatol* **156**, 428-432
 98. Rosenfield, R. L., Kentsis, A., Deplewski, D., and Ciletti, N. (1999) Rat preputial sebocyte differentiation involves peroxisome proliferator-activated receptors. *J Invest Dermatol* **112**, 226-232
 99. Chen, W., Yang, C. C., Sheu, H. M., Seltmann, H., and Zouboulis, C. C. (2003) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor and CCAAT/enhancer binding protein transcription factors in cultured human sebocytes. *J Invest Dermatol* **121**, 441-447
 100. Trivedi, N. R., Cong, Z., Nelson, A. M., Albert, A. J., Rosamilia, L. L., Sivarajah, S., Gilliland, K. L., Liu, W., Mauger, D. T., Gabbay, R. A., and Thiboutot, D. M. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors increase human sebum production. *J Invest Dermatol* **126**, 2002-2009
 101. Deplewski, D., and Rosenfield, R. L. (1999) Growth hormone and insulin-like growth factors have different effects on sebaceous cell growth and differentiation. *Endocrinology* **140**, 4089-4094
 102. Thiboutot, D., Sivarajah, A., Gilliland, K., Cong, Z., and Clawson, G. (2000) The melanocortin 5 receptor is expressed in human sebaceous glands and rat preputial cells. *J Invest Dermatol* **115**, 614-619
 103. Bohm, M., Schiller, M., Stander, S., Seltmann, H., Li, Z., Brzoska, T., Metze, D., Schioth, H. B., Skottner, A., Seiffert, K., Zouboulis, C. C., and Luger, T. A. (2002) Evidence for expression of melanocortin-1 receptor in human sebocytes in vitro and in situ. *J Invest Dermatol* **118**, 533-539
 104. Zouboulis, C. C., Seltmann, H., Hiroi, N., Chen, W., Young, M., Oeff, M., Scherbaum, W. A., Orfanos, C. E., McCann, S. M., and Bornstein, S. R. (2002) Corticotropin-releasing hormone: an autocrine hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7148-7153
 105. Zouboulis, C. C. (2009) Sebaceous gland receptors. *Dermatoendocrinol* **1**, 77-80
 106. Zouboulis, C. C. (2004) Acne and sebaceous gland function. *Clin Dermatol* **22**, 360-366
 107. Zouboulis, C. C., Eady, A., Philpott, M., Goldsmith, L. A., Orfanos, C., Cunliffe, W. C., and Rosenfield, R. (2005) What is the pathogenesis of acne? *Exp Dermatol* **14**, 143-152
 108. Webster, G. F. (2009) Rosacea. *Med Clin North Am* **93**, 1183-1194
 109. Wollina, U. (2011) Rosacea and rhinophyma in the elderly. *Clin Dermatol* **29**, 61-68
 110. Reinstadler, D. R., and Sinha, U. K. (2012) Uncommon cutaneous neoplasms of the head and neck. *Facial Plast Surg Clin North Am* **20**, 483-491
 111. Sakuma, T. H., and Maibach, H. I. (2012) Oily skin: an overview. *Skin Pharmacol Physiol* **25**, 227-235
 112. Kurokawa, I., Danby, F. W., Ju, Q., Wang, X., Xiang, L. F., Xia, L., Chen, W., Nagy, I., Picardo, M., Suh, D. H., Ganceviciene, R., Schagen, S., Tsatsou, F., and Zouboulis, C. C. (2009) New developments in our understanding of acne pathogenesis and treatment. *Exp Dermatol* **18**, 821-832
 113. Farrar, M. D., and Ingham, E. (2004) Acne: inflammation. *Clin Dermatol* **22**, 380-384
 114. Nagy, I., Pivarcsi, A., Kis, K., Koreck, A., Bodai, L., McDowell, A., Seltmann, H., Patrick, S., Zouboulis, C. C., and Kemeny, L. (2006) Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect* **8**, 2195-2205
 115. Alestas, T., Ganceviciene, R., Fimmel, S., Muller-Decker, K., and Zouboulis, C. C. (2006) Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B4 and prostaglandin E2 are active in sebaceous glands. *J Mol Med (Berl)* **84**, 75-87
 116. Lee, W. J., Jung, H. D., Lee, H. J., Kim, B. S., Lee, S. J., and Kim do, W. (2008) Influence of substance-P on cultured sebocytes. *Arch Dermatol Res* **300**, 311-316
 117. Zhang, Q., Seltmann, H., Zouboulis, C. C., and Konger, R. L. (2006) Involvement of PPARgamma in oxidative stress-mediated prostaglandin E(2) production in SZ95 human sebaceous gland cells. *J Invest Dermatol* **126**, 42-48
 118. Wrobel, A., Seltmann, H., Fimmel, S., Muller-Decker, K., Tsukada, M., Bogdanoff, B., Mandt, N., Blume-Peytavi, U., Orfanos, C. E., and Zouboulis, C. C. (2003) Differentiation and apoptosis in human immortalized sebocytes. *J Invest Dermatol* **120**, 175-181

119. Potter, J. E., Prutkin, L., and Wheatley, V. R. (1979) Sebaceous gland differentiation. I. Separation, morphology and lipogenesis of isolated cells from the mouse preputial gland tumor. *J Invest Dermatol* **72**, 120-127
120. Wheatley, V. R., Potter, J. E., and Lew, G. (1979) Sebaceous gland differentiation: II. The isolation, separation and characterization of cells from the mouse preputial gland. *J Invest Dermatol* **73**, 291-296
121. Plewig, G., and Luderschmidt, C. (1977) Hamster ear model for sebaceous glands. *J Invest Dermatol* **68**, 171-176
122. Zouboulis, C. C., Xia, L., Akamatsu, H., Seltmann, H., Fritsch, M., Hornemann, S., Ruhl, R., Chen, W., Nau, H., and Orfanos, C. E. (1998) The human sebocyte culture model provides new insights into development and management of seborrhoea and acne. *Dermatology* **196**, 21-31
123. Zouboulis, C. C., Schagen, S., and Alestas, T. (2008) The sebocyte culture: a model to study the pathophysiology of the sebaceous gland in seborrhoea, seborrhoea and acne. *Arch Dermatol Res* **300**, 397-413
124. Rosenfield, R. L. (1989) Relationship of sebaceous cell stage to growth in culture. *J Invest Dermatol* **92**, 751-754
125. Fujie, T., Shikiji, T., Uchida, N., Urano, Y., Nagae, H., and Arase, S. (1996) Culture of cells derived from the human sebaceous gland under serum-free conditions without a biological feeder layer or specific matrices. *Arch Dermatol Res* **288**, 703-708
126. Zouboulis, C. C., Seltmann, H., Neitzel, H., and Orfanos, C. E. (1999) Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol* **113**, 1011-1020
127. Lo Celso, C., Berta, M. A., Braun, K. M., Frye, M., Lyle, S., Zouboulis, C. C., and Watt, F. M. (2008) Characterization of bipotential epidermal progenitors derived from human sebaceous gland: contrasting roles of c-Myc and beta-catenin. *Stem Cells* **26**, 1241-1252
128. Sharkey, N. A., Leach, K. L., and Blumberg, P. M. (1984) Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 607-610
129. Mott, H. R., Carpenter, J. W., Zhong, S., Ghosh, S., Bell, R. M., and Campbell, S. L. (1996) The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8312-8317
130. Zhou, M., Horita, D. A., Waugh, D. S., Byrd, R. A., and Morrison, D. K. (2002) Solution structure and functional analysis of the cysteine-rich C1 domain of kinase suppressor of Ras (KSR). *J Mol Biol* **315**, 435-446
131. Zhang, G., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., and Hurley, J. H. (1995) Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell* **81**, 917-924
132. Williams, S. A., Chen, L. F., Kwon, H., Fenard, D., Bisgrove, D., Verdin, E., and Greene, W. C. (2004) Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB. *J Biol Chem* **279**, 42008-42017
133. Bustelo, X. R. (2000) Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* **20**, 1461-1477
134. Hornstein, I., Alcover, A., and Katzav, S. (2004) Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal* **16**, 1-11
135. Tybulewicz, V. L. (2005) Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* **17**, 267-274
136. Movilla, N., Dosil, M., Zheng, Y., and Bustelo, X. R. (2001) How Vav proteins discriminate the GTPases Rac1 and RhoA from Cdc42. *Oncogene* **20**, 8057-8065
137. Rapley, J., Tybulewicz, V. L., and Rittinger, K. (2008) Crucial structural role for the PH and C1 domains of the Vav1 exchange factor. *EMBO Rep* **9**, 655-661
138. Bustelo, X. R. (2001) Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* **20**, 6372-6381
139. Schuebel, K. E., Movilla, N., Rosa, J. L., and Bustelo, X. R. (1998) Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *EMBO J* **17**, 6608-6621
140. Movilla, N., and Bustelo, X. R. (1999) Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins. *Mol Cell Biol* **19**, 7870-7885
141. Henske, E. P., Short, M. P., Jozwiak, S., Bovey, C. M., Ramlakhan, S., Haines, J. L., and Kwiatkowski, D. J. (1995) Identification of VAV2 on 9q34 and its exclusion as the tuberous sclerosis gene TSC1. *Ann Hum Genet* **59**, 25-37
142. Katzav, S., Martin-Zanca, D., and Barbacid, M. (1989) vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J* **8**, 2283-2290
143. Dustin, M. L., and Shaw, A. S. (1999) Costimulation: building an immunological synapse. *Science* **283**, 649-650
144. Turner, M., and Billadeau, D. D. (2002) VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* **2**, 476-486

145. Fischer, K. D., Zmudzinas, A., Gardner, S., Barbacid, M., Bernstein, A., and Guidos, C. (1995) Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4⁺ CD8⁺ thymocytes. *Nature* **374**, 474-477
146. Katzav, S. (2009) Vav1: a hematopoietic signal transduction molecule involved in human malignancies. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1245-1248
147. Bartolome, R. A., Molina-Ortiz, I., Samaniego, R., Sanchez-Mateos, P., Bustelo, X. R., and Teixido, J. (2006) Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer Res* **66**, 248-258
148. Fernandez-Zapico, M. E., Gonzalez-Paz, N. C., Weiss, E., Savoy, D. N., Molina, J. R., Fonseca, R., Smyrk, T. C., Chari, S. T., Urrutia, R., and Billadeau, D. D. (2005) Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer Cell* **7**, 39-49
149. Katzav, S. (2007) Flesh and blood: the story of Vav1, a gene that signals in hematopoietic cells but can be transforming in human malignancies. *Cancer Lett* **255**, 241-254
150. Prieto-Sanchez, R. M., Hernandez, J. A., Garcia, J. L., Gutierrez, N. C., San Miguel, J., Bustelo, X. R., and Hernandez, J. M. (2006) Overexpression of the VAV proto-oncogene product is associated with B-cell chronic lymphocytic leukaemia displaying loss on 13q. *Br J Haematol* **133**, 642-645
151. Crespo, P., Schuebel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S., and Bustelo, X. R. (1997) Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* **385**, 169-172
152. Lopez-Lago, M., Lee, H., Cruz, C., Movilla, N., and Bustelo, X. R. (2000) Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav. *Mol Cell Biol* **20**, 1678-1691
153. Aghazadeh, B., Lowry, W. E., Huang, X. Y., and Rosen, M. K. (2000) Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* **102**, 625-633
154. Das, B., Shu, X., Day, G. J., Han, J., Krishna, U. M., Falck, J. R., and Broek, D. (2000) Control of intramolecular interactions between the pleckstrin homology and Dbl homology domains of Vav and Sos1 regulates Rac binding. *J Biol Chem* **275**, 15074-15081
155. Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R. D., Krishna, U. M., Falck, J. R., White, M. A., and Broek, D. (1998) Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* **279**, 558-560
156. Rossman, K. L., Der, C. J., and Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 167-180
157. Katzav, S., Cleveland, J. L., Heslop, H. E., and Pulido, D. (1991) Loss of the amino-terminal helix-loop-helix domain of the vav proto-oncogene activates its transforming potential. *Mol Cell Biol* **11**, 1912-1920
158. Zugaza, J. L., Lopez-Lago, M. A., Caloca, M. J., Dosil, M., Movilla, N., and Bustelo, X. R. (2002) Structural determinants for the biological activity of Vav proteins. *J Biol Chem* **277**, 45377-45392
159. Booden, M. A., Campbell, S. L., and Der, C. J. (2002) Critical but distinct roles for the pleckstrin homology and cysteine-rich domains as positive modulators of Vav2 signaling and transformation. *Mol Cell Biol* **22**, 2487-2497
160. Heo, J., Thapar, R., and Campbell, S. L. (2005) Recognition and activation of Rho GTPases by Vav1 and Vav2 guanine nucleotide exchange factors. *Biochemistry* **44**, 6573-6585
161. Chrencik, J. E., Brooun, A., Zhang, H., Mathews, II, Hura, G. L., Foster, S. A., Perry, J. J., Streiff, M., Ramage, P., Widmer, H., Bokoch, G. M., Tainer, J. A., Weckbecker, G., and Kuhn, P. (2008) Structural basis of guanine nucleotide exchange mediated by the T-cell essential Vav1. *J Mol Biol* **380**, 828-843
162. Kazanietz, M. G., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Kolch, W., Mischak, H., Wong, G., Pettit, G. R., Bruns, J. D., and Blumberg, P. M. (1994) Zinc finger domains and phorbol ester pharmacophore. Analysis of binding to mutated form of protein kinase C zeta and the vav and c-raf proto-oncogene products. *J Biol Chem* **269**, 11590-11594
163. Pu, Y., Perry, N. A., Yang, D., Lewin, N. E., Kedei, N., Braun, D. C., Choi, S. H., Blumberg, P. M., Garfield, S. H., Stone, J. C., Duan, D., and Marquez, V. E. (2005) A novel diacylglycerol-lactone shows marked selectivity in vitro among C1 domains of protein kinase C (PKC) isoforms alpha and delta as well as selectivity for RasGRP compared with PKCalpha. *J Biol Chem* **280**, 27329-27338
164. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
165. Alestas, T., Ganceviciene, R., Fimmel, S., Muller-Decker, K., and Zouboulis, C. C. (2006) Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B4 and prostaglandin E2 are active in sebaceous glands. *J Mol Med (Berl)* **84**, 75-87

166. Zouboulis, C. C., Seltmann, H., Neitzel, H., and Orfanos, C. E. (1999) Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol* **113**, 1011-1020
167. Green, D. R., and Reed, J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312
168. Susin, S. A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (1998) Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 151-165
169. Shuman, S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **269**, 32678-32684
170. Esposito, D., Garvey, L. A., and Chakiath, C. S. (2009) Gateway cloning for protein expression. *Methods Mol Biol* **498**, 31-54
171. Marquez, V. E., Nacro, K., Benzaria, S., Lee, J., Sharma, R., Teng, K., Milne, G. W., Bienfait, B., Wang, S., Lewin, N. E., and Blumberg, P. M. (1999) The transition from a pharmacophore-guided approach to a receptor-guided approach in the design of potent protein kinase C ligands. *Pharmacol Ther* **82**, 251-261
172. Raifman, O., Kolusheva, S., El Kazzouli, S., Sigano, D. M., Kedei, N., Lewin, N. E., Lopez-Nicolas, R., Ortiz-Espin, A., Gomez-Fernandez, J. C., Blumberg, P. M., Marquez, V. E., Corbalan-Garcia, S., and Jelinek, R. Membrane-surface anchoring of charged diacylglycerol-lactones correlates with biological activities. *Chembiochem* **11**, 2003-2009
173. Geczy, T., Peach, M. L., El Kazzouli, S., Sigano, D. M., Kang, J. H., Valle, C. J., Selezneva, J., Woo, W., Kedei, N., Lewin, N. E., Garfield, S. H., Lim, L., Mannan, P., Marquez, V. E., and Blumberg, P. M. Molecular basis for failure of "atypical" C1 domain of Vav1 to bind diacylglycerol/phorbol ester. *J Biol Chem* **287**, 13137-13158
174. Lewin, N. E., and Blumberg, P. M. (2003) [³H]Phorbol 12,13-dibutyrate binding assay for protein kinase C and related proteins. *Methods Mol Biol* **233**, 129-156
175. Doran, T. I., Baff, R., Jacobs, P., and Pacia, E. (1991) Characterization of human sebaceous cells in vitro. *J Invest Dermatol* **96**, 341-348
176. Gschwendt, M., Muller, H. J., Kielbassa, K., Zang, R., Kittstein, W., Rincke, G., and Marks, F. (1994) Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **199**, 93-98
177. Alessi, D. R. (1997) The protein kinase C inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1beta (Rsk-2) and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* **402**, 121-123
178. Way, K. J., Chou, E., and King, G. L. (2000) Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 181-187
179. Toth, B. I., Benko, S., Szollosi, A. G., Kovacs, L., Rajnavolgyi, E., and Biro, T. (2009) Transient receptor potential vanilloid-1 signaling inhibits differentiation and activation of human dendritic cells. *FEBS Lett* **583**, 1619-1624
180. Canagarajah, B., Leskow, F. C., Ho, J. Y., Mischak, H., Saidi, L. F., Kazanietz, M. G., and Hurley, J. H. (2004) Structural mechanism for lipid activation of the Rac-specific GAP, beta2-chimaerin. *Cell* **119**, 407-418
181. Leonard, T. A., Rozycki, B., Saidi, L. F., Hummer, G., and Hurley, J. H. (2011) Crystal structure and allosteric activation of protein kinase C betaII. *Cell* **144**, 55-66
182. Cho, W., and Stahelin, R. V. (2005) Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**, 119-151
183. Ahmed, S., Kozma, R., Lee, J., Monfries, C., Harden, N., and Lim, L. (1991) The cysteine-rich domain of human proteins, neuronal chimaerin, protein kinase C and diacylglycerol kinase binds zinc. Evidence for the involvement of a zinc-dependent structure in phorbol ester binding. *Biochem J* **280** (Pt 1), 233-241
184. Kazanietz, M. G., Wang, S., Milne, G. W., Lewin, N. E., Liu, H. L., and Blumberg, P. M. (1995) Residues in the second cysteine-rich region of protein kinase C delta relevant to phorbol ester binding as revealed by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **270**, 21852-21859
185. Wang, Q. J., Fang, T. W., Nacro, K., Marquez, V. E., Wang, S., and Blumberg, P. M. (2001) Role of hydrophobic residues in the C1b domain of protein kinase C delta on ligand and phospholipid interactions. *J Biol Chem* **276**, 19580-19587
186. Dries, D. R., Gallegos, L. L., and Newton, A. C. (2007) A single residue in the C1 domain sensitizes novel protein kinase C isoforms to cellular diacylglycerol production. *J Biol Chem* **282**, 826-830
187. Steinkellner, G., Rader, R., Thallinger, G. G., Kratky, C., and Gruber, K. (2009) VASCo: computation and visualization of annotated protein surface contacts. *BMC Bioinformatics* **10**, 32
188. Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., and Wendoloski, J. J. (1998) Prediction of hydrophobic (lipophilic) properties of small organic molecules using fragmental methods: An analysis of ALOGP and CLOGP methods. *Journal of Physical Chemistry A* **102**, 3762-3772

189. Delano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. 0.99 Ed., DeLano Scientific, Palo Alto, CA
190. Furet, P., Sele, A., and Cohen, N. C. (1988) 3D molecular lipophilicity potential profiles: a new tool in molecular modeling. *Journal of Molecular Graphics* **6**, 182-189
191. Neubert, R. (1989) Ion pair transport across membranes. *Pharm Res* **6**, 743-747
192. Miller, J. M., Dahan, A., Gupta, D., Varghese, S., and Amidon, G. L. (2010) Enabling the intestinal absorption of highly polar antiviral agents: ion-pair facilitated membrane permeation of zanamivir heptyl ester and guanidino oseltamivir. *Mol Pharm* **7**, 1223-1234
193. Raifman, O., Kolusheva, S., El Kazzouli, S., Sigano, D. M., Kedei, N., Lewin, N. E., Lopez-Nicolas, R., Ortiz-Espin, A., Gomez-Fernandez, J. C., Blumberg, P. M., Marquez, V. E., Corbalan-Garcia, S., and Jelinek, R. (2010) Membrane-surface anchoring of charged diacylglycerol-lactones correlates with biological activities. *Chembiochem* **11**, 2003-2009
194. Duan, D., Sigano, D. M., Kelley, J. A., Lai, C. C., Lewin, N. E., Kedei, N., Peach, M. L., Lee, J., Abeyweera, T. P., Rotenberg, S. A., Kim, H., Kim, Y. H., El Kazzouli, S., Chung, J. U., Young, H. A., Young, M. R., Baker, A., Colburn, N. H., Haimovitz-Friedman, A., Truman, J. P., Parrish, D. A., Deschamps, J. R., Perry, N. A., Surawski, R. J., Blumberg, P. M., and Marquez, V. E. (2008) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol. 29. Cells sort diacylglycerol-lactone chemical zip codes to produce diverse and selective biological activities. *J Med Chem* **51**, 5198-5220
195. Dobrosi, N., Toth, B. I., Nagy, G., Dozsa, A., Geczy, T., Nagy, L., Zouboulis, C. C., Paus, R., Kovacs, L., and Biro, T. (2008) Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J* **22**, 3685-3695
196. Zhang, L., Anthonavage, M., Huang, Q., Li, W. H., and Eisinger, M. (2003) Proopiomelanocortin peptides and sebogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **994**, 154-161
197. Smith, T. M., Cong, Z., Gilliland, K. L., Clawson, G. A., and Thiboutot, D. M. (2006) Insulin-like growth factor-1 induces lipid production in human SEB-1 sebocytes via sterol response element-binding protein-1. *J Invest Dermatol* **126**, 1226-1232
198. Smith, T. M., Gilliland, K., Clawson, G. A., and Thiboutot, D. (2008) IGF-1 induces SREBP-1 expression and lipogenesis in SEB-1 sebocytes via activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Invest Dermatol* **128**, 1286-1293
199. Grose, R., Fantl, V., Werner, S., Chioni, A. M., Jarosz, M., Rudling, R., Cross, B., Hart, I. R., and Dickson, C. (2007) The role of fibroblast growth factor receptor 2b in skin homeostasis and cancer development. *EMBO J* **26**, 1268-1278
200. Melnik, B. C., Schmitz, G., and Zouboulis, C. C. (2009) Anti-acne agents attenuate FGFR2 signal transduction in acne. *J Invest Dermatol* **129**, 1868-1877
201. Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S., and Gokoh, M. (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* **45**, 405-446
202. Starowicz, K., Nigam, S., and Di Marzo, V. (2007) Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* **114**, 13-33
203. Kuehl, F. A., Jr., and Egan, R. W. (1980) Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science* **210**, 978-984
204. Calder, P. C. (2009) Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* **91**, 791-795
205. De Caterina, R., and Basta, G. (2001) n-3 fatty acids and the inflammatory response - biological background. *Eur Heart J Suppl* **3**, D42-D49
206. Funk, C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871-1875
207. Soberman, R. J., and Christmas, P. (2003) The organization and consequences of eicosanoid signaling. *J Clin Invest* **111**, 1107-1113
208. Yoshida, K., Asaoka, Y., and Nishizuka, Y. (1992) Platelet activation by simultaneous actions of diacylglycerol and unsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6443-6446
209. Shinomura, T., Asaoka, Y., Oka, M., Yoshida, K., and Nishizuka, Y. (1991) Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 5149-5153
210. Lo, H. H., Bartek, G. A., and Fischer, S. M. (1994) In vitro activation of mouse skin protein kinase C by fatty acids and their hydroxylated metabolites. *Lipids* **29**, 547-553
211. Kashiwagi, K., Shirai, Y., Kuriyama, M., Sakai, N., and Saito, N. (2002) Importance of C1B domain for lipid messenger-induced targeting of protein kinase C. *J Biol Chem* **277**, 18037-18045
212. Gauldie, J., Richards, C., and Baumann, H. (1992) IL6 and the acute phase reaction. *Res Immunol* **143**, 755-759

213. Tsutsui, H., Mizutani, H., and Nakanishi, K. (2011) Contribution of interleukin 18 to the development of infection-associated atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* **41**, 93-103
214. Prado-Montes de Oca, E. (2010) Human beta-defensin 1: a restless warrior against allergies, infections and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 800-804
215. Deban, L., Jaillon, S., Garlanda, C., Bottazzi, B., and Mantovani, A. (2011) Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. *Cell Tissue Res* **343**, 237-249
216. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-1934
217. Ogbourne, S. M., Hampson, P., Lord, J. M., Parsons, P., De Witte, P. A., and Suhrbier, A. (2007) Proceedings of the First International Conference on PEP005. *Anticancer Drugs* **18**, 357-362
218. Kortmansky, J., and Schwartz, G. K. (2003) Bryostatin-1: a novel PKC inhibitor in clinical development. *Cancer Invest* **21**, 924-936
219. Kulkosky, J., Culnan, D. M., Roman, J., Dornadula, G., Schnell, M., Boyd, M. R., and Pomerantz, R. J. (2001) Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood* **98**, 3006-3015
220. Hezareh, M. (2005) Prostratin as a new therapeutic agent targeting HIV viral reservoirs. *Drug News Perspect* **18**, 496-500
221. Schaar, D., Goodell, L., Aisner, J., Cui, X. X., Han, Z. T., Chang, R., Martin, J., Grospe, S., Dudek, L., Riley, J., Manago, J., Lin, Y., Rubin, E. H., Conney, A., and Strair, R. K. (2006) A phase I clinical trial of 12- O-tetradecanoylphorbol-13-acetate for patients with relapsed/refractory malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* **57**, 789-795
222. Ito, Y., Mishra, N. C., Yoshida, K., Kharbanda, S., Saxena, S., and Kufe, D. (2001) Mitochondrial targeting of JNK/SAPK in the phorbol ester response of myeloid leukemia cells. *Cell Death Differ* **8**, 794-800
223. Jacquel, A., Herrant, M., Defamie, V., Belhacene, N., Colosetti, P., Marchetti, S., Legros, L., Deckert, M., Mari, B., Cassuto, J. P., Hofman, P., and Auberger, P. (2006) A survey of the signaling pathways involved in megakaryocytic differentiation of the human K562 leukemia cell line by molecular and c-DNA array analysis. *Oncogene* **25**, 781-794
224. Nacro, K., Bienfait, B., Lee, J., Han, K. C., Kang, J. H., Benzaria, S., Lewin, N. E., Bhattacharyya, D. K., Blumberg, P. M., and Marquez, V. E. (2000) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol (DAG). 16. How much structural complexity is necessary for recognition and high binding affinity to protein kinase C? *J Med Chem* **43**, 921-944
225. Kang, J. H., Siddiqui, M. A., Sigano, D. M., Krajewski, K., Lewin, N. E., Pu, Y., Blumberg, P. M., Lee, J., and Marquez, V. E. (2004) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol. 24. Asymmetric synthesis of a chiral (R)-DAG-lactone template as a versatile precursor for highly functionalized DAG-lactones. *Org Lett* **6**, 2413-2416
226. Choi, S. H., Czifra, G., Kedei, N., Lewin, N. E., Lazar, J., Pu, Y., Marquez, V. E., and Blumberg, P. M. (2008) Characterization of the interaction of phorbol esters with the C1 domain of MRCK (myotonic dystrophy kinase-related Cdc42 binding kinase) alpha/beta. *J Biol Chem* **283**, 10543-10549
227. Melowic, H. R., Stahelin, R. V., Blatner, N. R., Tian, W., Hayashi, K., Altman, A., and Cho, W. (2007) Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Ctheta. *J Biol Chem* **282**, 21467-21476
228. Johnson, J. E., Goulding, R. E., Ding, Z., Partovi, A., Anthony, K. V., Beaulieu, N., Tazmini, G., Cornell, R. B., and Kay, R. J. (2007) Differential membrane binding and diacylglycerol recognition by C1 domains of RasGRPs. *Biochem J* **406**, 223-236
229. Gulbins, E., Coggeshall, K. M., Baier, G., Telford, D., Langlet, C., Baier-Bitterlich, G., Bonnefoy-Berard, N., Burn, P., Wittinghofer, A., and Altman, A. (1994) Direct stimulation of Vav guanine nucleotide exchange activity for Ras by phorbol esters and diglycerides. *Mol Cell Biol* **14**, 4749-4758
230. Brooun, A., Foster, S. A., Chrencik, J. E., Chien, E. Y., Kolatkar, A. R., Streiff, M., Ramage, P., Widmer, H., Weckbecker, G., and Kuhn, P. (2007) Remedial strategies in structural proteomics: expression, purification, and crystallization of the Vav1/Rac1 complex. *Protein Expr Purif* **53**, 51-62
231. Nomanbhoy, T. K., and Cerione, R. (1996) Characterization of the interaction between RhoGDI and Cdc42Hs using fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem* **271**, 10004-10009
232. Lazer, G., and Katzav, S. (2011) Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: good therapeutic targets for cancer therapy? *Cell Signal* **23**, 969-979
233. Cichowski, K., Brugge, J. S., and Brass, L. F. (1996) Thrombin receptor activation and integrin engagement stimulate tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product, p95vav, in platelets. *J Biol Chem* **271**, 7544-7550
234. Nagata, Y., and Todokoro, K. (1995) Thrombopoietin induces activation of at least two distinct signaling pathways. *FEBS Lett* **377**, 497-501

235. Miranti, C. K., Leng, L., Maschberger, P., Brugge, J. S., and Shattil, S. J. (1998) Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol* **8**, 1289-1299
236. Pearce, A. C., McCarty, O. J., Calaminus, S. D., Vigorito, E., Turner, M., and Watson, S. P. (2007) Vav family proteins are required for optimal regulation of PLCgamma2 by integrin alphaIIb beta3. *Biochem J* **401**, 753-761
237. Chen, K., Li, W., Major, J., Rahaman, S. O., Febbraio, M., and Silverstein, R. L. (2011) Vav guanine nucleotide exchange factors link hyperlipidemia and a prothrombotic state. *Blood* **117**, 5744-5750

Iktatószám: DEENKÉTK/60/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

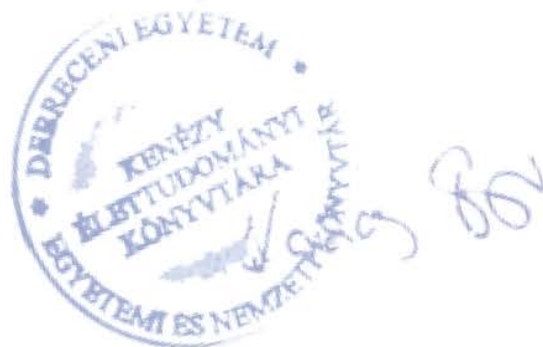
Jelölt: Géczy Tamás

Neptun kód: F1YUJW

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Géczy, T.**, Oláh, A., Tóth, I.B., Czifra, G., Szöllősi, A., Szabó, T., Zouboulis, C.C., Paus, R., Bíró, T.:
Protein Kinase C Isoforms Have Differential Roles in the Regulation of Human Sebocyte
Biology.
J. Invest. Dermatol. 132 (8), 1988-1997, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.94>
IF:6.314 (2011)
2. **Géczy, T.**, Peach, M., El, K.S., Sigano, D.M., Kang, J., Valle, C.J., Selezneva, J., Woo, W., Kedei, N.,
Lewin, N.E., Garfield, S.H., Lim, L., Mannan, P., Marquez, V.E., Blumberg, P.M.: Molecular
Basis for Failure of "Atypical" C1 Domain of Vav1 to Bind Diacylglycerol/Phorbol Ester.
J. Biol. Chem. 287 (16), 13137-13158, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.320010>
IF:4.773 (2011)



További Közlemények

3. Kedei, N., Lewin, N.E., **Géczy, T.**, Selezneva, J., Braun, D.C., Che, J., Herrmann, M.A., Heldman, M.R., Lim, L., Mannan, P., Garfield, S.H., Poudel, Y.B., Cummins, T.J., Rudra, A., Blumberg, P.M., Keck, G.E.: Biological Profile of the Less Lipophilic and Synthetically More Accessible Bryostatin 7 Closely Resembles That of Bryostatin 1.
ACS Chem. Biol. Epub ahead of print (2013)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/cb300671s>
IF:6.446 (2011)
4. Blumberg, P.M., Kedei, N., Lewin, N.E., Yang, D., Tao, J., Telek, A., **Géczy, T.**: Phorbol Esters and Diacylglycerol: The PKC Activators.
In: Protein Kinase C in Cancer Signaling and Therapy. Ed.: Marcelo G. Kazanietz, Springer, New York, USA, 25-53, 2010.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-543-9_3
5. Tóth, I.B., **Géczy, T.**, Griger, Z., Dózsa, A., Seltmann, H., Kovács, L., Nagy, L., Zouboulis, C.C., Paus, R., Bíró, T.: Transient receptor potential vanilloid-1 signaling as a regulator of human sebocyte biology.
J. Invest. Dermatol. 129 (2), 329-340, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.258>
IF:5.543
6. Dobrosi, N., Tóth, I.B., Nagy, G., Dózsa, A., **Géczy, T.**, Nagy, L., Zouboulis, C.C., Paus, R., Kovács, L., Bíró, T.: Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling.
FASEB J. 22 (10), 3685-3695, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.07-104877>
IF:7.049
7. Bíró, T., Tóth, I.B., Marincsák, R., Dobrosi, N., **Géczy, T.**, Paus, R.: TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch.
Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. 1772 (8), 1004-1021, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.03.002>
IF:4.041



8. Bíró, T., Bodó, E., Telek, A., **Géczy, T.**, Tychsen, B., Kovács, L., Paus, R.: Hair cycle control by vanilloid receptor-1 (TRPV1): Evidence from TRPV1 knockout mice.
J. Invest. Dermatol. 126 (8), 1909-1912, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700321>
IF:4.535

Összesített impakt faktor: 38.701

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 11.087

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.02.07.



TÁRGYSZAVAK

Protein kináz C

Vav

C1 domén

Diacil-glicerol

Forbol-észter

Guanin nukleotid kicserélő faktor

Faggyúmirigy

Sebocyta

Lipidszintézis

Bőr

Keywords:

Protein kinase C

Vav

C1 domén

Diacylglycerol

Phorbol ester

Guanine nucleotide exchange factor

Sebaceous gland

Sebocyte

Lipid synthesis

Skin

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Bíró Tamásnak** azért, hogy medikus hallgatóként felkeltette bennem a tudományos munka iránti érdeklődést, és a későbbiekben támogatásával, ösztönzésével és irányításával alapvető módon hozzájárult munkám sikereihez. Mentori munkájának köszönhetően rengeteg tapasztalatra tehettem szert a kutatás olyan meghatározó aspektusainak vonatkozásában, mint a kísérletes munka átgondolt megtervezése, az adatok logikus rendszerezése és az eredmények világos és igényes prezentációja; valamint a (számomra szintén nagy fontossággal bíró) oktatómunka területén.

Külön köszönet illeti **Dr. Kovács László professzor urat** és **Dr. Csernoch László professzor urat**, az Élettani Intézet egykori és jelenlegi vezetőit azért, hogy támogatásukkal hozzájárultak ahhoz, hogy munkámat az Élettani Intézet Sejt- és Molekuláris Élettani Laboratóriumában folytathassam.

Köszönettel tartozom **Dr. Peter M. Blumberg** (National Institutes of Health, NCI, CCR, LCBG, MMTP) **professzor úrnak**, hogy az általa vezetett laboratóriumban eltöltött kutatóévek során mentoromként elősegítette további tudományos fejlődésemet. Köszönet azért, hogy az ajtaja gyakorlatilag bármikor nyitva állt a számomra, ha munkámhoz tanácsra vagy új ötletekre volt szükségem.

Közvetlen kollégáim közül három ember nevét szeretném kiemelni, akik nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy a kutatómunkához szükséges laboratóriumi tudást összegyűjthessem. Az Élettani Intézetben eltöltött TDK és PhD évek során mind szakmailag, mind emberileg rengeteg tanulhattam **Czifra Gabriellától** és **Tóth István Balázstól**, akiknek ezúton is szeretném megköszönni mindazt a segítséget, amelyet tőlük kaptam ezen évek során. A National Cancer Institute-nál eltöltött kutatóévek során pedig felbecsülhetetlen segítséget kaptam **Kedei Noémitől** mind a szakma, mind pedig a magánélet számos területén, amelyért ezúton szeretném külön kifejezni hálás köszönetemet.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani mindazon munkatársaknak, akik szorgalmas hallgatóként tevékeny részt vállaltak a kísérletes munka kivitelezésében. Az Élettani Intézetből **Oláh Attila** és **Méhész Ágoston** segítségét szeretném megköszönni, a National Cancer Institute munkatársai közül pedig **Julia Selezneva**, **Christopher J. Valle** és **Wonhee Woo** munkáját illeti köszönet.

Szeretném ezenfelül megköszönni kollaborációs partnereinknek, hogy segítségükkel és tudásukkal hozzájárultak munkám sikeréhez. Köszönöm **Christos C. Zouboulisnak** és **Ralf Pausnak**, valamint **Megan L. Peach-nek**, **Dina Siganonak** és **Victor E. Marqueznek**.

Köszönetet mondok továbbá az Élettani Intézet és a National Cancer Institute laboratóriumaiban dolgozó azon közvetlen kollégáknak, akik megteremtették azt a légkört, amely nagyban elősegítette a konstruktív kutatómunkát, és akikre mindig számíthattam, ha segítségre szorultam. Köszönöm **Bodó Enikőnek**, **Dobrosi Nórának**, **Borbíró Istvánnak** és **Szöllősi Attilának**, valamint **Telek Andreának**, **Nancy E. Levin-nak** és **Larry Pearce-nek**.

Hálával tartozom ezenfelül **Vargáné Kiss Ibolyának** (vagyis Ibsikének), akinek felbecsülhetetlen munkája (és személyes jelenléte) nélkül az Élettani Intézet mindennapi élete elképzelhetetlen lett volna.

Végezetül köszönöm az **Élettani Intézet és a National Cancer Institute valamennyi dolgozójának**, **PhD és TDK hallgatójának**, akik az évek során segítettek munkámat.

FÜGGELÉK

Az Értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények

Protein Kinase C Isoforms Have Differential Roles in the Regulation of Human Sebocyte Biology

Tamás Géczy¹, Attila Oláh¹, Balázs I. Tóth¹, Gabriella Czifra¹, Attila G. Szöllősi¹, Tamás Szabó², Christos C. Zouboulis³, Ralf Paus^{4,5} and Tamás Bíró¹

Protein kinase C (PKC) isoforms have crucial roles in cutaneous signaling. Interestingly, we lack information about their involvement in human sebaceous gland biology. Therefore, in this current study, we investigated the functions of the PKC system in human immortalized SZ95 sebocytes. Using molecular biological approaches, imaging, and functional assays, we report that SZ95 sebocytes express the conventional cPKC α ; the novel nPKC δ , ϵ , and η ; and the atypical aPKC ζ . Activation of the PKC system by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) stimulated lipid synthesis (a hallmark of differentiation) and resulted in translocation and then downregulation of cPKC α and nPKC δ . In good accord with these findings, the effect of PMA was effectively abrogated by inhibitors and short interfering RNA-mediated “silencing” of cPKC α and nPKC δ . Of further importance, molecular or pharmacological inhibition of nPKC δ also prevented the lipogenic and apoptosis-promoting action of arachidonic acid. Finally, we also found that “knockdown” of the endogenous aPKC ζ activity markedly increased basal lipid synthesis and apoptosis, suggesting its constitutive activity in suppressing these processes. Collectively, our findings strongly argue for the fact that certain PKCs have pivotal, isoform-specific, differential, and antagonistic roles in the regulation of human sebaceous gland-derived sebocyte biology.

Journal of Investigative Dermatology advance online publication, 5 April 2012; doi:10.1038/jid.2012.94

INTRODUCTION

Protein kinase C (PKC) comprises a family of serine/threonine kinases (Nishizuka, 1988, 1992) that have crucial roles in the regulation of various biological mechanisms including, e.g., cell growth, differentiation, and survival. The PKC family includes the following: (i) calcium- and diacylglycerol- or phorbol ester-dependent “conventional” isoforms (PKC α , β I, β II, and γ ; cPKCs); (ii) calcium-independent “novel” nPKCs (PKC δ , ϵ , η , and θ); and (iii) calcium- and phorbol ester-independent “atypical” aPKCs (PKC ζ and λ /I). These

isoenzymes possess a characteristic expression pattern in a given tissue and cell type, and differentially regulate numerous cellular processes in an isoenzyme-specific manner (Gould and Newton, 2008; Reyland, 2009; Newton, 2010; Rosse *et al.*, 2010).

Emerging evidence suggests a pivotal role of the PKC system in cutaneous biology (Denning, 2004; Breitreutz *et al.*, 2007). Indeed, PKC activity has been shown to modulate the proliferation and differentiation of epidermal keratinocytes (Lee *et al.*, 1998; Papp *et al.*, 2003). In addition, isoenzyme-specific roles of PKCs expressed by keratinocytes have also been reported; i.e., cPKC α and nPKC δ were found to be key components in stimulating epidermal differentiation, whereas PKC ϵ was shown to promote skin tumor development (Lee *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999a; Jansen *et al.*, 2001; Neill *et al.*, 2003; Papp *et al.*, 2004).

Importantly, PKCs are also involved in controlling hair growth and cycling. Several PKC isoforms (e.g., cPKC α and β and nPKC δ and ϵ) were shown to be expressed in various compartments (e.g., outer root sheath keratinocytes, dermal papilla) of the hair follicle (Eicheler *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2003; Neill *et al.*, 2003). Moreover, levels of certain isoforms appeared to alter with the hair cycle; e.g., expression of cPKC α showed good correlation with increasing hair growth (anagen) in various mouse models (Li *et al.*, 1999b, 2003). Of further importance, modification of PKC activity by either phorbol esters or synthetic inhibitors resulted in profound alterations in human hair shaft elongation, as well as dermal papilla fibroblast growth and survival (Harmon *et al.*, 1995; Ferraris *et al.*, 1997).

¹DE-MTA “Lendület” Cellular Physiology Research Group, Department of Physiology, Medical and Health Science Center, Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary;

²Department of Pediatrics, Medical and Health Science Center, Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary;

³Departments of Dermatology and Immunology, Dessau Medical Center, Dessau, Germany; ⁴Department of Dermatology, University of Lübeck, Lübeck, Germany and ⁵Epithelial Sciences, School of Translational Medicine, University of Manchester, Manchester, UK

Correspondence: Tamás Bíró, DE-MTA “Lendület” Cellular Physiology Research Group, Department of Physiology, Medical and Health Science Center, Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, Nagyerdei krt. 98, PO Box 22, Debrecen 4032, Hungary.
E-mail: biro.tamas@med.unideb.hu

Abbreviations: AA, arachidonic acid; aPKC, atypical protein kinase C; cPKC, conventional protein kinase C; COX, cyclooxygenase; FLIPR, Fluorescence Image Plate Reader; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; nPKC, novel protein kinase C; siRNA, short interfering RNA

Received 21 August 2011; revised 19 December 2011; accepted 7 January 2012

Intriguingly, we lack data on the functional role of the PKC system in the other component of the human pilosebaceous unit, i.e., the sebaceous gland and its sebocytes. Sebocytes, engaged in holocrine (sebum) secretion, are a major site of hormone synthesis and metabolism in the human skin, and possess numerous ionotropic, metabotropic, and nuclear receptor-coupled pathways (Zouboulis *et al.*, 2002; Zouboulis and Bohm, 2004; Alestas *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Dobrosi *et al.*, 2008; Tóth *et al.*, 2009, 2011), which may all function as potential regulators of PKCs. Hence, sebocytes provide a highly instructive research tool for exploring PKC functions, which promises additional sets of information that may complement those obtainable with human hair follicle and with other extrafollicular cell types of the human skin.

Therefore, in this study, we identified and investigated members of the PKC system in SZ95 sebocytes—a human sebaceous gland-derived immortalized cell line that possesses striking functional similarities to those of primary human

sebocytes (Zouboulis *et al.*, 1999)—and dissected their isoform-specific role in the regulation of sebocyte biology.

RESULTS

Human SZ95 sebocytes possess a characteristic PKC isoform pattern

We first investigated the presence of PKC isoforms in SZ95 sebocytes. Using immunocytochemistry, western blotting, and quantitative “real-time” PCR, we provide the first evidence that SZ95 cells express cPKC α ; nPKC δ , ϵ , and η ; and aPKC ζ (Figure 1a and b). Importantly, none of the above techniques identified other members of the family (i.e., cPKC β I, β II, and γ ; nPKC η and θ ; aPKC λ /I; and the unique PKC μ -PKD) (data not shown). In addition, quantitative real-time PCR also revealed that, among the above isoforms, cPKC α , nPKC δ , and aPKC ζ exhibited the highest expressions, whereas the levels of nPKC ϵ and η were rather low (Figure 1b).

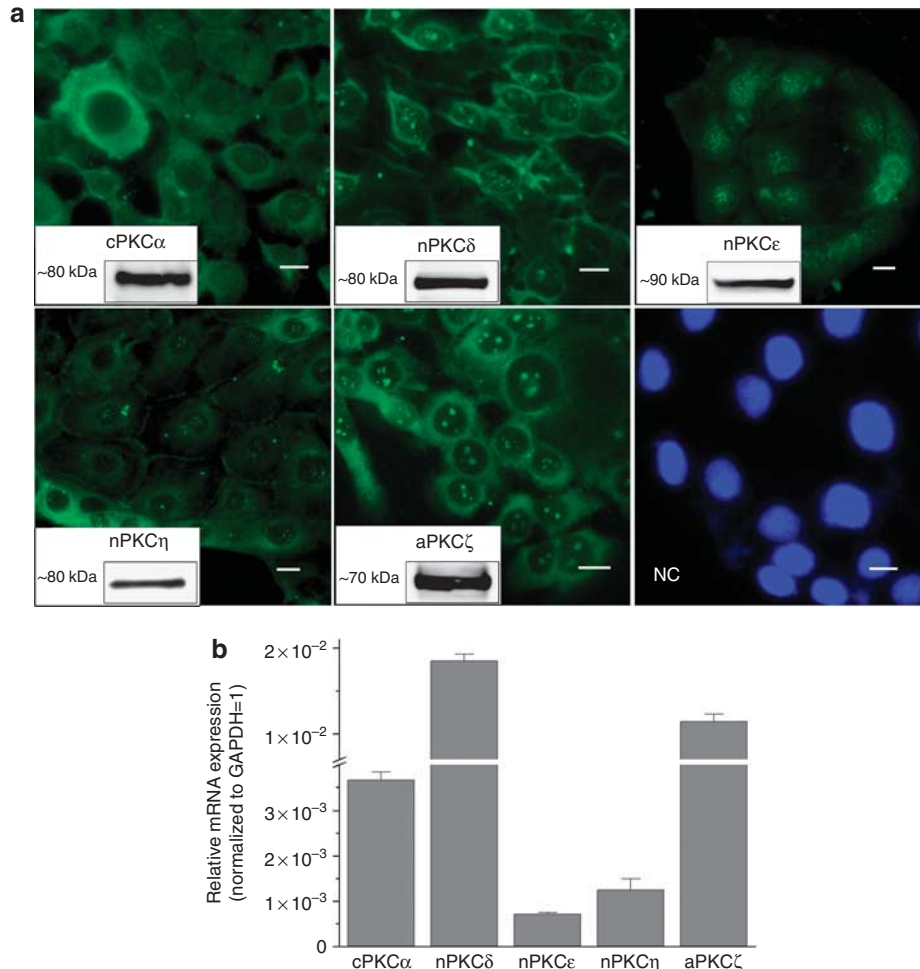


Figure 1. Human SZ95 sebocytes possess a characteristic protein kinase C (PKC) isoform pattern. (a) Specific immunoreactivity of various PKC isoforms as determined by immunofluorescence (FITC, green fluorescence). NC, negative control obtained after omitting the primary antibody. Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue fluorescence). Bars = 20 μ m. Insets: Expressions of PKC isoforms were also determined in cell lysates of SZ95 sebocytes by western blot analysis. (b) Quantitative “real-time” PCR (Q-PCR) analysis of mRNA transcript expression profile of the PKC isoenzymes. Data (mean \pm SEM) are expressed as a fraction of the mean value of expression of the housekeeping gene *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) (defined as 1). Two additional experiments yielded similar results. aPKC, atypical PKC; cPKC, conventional PKC; nPKC, novel PKC.

Pharmacological modulation of PKC activity alters lipid synthesis but does not influence cell viability of SZ95 sebocytes

One of the main hallmarks of sebocyte differentiation is the synthesis of various lipids, among which neutral lipids represent a major component (Rosenfield, 1989; Thody and Shuster, 1989; Doran *et al.*, 1991; Zouboulis *et al.*, 1998). Therefore, we investigated the effects of PKC-acting agents on the lipid content of cultured SZ95 sebocytes. Nile Red staining-based quantitative Fluorescence Image Plate Reader (FLIPR) measurement revealed that treatment with the general PKC activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (up to 48 hours) significantly stimulated lipid synthesis in a dose-dependent manner (Figure 2a). This effect was equally inhibited by GF109203X (inhibitor of cPKCs and nPKCs), Gö6976 (inhibitor of cPKCs), and Rottlerin (inhibitor of nPKC δ) (Figure 2b). It is noteworthy that none of the inhibitors alone (i.e., when applied without PMA) affected basal lipid content of the cells (Figure 2b). Furthermore, none of the above protocols altered cell viability or induced cell death of any form (apoptosis, necrosis); namely, the PKC activator or the inhibitors did not significantly modify the viable cell number (MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)-based colorimetric proliferation assay;

Figure 2c), nor did they induce necrotic (SYTOX Green accumulation assay) or apoptotic cell death (fluorimetric measurement of the decrease of mitochondrial membrane potential—DiIc₁(5) labeling) (Figure 2d).

The ability of PMA to stimulate lipid synthesis of SZ95 sebocytes is mediated by cPKC α and nPKC δ

The above results suggested the involvement of multiple PKC isoforms in the action of PMA. However, numerous reports indicate that the above inhibitors may often target other signaling molecules (Gschwendt *et al.*, 1994; Alessi, 1997), which question their specificity and/or selectivity for the PKC isoforms. Therefore, in order to define the specific roles of the PKC isoenzymes that were expressed at the highest levels (i.e., cPKC α , nPKC δ , and aPKC ζ) in mediating the lipid synthesis-stimulating effect of PMA, we have carried out a series of cellular imaging and molecular biology experiments.

Activation of a given PKC isoform is accompanied by the translocation of the molecule to another cellular compartment. Therefore, we first investigated the potential alteration in the subcellular localization of PKCs upon short-term (1 hour) PMA treatment. As revealed by immunostaining of PKCs followed by confocal microscopy analysis, 10 nM PMA

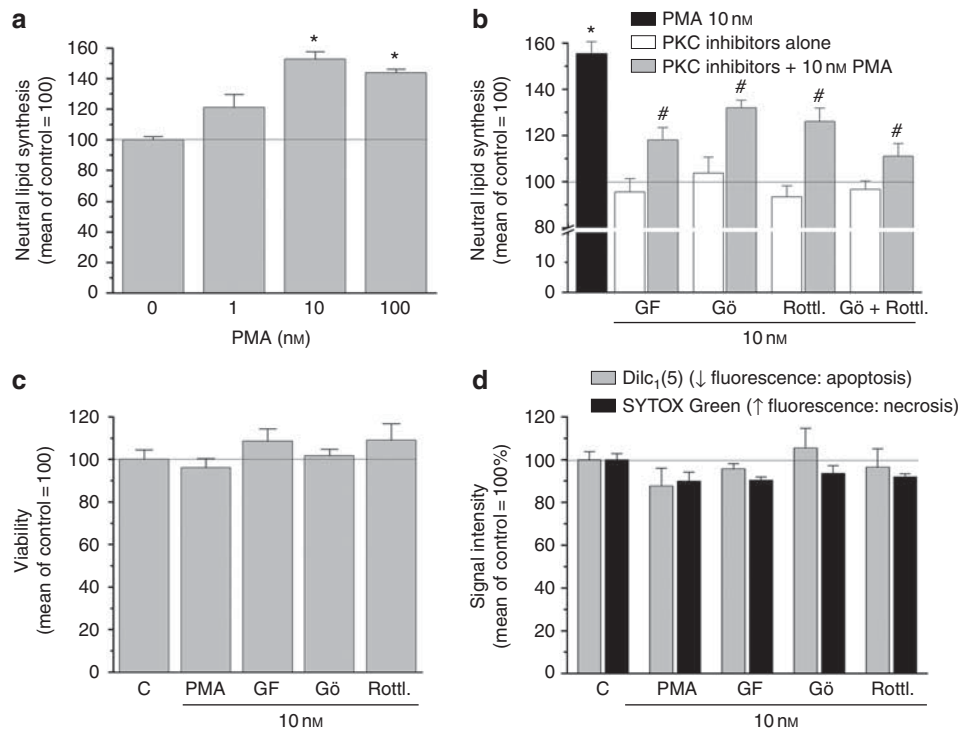


Figure 2. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) treatment stimulates lipid synthesis of SZ95 sebocytes. Cells were treated with vehicle (Control, C); the protein kinase C (PKC) activator PMA (at the indicated doses); the PKC inhibitors GF109203X (GF), Gö6986 (Gö), and Rottlerin (Rottl.) at 10 nM; or combinations for 48 hours. (a, b) Quantitative measurement of lipids as assessed by Nile Red labeling, followed by Fluorescence Image Plate Reader (FLIPR) measurement. Neutral lipids indicate *de novo*-synthesized intracellular lipids. (c) Determination of cell viability by colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. (d) Assessment of apoptosis by fluorimetric DiIc₁(5) assay reflecting mitochondrial membrane potential, and of necrosis by fluorimetric SYTOX Green assay reflecting ruptured cell membrane. Data (mean \pm SEM) are expressed as a percentage of the mean value of the vehicle-treated control group (defined as 100%, solid line). *Marks significant ($P < 0.05$) differences compared with the control group. In panel b, #marks significant ($P < 0.05$) differences compared with the PMA-treated group; $n = 4$ in each group. Three or four additional experiments yielded similar results.

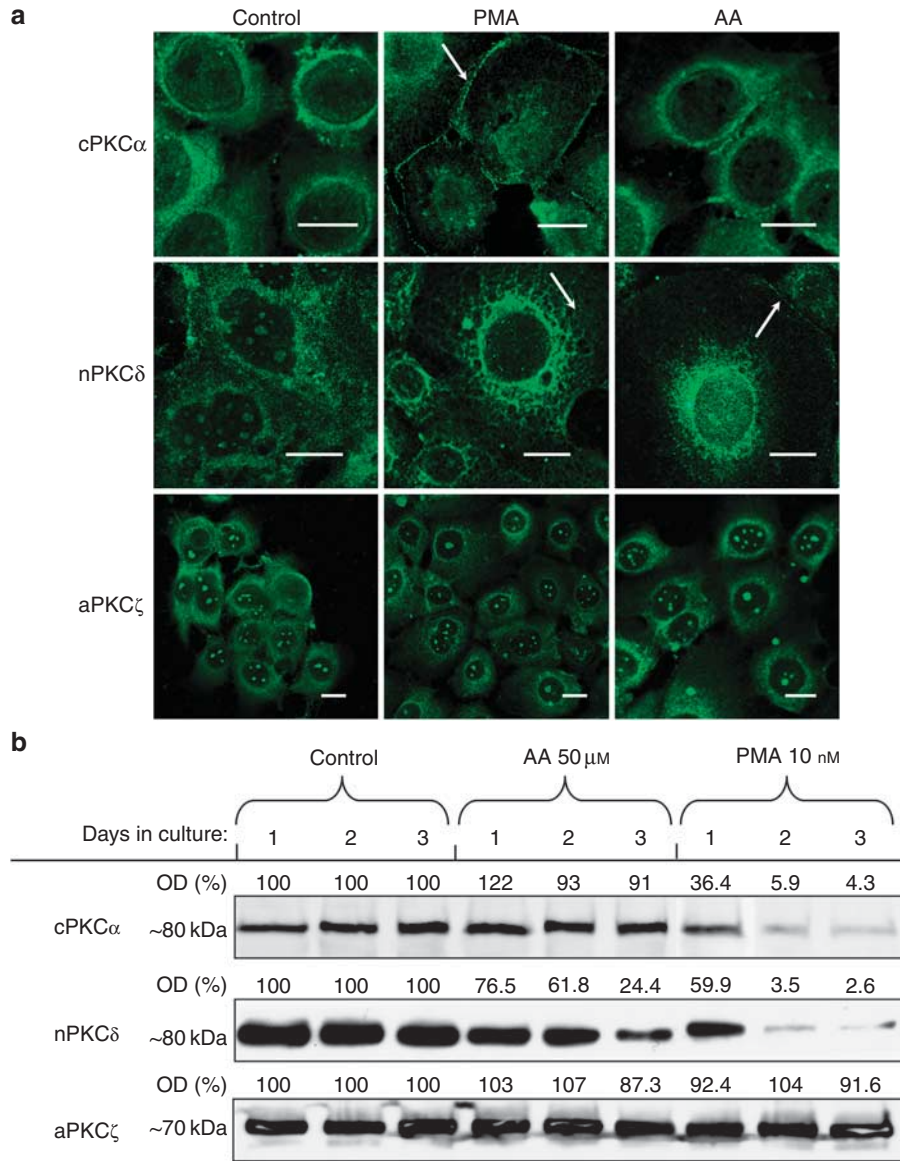


Figure 3. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and arachidonic acid (AA) differentially translocate and downregulate certain protein kinase C (PKC) isoforms in SZ95 sebocytes. Cells were treated with vehicle (Control), 10 nM PMA, and 50 μM AA for 1 hour (a) to assess translocation, or for 1–3 days (b) to measure downregulation of PKC isoforms. (a) Immunofluorescence labeling (FITC, green fluorescence) of PKCs followed by confocal microscopy analysis. Arrows indicate translocation. Bars = 20 μm. (b) Western blot analysis. The amounts of the individual PKC isoforms were quantified by densitometry (optical density, OD) and expressed as the percentage of the value of immunoreactive bands of daily-matched control group regarded as 100%. Note the translocation and downregulation of conventional PKCα (cPKCα) and novel PKCδ (nPKCδ) by PMA, and of nPKCδ by AA. Three additional experiments yielded similar results. aPKC, atypical PKC.

induced the translocation of cPKCα and nPKCδ. As expected, being a PMA-insensitive isoform, the subcellular localization of aPKCζ was not changed upon the application of the phorbol ester (Figure 3a).

Prolonged activation of the PKC isoforms results in the cleavage of the molecule by proteases, resulting in a decreased expression of the given PKC (downregulation). Therefore, we also assessed the effect of long-term (up to 3 days) PMA administration on the levels of the PKCs. Consistent with the above confocal microscopy data, as

revealed by western blot analysis, the phorbol ester markedly downregulated cPKCα and nPKCδ, whereas the level of aPKCζ was not altered (Figure 3b). Loading controls are presented in Supplementary Figure S1a online.

The involvement of cPKCα and nPKCδ in mediating the cellular effects of PMA was further assessed by short interfering RNA (siRNA) technique. Western blot analysis demonstrated that the expressions of “targeted” PKC isoforms were significantly “knocked down” by the specific siRNA probes at day 2 after transfection and remained suppressed on

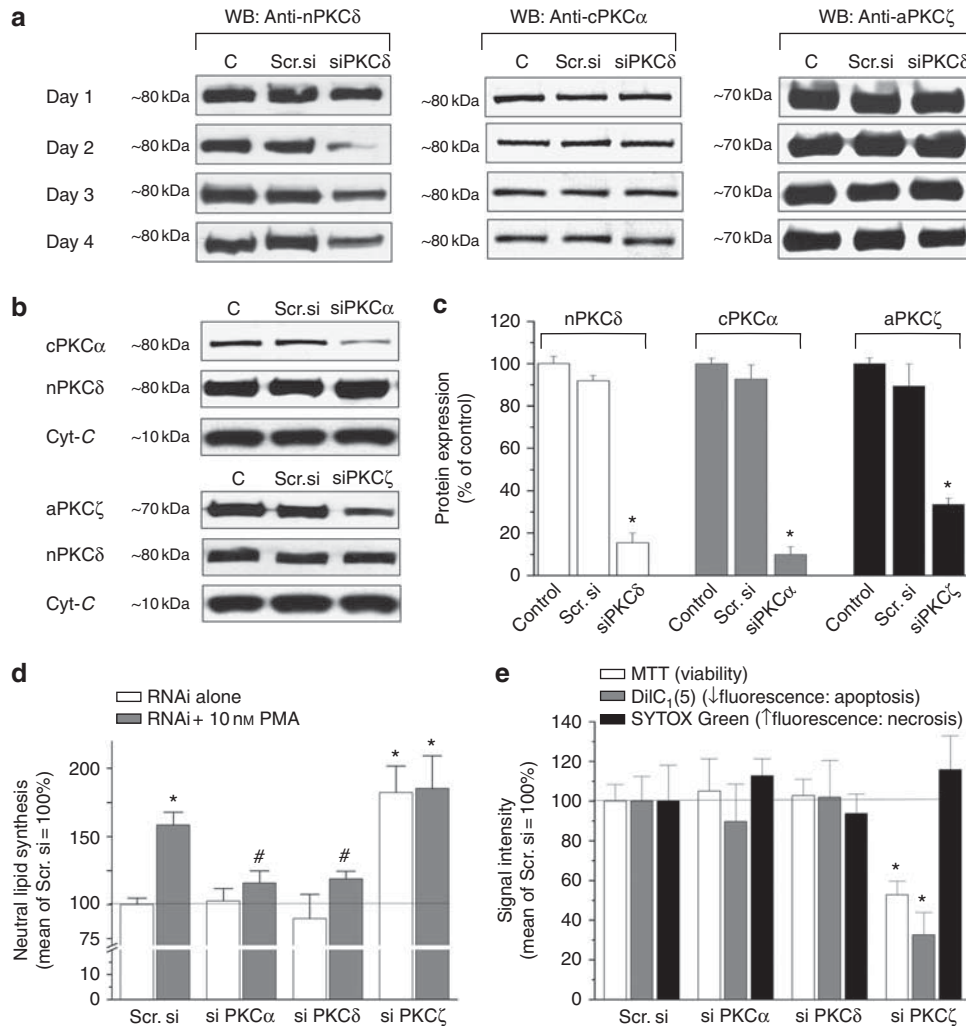


Figure 4. Conventional protein kinase α (cPKC α) and novel protein kinase δ (nPKC δ) are involved in mediating the lipogenic action of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), whereas short interfering RNA (siRNA)-mediated “silencing” of atypical protein kinase ζ (aPKC ζ) induces lipid synthesis and apoptosis in SZ95 sebocytes. Various siRNA probes against PKC isoforms, as well as a scrambled siRNA probe (Scr. si), were introduced into cells by transfection. To evaluate the efficacy of this intervention, at days 1–4 after transfection, cells were subjected to western blot (WB) analysis. As controls (C), the effect of the transfection reagent was determined. As a housekeeping molecule, expression of cytochrome-C (Cyt-C) was assessed. (a, b) Representative WB data at (a) days 1–4 and at (b) day 2 after transfection. (c) Statistical analysis of WB data. Optical density (OD) values of specific immunosignals were determined at day 2 after transfection in three independent experiments. Normalized OD values (to Cyt-C) in each group were then averaged and expressed as mean \pm SEM, as the percentage of the averaged values of the control groups was regarded as 100%. *Marks significant ($P < 0.05$) differences compared with the Scr. si groups. At day 2 after transfection, cells were treated with 10 nM PMA for 48 hours. (d) Determination of neutral lipids as assessed by Nile Red labeling followed by Fluorescence Image Plate Reader (FLIPR) measurement. (e) Determination of cell viability by colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay, of apoptosis by fluorimetric DilC $_1$ (5) assay, and of necrosis by fluorimetric SYTOX Green assay. Data (mean \pm SEM) of three independent experiments are expressed as a percentage of the mean value of the Scr. si group (defined as 100%, solid line). *Marks significant ($P < 0.05$) differences compared with the Scr. si group, whereas #marks significant ($P < 0.05$) differences compared with the PMA-treated group; $n = 4$ in each group. The Scr. si group displayed no significant difference compared with the non-transfected SZ95 sebocyte population subjected to identical treatment protocols (data not shown).

day 3 as well (Figure 4a–c). Specificity and selectivity of the procedure were demonstrated by the following: (i) siRNA-mediated silencing of given isoforms did not affect the expression of the other two PKCs investigated (Figure 4a and b); (ii) scrambled siRNA probes had no effect on the expression of the PKC isoforms (Figure 4a–c). Additional loading controls are presented in Supplementary Figure S1b online.

Silencing of cPKC α and nPKC δ did not modify the basal lipid synthesis (Figure 4d) and did not induce apoptosis/necrosis (Figure 4e) in SZ95 sebocytes. However, in good accord with the above data, “knockdown” of either of these isoforms significantly reduced the action of PMA to promote lipid synthesis (Figure 4d). Intriguingly, the siRNA-mediated silencing of aPKC ζ markedly increased the basal lipid synthesis of the sebocytes (Figure 4d) and, furthermore,

suppressed cellular viability and induced apoptosis (but not necrosis) (Figure 4e). Of further importance, elevation of basal lipid content was so marked in the aPKC ζ knocked-down cells that PMA was unable to further stimulate lipid accumulation (Figure 4d).

The ability of arachidonic acid to stimulate lipid synthesis and induce apoptosis of SZ95 sebocytes are selectively mediated by nPKC δ

The above-mentioned effects of PMA strikingly resembled the previously described findings with arachidonic acid (AA), one of the most effective inducers of lipid synthesis in SZ95 sebocytes (Wróbel *et al.*, 2003; Alestas *et al.*, 2006; Tóth *et al.*, 2009). Therefore, we wished to dissect whether or not the PKC isoforms are also involved in mediating the cellular effect of AA. As expected, AA induced a marked lipid synthesis in SZ95 sebocytes (Figure 5a). This effect was significantly (yet only partially) abrogated by both GF109203X and Rottlerin but not by Gö6976 (Figure 5a), suggesting that cPKC α most probably does not participate in mediating the effect of AA. Furthermore, PMA was able to further increase the lipid synthesis in the AA-treated cells (Figure 5a).

Our previous studies have also shown that the effect of AA to augment lipid synthesis in SZ95 sebocytes was

accompanied by the induction of sebocyte apoptosis (Wróbel *et al.*, 2003; Tóth *et al.*, 2009). Therefore, we investigated the involvement of the PKC system in the AA-induced apoptotic process. As expected, AA induced apoptosis (fluorimetric measurement of mitochondrial membrane potential) but not necrosis (SYTOX Green accumulation assay) in SZ95 sebocytes (Figure 5b). This effect of AA was almost completely prevented by GF109203X and Rottlerin but not by Gö6976, similar to the actions of these inhibitors on the AA-induced lipid synthesis. Finally, we found that the PKC activator PMA did not modify the effect of AA to promote apoptosis (Figure 5b).

Next, using the cellular and molecular approaches mentioned above, we further investigated the isoform-selective involvement of certain PKCs in the action of AA. Confocal microscopy analysis revealed that a short-term AA treatment (1 hour) of SZ95 sebocytes selectively translocated nPKC δ , whereas it did not modify the subcellular localizations of cPKC α and aPKC ζ (Figure 3a). Similarly, long-term (1–3 days) administration of AA selectively downregulated nPKC δ , whereas expressions of the other two isoforms were insignificantly changed (Figure 3b). In addition, in order to assess the effect of prolonged AA treatment on cell growth, proliferation was additionally measured for 3 days. As shown

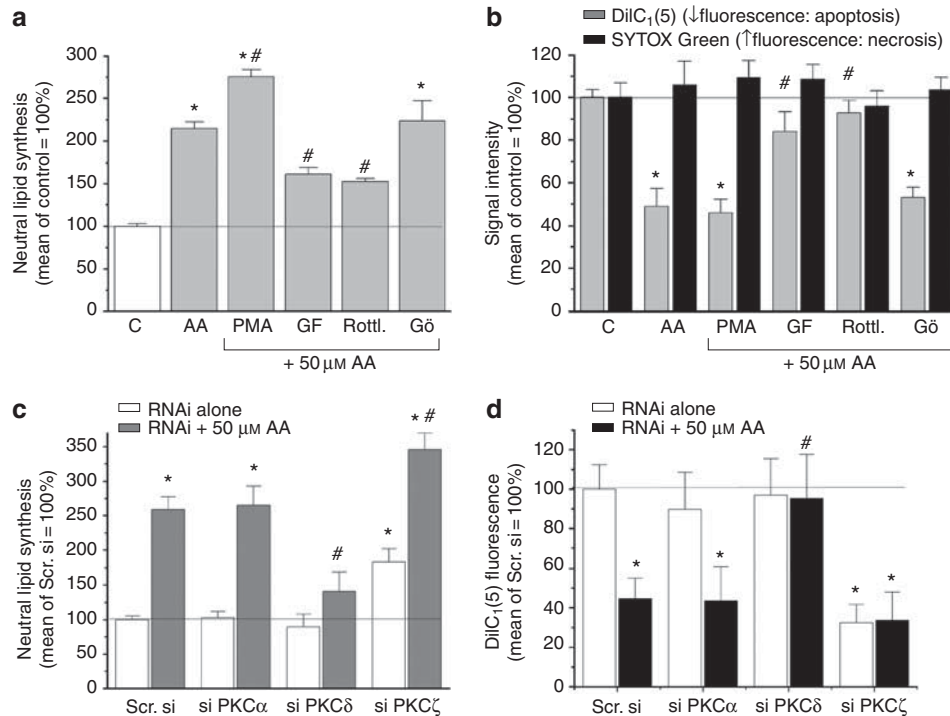


Figure 5. The lipogenic and apoptosis-inducing actions of arachidonic acid (AA) are mediated by novel protein kinase C δ (nPKC δ) in SZ95 sebocytes.

(a, b) Control or (c, d) short interfering RNA (siRNA)-transfected (2 days after transfection) SZ95 sebocytes were treated with vehicle (Control, C); 10 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA); the PKC inhibitors GF109203X (GF), Gö6976 (Gö), and Rottlerin (Rottl.) at 10 nM; 50 μM AA; or combinations for 48 hours. (a, c) Quantitative measurement of neutral lipids as assessed by Nile Red labeling, followed by Fluorescence Image Plate Reader (FLIPR) measurement. (b, d) Assessment of apoptosis by fluorimetric DilC₁(5) assay and of (b) necrosis by fluorimetric SYTOX Green assay. Data (mean ± SEM) of three independent experiments are expressed as a percentage of the mean value of either the (a, b) control or the (c, d) scrambled siRNA probe (Scr. si) group (defined as 100%, solid line). *Marks significant ($P < 0.05$) differences compared with the control or Scr. si group, whereas #marks significant ($P < 0.05$) differences compared with the AA-treated group; $n = 4$ in each group. The Scr. si group displayed no significant difference compared with the non-transfected SZ95 population subjected to identical treatment protocols (data not shown). RNAi, RNA interference.

in Supplementary Figure S2 online, long-term application of AA did not significantly affect the growth rate, suggesting that the selective downregulation of nPKC δ by prolonged AA application was not due to the suppression in cell number or selective suppression of viability of those SZ95 sebocytes that might express nPKC δ at high levels.

Moreover, the effect of AA to stimulate lipid synthesis and induce apoptosis was significantly suppressed in those SZ95 sebocytes in which the expression of nPKC δ (but, notably, not that of cPKC α) was silenced by siRNA (Figure 5c and d). In aPKC ζ -silenced sebocytes, AA was able to further stimulate the already highly elevated (basal) lipid synthesis; however, in these cells, the apoptosis was so marked (and hence the mitochondrial membrane potential was so reduced) that the effect of AA to induce further apoptosis was not measurable (Figure 5c and d). Nevertheless, these findings collectively argue for the selective involvement of nPKC δ in mediating the cellular effects of AA.

DISCUSSION

In this study, we report that human sebaceous gland-derived SZ95 sebocytes possess a characteristic PKC isoform pattern (i.e., the highly expressed cPKC α , nPKC δ , and aPKC ζ , and the poorly expressed nPKC ϵ and η), which is similar to that described on human epidermal keratinocytes (Lee *et al.*, 1997, 1998; Papp *et al.*, 2003). In addition, we provide the first evidence that the highly expressed PKC isoforms have central (yet differential and antagonistic) roles in regulating cellular growth, survival, and lipid synthesis of human sebocytes.

Specifically, we found that the activation of the PKC system by the phorbol ester PMA-stimulated lipid synthesis. A series of pharmacological (using various inhibitors) and molecular biology (using siRNA-mediated “silencing”) studies revealed that this action engaged two isoforms, i.e., cPKC α and nPKC δ . As these isoenzymes were reported to stimulate differentiation of human epidermal keratinocytes (Lee *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999a; Papp *et al.*, 2004), and, furthermore, as holocrine sebum production is one of the key hallmarks of sebocyte differentiation (Zouboulis *et al.*, 1999, 2002; Alestas *et al.*, 2006), we can conclude that cPKC α and nPKC δ have key roles in promoting differentiation of these cutaneous cell types.

Moreover, nPKC δ was also involved in selectively mediating the lipogenic action of AA, one of the most widely studied inducers of lipid synthesis in SZ95 sebocytes (Wróbel *et al.*, 2003; Alestas *et al.*, 2006; Dobrosi *et al.*, 2008; Tóth *et al.*, 2009), which was previously shown to stimulate skin PKC activity (Reynolds *et al.*, 1993; Lo *et al.*, 1994). Indeed, both the pharmacological and the molecular inhibition of nPKC δ suspended the lipogenic effect of AA. Of further importance, in SZ95 sebocytes with “silenced” nPKC δ , AA was unable to induce apoptosis, which suggests the pro-apoptotic role of nPKC δ (in addition to its pro-lipogenic action). Apparently, cPKC α is not involved in mediating the actions of AA, because (i) the AA-induced lipid synthesis and apoptosis was unaltered on sebocytes with “silenced” cPKC α , and (ii) the AA-elevated lipid synthesis (mediated

by nPKC δ) was further increased by the coadministration of PMA, which (besides stimulating nPKC δ) additionally activates cPKC α .

With respect to the potential link between the prostaglandin pathways and the action of AA, it should be noted that sebocytes were found to produce metabolites of both the lipoxygenase and the cyclooxygenase (COX) pathways (Alestas *et al.*, 2006). Moreover, it was also shown that COX inhibitors (indomethacin, diclofenac, etc.) enhanced sebaceous lipid production (Iwata *et al.*, 2005), whereas the lipoxygenase inhibitor Zileuton markedly decreased it (Zouboulis *et al.*, 2005; Zouboulis, 2009). These data suggest that AA metabolites may have opposite roles in the regulation of the sebaceous lipid synthesis; i.e., lipoxygenase products seem to increase sebaceous lipid synthesis, whereas COX products seem to decrease it. Therefore, the facts that increased lipid synthesis and apoptotic processes are usually “walking hand-in-hand” during the sebaceous differentiation and that COX inhibition enhances lipid production make COX inhibitors very unlikely to decrease AA-induced apoptosis of the sebocytes. (For our preliminary data on the effect of AA on immune profile of SZ95 sebocytes, see Supplementary Figure S3 online and Supplementary Discussion online.)

Interestingly, neither the siRNA-mediated “knockdown” nor the pharmacological inhibition of cPKC α and nPKC δ resulted in alterations in cellular viability and basal lipid synthesis of the sebocytes. These data implicate that the endogenous activities of the two isoforms are not crucial for regulating basal growth and differentiation of sebocytes. However, results obtained with PMA and AA strongly suggest their central involvement in such conditions when the engagement of various signal-transduction mechanisms results in production of PKC-activating intracellular secondary messengers such as diacylglycerol, Ca²⁺, etc. As human sebocytes express a wide array of metabotropic and nuclear receptors and their coupled “lipogenic” signaling pathways (Zouboulis *et al.*, 2002; Zouboulis and Bohm, 2004; Alestas *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Dobrosi *et al.*, 2008; Tóth *et al.*, 2009, 2011), it is proposed that cPKC α and/or nPKC δ may have a role in their actions.

The siRNA experiments resulted in other intriguing findings. Namely, we found a markedly increased lipid synthesis and apoptosis rate in cells with “silenced” aPKC ζ levels. These results, on one hand, suggest that—in contrast to the pro-lipogenic actions of cPKC α and nPKC δ , and the pro-apoptotic effect of nPKC δ —aPKC ζ rather inhibits lipid production and apoptosis of SZ95 sebocytes. On the other hand, our findings also implicate that the endogenous and, even more importantly, *constitutive* aPKC ζ activity is an indispensable regulatory factor for promoting physiological sebocyte proliferation and survival.

MATERIALS AND METHODS

Materials

PMA, GF 109203X, and AA were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Gö6976 and Rottlerin were from Calbiochem (Nottingham, UK). The primary antibodies against cPKC α , β , β _{II}, γ ;

nPKC ϵ and η ; and aPKC ζ and PKD-PKC μ were obtained from Sigma-Aldrich, and the ones against nPKC δ and θ and aPKC λ /i were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Cell culturing

Immortalized human SZ95 sebocytes (derived from facial sebaceous glands; Zouboulis *et al.*, 1999) were cultured in Sebomed basal medium (Biochrom, Berlin, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Paisley, UK), 5 ng ml⁻¹ human epidermal growth factor (Sigma-Aldrich), 1 mM CaCl₂, 50 U ml⁻¹ penicillin, and 50 μ g ml⁻¹ streptomycin (both from Teva, Debrecen, Hungary) (Dobrosi *et al.*, 2008; Tóth *et al.*, 2009).

Western blotting

Immunoblotting was performed to assess the protein expression of the various PKCs in SZ95 cells. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE (7.5% gels were loaded with 40 μ g protein per lane), transferred to BioBond nitrocellulose membranes (Whatman, Maidstone, UK), and probed with the above-mentioned rabbit primary antibodies against distinct PKC isoforms (dilution 1:100–1:1,000). Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG antibody (1:1,000; Bio-Rad, Hercules, CA) was used as a secondary antibody, and the immunoreactive signal was visualized by a SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate enhanced chemiluminescence kit (Pierce, Rockford, IL) using LAS-3000 Intelligent Dark Box (Fuji, Tokyo, Japan). To confirm equal loading, membranes were re-probed with an anti-cytochrome-C antibody (1:50; Santa Cruz). Where indicated, signal intensity was analyzed with densitometry, using the Image Pro Plus 4.5.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) (Gönczi *et al.*, 2008; Szegedi *et al.*, 2009).

Immunostaining of PKCs, confocal microscopy

Identification and determination of the subcellular localization of PKC isozymes in SZ95 cells were carried out by confocal microscopy following immunolabeling. Cells were fixed in acetone, permeabilized by 0.1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich), and then incubated with the above-mentioned rabbit anti-PKC primary antibodies for 60 minutes (dilution 1:100–1:200). Coverslips were then stained with an FITC-conjugated secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (dilution 1:200) and examined in a Zeiss LSM confocal microscopy system (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) (Bodó *et al.*, 2005; Dobrosi *et al.*, 2008; Tóth *et al.*, 2009).

Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR was carried out on an ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the 5' nuclease assay. Total RNA was isolated from cell lysates using TRIzol (Invitrogen). A measure of 3 μ g of total RNA was then reverse-transcribed into cDNA by using 15 U of AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI) and 0.025 μ g μ l⁻¹ oligodT primers (Promega). TaqMan primers and probes (Applied Biosystems) were applied for subsequent PCR amplification (assay IDs, Hs00176973_m1 for cPKC α , Hs00176998_m1 for cPKC β , Hs00177010_m1 for cPKC γ , Hs00178914_m1 for nPKC δ , Hs00178455_m1 for nPKC ϵ , Hs00178933_m1 for nPKC η , Hs00234709_m1 for nPKC θ , Hs00177051_m1 for aPKC ζ , and Hs00702254_s1 for aPKC λ /i) using the TaqMan universal PCR master mix protocol (Applied

Biosystems). As internal controls, transcripts of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase were determined (assay ID, Hs99999905_m1 for human) (Dobrosi *et al.*, 2008; Tóth *et al.*, 2009, 2011).

Assessment of viability

Viable cell number was assessed by measuring the ability of cellular dehydrogenases to convert the tetrazolium salt MTT (Sigma-Aldrich) to formazan. Cells were plated onto 96-well plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) (15,000 cells per well) in quadruplicates. After treatment, cells were incubated with 0.5 mg ml⁻¹ MTT for 3 hours, and the amount of formazan crystals (generated within the cells) was determined colorimetrically according to our previous reports (Bodó *et al.*, 2005; Kiss *et al.*, 2008; Szegedi *et al.*, 2009).

Assessment of apoptosis

Reduced mitochondrial membrane potential serves as an early indicator of the onset of apoptotic processes. SZ95 cells (15,000 cells per well) were plated onto 96-well black-well/clear-bottom plates (Greiner Bio-One) in quadruplicates. After treatment, their mitochondrial membrane potential was determined using the MitoProbe DiIC₁(5) Assay Kit (Invitrogen). The fluorescence intensity (reflecting the level of mitochondrial membrane potential) was measured on FlexStation II³⁸⁴ FLIPR (Molecular Devices, San Francisco, CA), as described in our previous reports (Dobrosi *et al.*, 2008; Tóth *et al.*, 2009, 2011).

Assessment of cytotoxicity (necrosis)

The cytotoxic effects of the above PKC-acting reagents were determined by SYTOX Green labeling (Invitrogen). Ruptured plasma membranes enable the penetration (and subsequent nucleic acid binding) of the fluorescent dye into necrotic cells, whereas viable cells with intact surface membranes display negligible SYTOX Green uptake. SZ95 cells were plated onto 96-well black-well/clear-bottom plates (Greiner Bio-One). After treatment, supernatants were removed and the cells were incubated with a 1 μ M solution of SYTOX Green. The fluorescence intensity of the dye was measured on FLIPR, as described previously (Dobrosi *et al.*, 2008; Tóth *et al.*, 2009, 2011).

Assessment of intracellular lipid content

For a quantitative measurement of the intracytoplasmic lipid content, Nile Red (Sigma-Aldrich) labeling was used. SZ95 cells (15,000 cells per well) were plated onto 96-well black-well/clear-bottom plates (Greiner Bio-One) in quadruplicates. Following treatment, supernatants were removed from wells and cells were incubated in 1 μ g ml⁻¹ Nile Red for 20 minutes. The fluorescence intensity of the dye (excitation: 485 nm; emission: 565 nm) reflecting the neutral lipid content of intracytoplasmic lipid droplets was measured on FLIPR (Wróbel *et al.*, 2003; Alestas *et al.*, 2006; Dobrosi *et al.*, 2008).

RNA interference (siRNA)

SZ95 sebocytes were seeded on six-well culture plates in medium lacking antibiotics and were grown until they reached 40–60% confluence. Cells were then transfected with specific Stealth diRNAi oligonucleotides (at 40 nM, all from Santa Cruz) against cPKC α (sc-44227), nPKC δ (sc-36253), and aPKC ζ (sc-29451) using

Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen). SiRNA-Negative Control Duplexes (scrambled siRNA) were used as controls (sc-37007 and sc-44230; Santa Cruz). Immunoblotting was performed daily (for 4 days) to follow the changes in the expression level of the given PKC isoform after transfection. For subsequent cellular assays (assessing lipid content, cell viability, apoptosis, and cytotoxicity) cells were trypsinized 24 hours after transfection, replated onto 96-well plates, and subjected to the above-mentioned procedures (Dobrosi *et al.*, 2008; Tóth *et al.*, 2009, 2011).

Statistical analysis

When applicable, data were analyzed using a two-tailed unpaired *t*-test, and *P*<0.05 values were regarded as significant differences.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by Hungarian (OTKA NK78398, OTKA PD76065, TÁMOP-4.2.2-08/1/2008-0019, TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007, ETT 329-07, LP2011-003/2011) and EU (FP7-REGPOT-2008-1/22992) research grants. GC is a recipient of the János Bolyai Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences, and AO is a recipient of the Richter "Talentum" Fellowship of the Richter Talentum Foundation, Hungary. The SZ95 sebaceous gland cell line is protected by the patents and patent applications EP1151082, DE59913210D, AU200019804, US2002034820, CA2360762, CN1344314T, JP2002535984, IL144683D, PL350191, HU0200048, AT319813T, DK1151082T, and KR31762.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/jid>

REFERENCES

- Alessi DR (1997) The protein kinase C inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1 β and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* 402:121–3
- Aleas T, Ganceviciene R, Fimmel S *et al.* (2006) Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B4 and prostaglandin E2 are active in sebaceous glands. *J Mol Med* 84:75–84
- Bodó E, Bíró T, Telek A *et al.* (2005) A "hot" new twist to hair biology— involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am J Pathol* 166:985–98
- Breitkreutz D, Braiman-Wiksmann L, Daum N *et al.* (2007) Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *J Cancer Res Clin Oncol* 133:793–808
- Denning MF (2004) Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1141–6
- Dobrosi N, Tóth IB, Nagy G *et al.* (2008) Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. *FASEB J* 22:3685–95
- Doran TI, Baff R, Jacobs P *et al.* (1991) Characterization of human sebaceous cells *in vitro*. *J Invest Dermatol* 96:341–8
- Eicheler W, Huth A, Happle R *et al.* (1997) Phorbol-myristate-acetate, but not interleukin-1 beta or insulin-like growth factor-I, regulates protein kinase C isoenzymes in human dermal papilla cells. *Acta Dermatol Venereol* 77:361–4
- Ferraris C, Cooklis M, Polakowska RR *et al.* (1997) Induction of apoptosis through the PKC pathway in cultured dermal papilla fibroblasts. *Exp Cell Res* 234:37–46
- Gönczi M, Telek A, Czifra G *et al.* (2008) Altered calcium handling following the recombinant overexpression of protein kinase C isoforms in HaCaT cells. *Exp Dermatol* 17:584–91
- Gould CM, Newton AC (2008) The life and death of protein kinase C. *Curr Drug Targets* 9:614–25
- Gschwendt M, Müller HJ, Kialbassa K *et al.* (1994) Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 199:93–8
- Harmon CS, Nevins TD, Bollag WB (1995) Protein kinase C inhibits human hair follicle growth and hair fibre production in organ culture. *Br J Dermatol* 133:686–93
- Iwata C, Akimoto N, Sato T *et al.* (2005) Augmentation of lipogenesis by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 in hamster sebaceous glands: identification of cytochrome P-450-mediated 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 production. *J Invest Dermatol* 125:865–72
- Jansen AP, Dreckschmidt NE, Verwiebe ED *et al.* (2001) Regulation of the induction of epidermal ornithine decarboxylase and hyperplasia to the different skin tumor-promotion susceptibilities of protein kinase C alpha, -delta, and -epsilon transgenic mice. *Int J Cancer* 93:635–43
- Kiss B, Bíró T, Czifra G *et al.* (2008) Investigation of micronized titanium-dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Exp Dermatol* 17:659–67
- Lee YS, Dlugosz AA, McKay R *et al.* (1997) Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C α in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes. *Mol Carcinogen* 18:44–53
- Lee YS, Yuspa SH, Dlugosz AA (1998) Differentiation of cultured human epidermal keratinocytes at high cell densities is mediated by endogenous activation of the protein kinase C pathway. *J Invest Dermatol* 111:762–6
- Li L, Lorenzo PS, Bogi K *et al.* (1999a) Protein kinase C δ targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by and adenoviral vector. *Mol Cell Biol* 19:8547–58
- Li LF, Fiedler VC, Kumar R (1999b) The potential role of skin protein kinase C isoforms alpha and delta in mouse hair growth induced by diphenyl-prone-allergic contact dermatitis. *J Dermatol* 26:98–105
- Li LF, Guo J, Gao ZF (2003) Overexpression of skin protein kinase C-alpha in anagen hair follicles during induced growth of mouse hair. *Clin Exp Dermatol* 28:429–33
- Lo HH, Bartek GA, Fischer SM (1994) *In vitro* activation of mouse skin protein kinase C by fatty acids and their hydroxylated metabolites. *Lipids* 29:547–53
- Neill GW, Ghali LR, Green JL *et al.* (2003) Loss of protein kinase C alpha expression may enhance the tumorigenic potential of Gli1 basal cell carcinoma. *Cancer Res* 63:4692–7
- Newton AC (2010) Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E395–402
- Nishizuka Y (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature* 334:661–5
- Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607–14
- Papp H, Czifra G, Bodó E *et al.* (2004) Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell Mol Life Sci* 61:1095–105
- Papp H, Czifra G, Lázár J *et al.* (2003) Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation of HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* 12:811–24
- Reyland ME (2009) Protein kinase C isoforms: multi-functional regulators of cell life and death. *Front Biosci* 14:2386–99
- Reynolds NJ, Talwar HS, Baldassare JJ *et al.* (1993) Differential induction of phosphatidylcholine hydrolysis, diacylglycerol formation and protein kinase C activation by epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha in normal human skin fibroblasts and keratinocytes. *Biochem J* 294:535–44
- Rosenfield RL (1989) Relationship of sebaceous cell stage to growth in culture. *J Invest Dermatol* 92:751–4
- Rosse C, Linch M, Kermorgant S *et al.* (2010) PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:103–12
- Szegedi A, Páyer E, Czifra G *et al.* (2009) Protein kinase C isoenzymes differentially regulate the differentiation-dependent expression of

- adhesion molecules in human epidermal HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* 18:122–9
- Thody AJ, Shuster S (1989) Control and function of sebaceous glands. *Physiol Rev* 69:383–416
- Tóth IB, Dobrosi N, Dajnoki A *et al.* (2011) Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1. *J Invest Dermatol* 131:1095–104
- Tóth IB, Géczy T, Griger Z *et al.* (2009) Transient receptor potential vanilloid-1 signaling as a regulator of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol* 129:329–39
- Wróbel A, Seltmann H, Fimmel S *et al.* (2003) Differentiation and apoptosis in human immortalized sebocytes. *J Invest Dermatol* 120:175–81
- Zhang Q, Seltmann H, Zouboulis CC *et al.* (2006) Involvement of PPAR γ in oxidative stress-mediated prostaglandin E(2) production in SZ95 human sebaceous gland cells. *J Invest Dermatol* 126:42–8
- Zouboulis CC (2009) Zileuton, a new efficient and safe systemic anti-acne drug. *Dermatoendocrinology* 1:188–92
- Zouboulis CC, Bohm M (2004) Neuroendocrine regulation of sebocytes—a pathogenetic link between stress and acne. *Exp Dermatol* 13(Suppl 4):31–5
- Zouboulis CC, Saborowski A, Boschnakow A (2005) Zileuton, an oral 5-lipoxygenase inhibitor, directly reduces sebum production. *Dermatology* 210:36–8
- Zouboulis CC, Seltmann H, Hiroi N *et al.* (2002) Corticotropin-releasing hormone: an autocrine hormone that promotes lipogenesis in human sebocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7148–53
- Zouboulis CC, Seltmann H, Neitzel H *et al.* (1999) Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol* 113:1011–20
- Zouboulis CC, Xia L, Akamatsu H *et al.* (1998) The human sebocyte culture model provides new insights into development and management of seborrhoea and acne. *Dermatology* 196:21–31

Molecular Basis for Failure of “Atypical” C1 Domain of Vav1 to Bind Diacylglycerol/Phorbol Ester^{*[5]}

Received for publication, November 2, 2011, and in revised form, February 16, 2012. Published, JBC Papers in Press, February 18, 2012, DOI 10.1074/jbc.M111.320010

Tamas Geczy[‡], Megan L. Peach[§], Saïd El Kazzouli[¶], Dina M. Sigano[¶], Ji-Hye Kang[¶], Christopher J. Valle[‡], Julia Selezneva[‡], Wonhee Woo[‡], Noemi Kedei[‡], Nancy E. Lewin[‡], Susan H. Garfield^{||}, Langston Lim^{||}, Poonam Mannan^{||}, Victor E. Marquez[¶], and Peter M. Blumberg^{‡1}

From the [‡]Laboratory of Cancer Biology and Genetics and ^{||}Laboratory of Experimental Carcinogenesis, Center for Cancer Research, NCI, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892 and the [¶]Chemical Biology Laboratory, Molecular Discovery Program, Center for Cancer Research, and [§]Basic Research Program, SAIC-Frederick, NCI-Frederick, National Institutes of Health, Frederick, Maryland 21702

Background: The C1 domain of Vav1 retains a three-dimensional structure consistent with phorbol ester binding but nevertheless does not bind.

Results: Five residues render the C1 domain less lipophilic and interfere with its binding.

Conclusion: The C1 domain of Vav1 illustrates a novel mechanism rendering the C1 domain “atypical.”

Significance: Ligands exploiting the specific amino acid differences may selectively target Vav1.

C1 domains, the recognition motif of the second messenger diacylglycerol and of the phorbol esters, are classified as typical (ligand-responsive) or atypical (not ligand-responsive). The C1 domain of Vav1, a guanine nucleotide exchange factor, plays a critical role in regulation of Vav activity through stabilization of the Dbl homology domain, which is responsible for exchange activity of Vav. Although the C1 domain of Vav1 is classified as atypical, it retains a binding pocket geometry homologous to that of the typical C1 domains of PKCs. This study clarifies the basis for its failure to bind ligands. Substituting Vav1-specific residues into the C1b domain of PKC δ , we identified five crucial residues (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Thr²⁴, and Tyr²⁶) along the rim of the binding cleft that weaken binding potency in a cumulative fashion. Reciprocally, replacing these incompatible residues in the Vav1 C1 domain with the corresponding residues from PKC δ C1b (δ C1b) conferred high potency for phorbol ester binding. Computer modeling predicts that these unique residues in Vav1 increase the hydrophilicity of the rim of the binding pocket, impairing membrane association and thereby preventing formation of the ternary C1-ligand-membrane binding complex. The initial design of diacylglycerol-lactones to exploit these Vav1 unique residues showed enhanced selectivity for C1 domains incorporating these residues, suggesting a strategy for the development of ligands targeting Vav1.

The lipophilic second messenger *sn*-1,2-diacylglycerol (DAG)² plays a central role in cellular signaling. Following the

activation of many receptors, DAG is generated either through the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate via phospholipase C or indirectly from phosphatidylcholine via phospholipase D (1). Its downstream effects are mediated through interaction with protein kinase C (PKC), RasGRP, and five other families of effectors that possess a C1 domain recognition motif (2–4). The profound involvement of PKC and these other families of signaling proteins in proliferation, differentiation, apoptosis, angiogenesis, and drug resistance has emphasized the importance of these C1 domain-containing proteins as therapeutic targets for cancer and other diseases, and multiple agents, *e.g.* bryostatin 1 or PEP005, targeted to the C1 domains of PKC are currently in clinical trials (4, 5).

Structural studies by NMR, x-ray crystallography, and molecular modeling have afforded substantial insights into ligand recognition by the C1 domains (6–9). These domains are cysteine-rich zinc finger structures. The DAG-binding site is a hydrophilic cleft formed from two pulled apart β -sheets, whereas the C1 domain surface surrounding the binding cleft is hydrophobic. Insertion of DAG into the binding cleft serves to complete the hydrophobic surface, and additional hydrophobicity is contributed by hydrophobic substituents on the DAG. This increase in hydrophobicity upon binding promotes insertion of the C1 domain into the lipid bilayer, which in turn can drive conformational change in the overall protein structure, as is the case with PKC, as well as promote translocation to the membrane, changing access of the protein to interacting partners. Because the lipids of the bilayer interact both with the ligand and with the surface of the C1 domain, great selectivity is possible. Although DAG represents the endogenous ligand for the C1 domains, nature has provided a diversity of high affinity analogs such as the phorbol esters or bryostatins, and DAG-lactones have afforded a powerful synthetic platform for probing structure-function relationships (4, 10).

^{*} This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Project Z1A BC 005270 from the Intramural Research Program, NCI.

^[5] This article contains supplemental Figs. 1–3.

¹ To whom correspondence should be addressed: National Institutes of Health, NCI, Bldg. 37, Rm. 4048, 37 Convent Dr., MSC 4255, Bethesda MD 20892-4255. Tel.: 301-496-3189; Fax: 301-496-8709; E-mail: blumberp@dc37a.nci.nih.gov.

² The abbreviations used are: DAG, diacylglycerol; GEF, guanyl exchange factor; DH domain, Dbl homology domain; PH domain, pleckstrin homology domain; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PDBu, phorbol 12,13-dibu-

tyrate; MLP, molecular lipophilicity; DOG, 1,2-dioctanoyl glycerol; PS, phosphatidylserine; PC, phosphatidylcholine; SH, Src homology.

C1 Domain of Vav1

Initially, C1 domains were categorized into two families (11) as follows: (i) those that bound DAG/phorbol ester were termed "typical," and (ii) the more divergent members that failed to bind were termed "atypical." Examples of atypical C1 domains include those of the atypical PKC isozymes (aPKC ζ and aPKC ι), c-Raf, kinase suppressor of Ras (KSR), and Vav (3, 4, 12). More recently, it has become evident that atypical C1 domains can be further categorized. The first subclass, represented by proteins like c-Raf or KSR, consists of C1 domains that are grossly distorted in the binding cleft geometry (e.g. deletions of several key residues in the loops making up the binding pocket). Members of the second subclass, in contrast, retain the binding cleft geometry but incorporate other factors impeding ligand binding. We showed that, in the case of the atypical PKCs, a series of three arginine residues lining the rim of the binding pocket were able to rotate into the cleft, making it inaccessible to ligands (13). Replacement of these arginine residues with the corresponding residues found in the C1b domain of PKC δ generated high affinity ligand binding and ligand-driven membrane translocation.

Recent structural studies using x-ray crystallography have revealed a striking resemblance between the binding pocket geometry of the C1b domain of the potent phorbol ester receptor PKC δ and that of the protooncogene Vav1, a guanine nucleotide exchange factor (14–16). Although early studies on the GEF activity of Vav1 toward small GTPases suggested a DAG/phorbol ester-sensitive function of Vav1 (17), subsequent ligand-binding experiments using purified recombinant Vav1 and the ultrapotent phorbol ester analog [^3H]bryostatin did not support those results (18), leading to the classification of this C1 domain as atypical. In this study, we have sought to identify key structural determinants in the Vav1 C1 sequence that (analogous to our findings with atypical PKCs) might account for its apparent lack of affinity for DAG and phorbol esters.

Vav1 is a versatile cellular signal transducer molecule that plays a pivotal role in various signaling pathways. One of the most important and best characterized functions of Vav1 is the GEF activity toward the Rho/Rac family of small GTPases, which are important molecular transducers in signaling cascades that regulate cytoskeleton organization, cell cycle progression, gene transcription, adhesion, migration, cell growth, and survival (19–21). In addition to their activity as exchange factors for Rho/Rac proteins, Vav proteins can also regulate various other cellular processes in a GEF-independent fashion, functioning as adapter molecules to facilitate protein-protein interactions (22). The expression of Vav1 is restricted almost exclusively to normal cells of hematopoietic origin (23–25). There, T-cell receptor-coupled activation of the guanine exchange function of Vav1 leads to Rac1-induced cytoskeleton organization, an essential step for the formation of the immunological synapse and subsequent proper T-cell activation (20, 26). Vav1 further plays a crucial role in T-cell development (27). Although less extensively investigated, recent studies have also characterized a role of Vav1 in human cancer, especially in solid tumors of nonhematopoietic origin (28), where the ectopic expression of wild-type Vav1 can contribute to the development and progression of these malignancies (29–32). It there-

fore represents an attractive therapeutic target, both for cancer as well as for autoimmunity.

Vav1 possesses multiple structural motifs that mediate its versatile functions in cellular signaling (Fig. 1A) (19). It contains a Dbl homology (DH) domain, which is responsible for catalyzing nucleotide exchange (33). The DH domain is flanked by an N-terminal acidic (Ac) motif and a calponin homology (CH) domain together with a C-terminal pleckstrin homology (PH) domain and a C1 domain. These domains surrounding the catalytic DH domain in the CH-C1 segment of the molecule regulate the exchange activity of Vav1 (28). In addition, the structure of Vav contains an SH3-SH2-SH3 cassette at the C terminus, which links it with tyrosine phosphorylation pathways and mediates its activity as a scaffold protein (22).

Initial studies of Vav using site-directed mutagenesis identified the C1 domain as critical for maintaining efficient guanine nucleotide exchange activity toward Rho/Rac GTPases (34, 35). Although this regulatory effect initially was hypothesized to arise from direct contacts between the C1 domain and the GTPases (36), crystallographic studies now provide a different explanation (15, 16). An intramolecular network of contacts between the PH-C1 unit and the DH domain helps stabilize the conformation of a critical α -helix within the DH domain, which is essential for the displacement of guanine nucleotide from the GTPase. The C1 domain (together with the PH domain) thus contributes to optimal GEF activity by restricting the conformational flexibility of the DH domain, keeping it in a stable conformation primed for efficient interaction with the Rac1 GTPase. The C1 domain of Vav1 possesses a three-dimensional structure very similar to that of the typical C1b domain of PKC δ . Because its solvent-accessible cavity is located in the vicinity of the α -helix of DH that makes contacts with Rac1, ligand binding to the cleft has the intriguing potential to modulate Vav1 function. Could DAG/phorbol esters or their derivatives interact with this binding pocket and thereby disrupt the enzymatic function of Vav1?

In this study we wished to characterize the ligand binding properties of the C1 domain of Vav1. We confirmed the lack of phorbol ester binding of Vav1. Using site-directed mutagenesis, we identified the central structural determinants in the loops making up the binding cleft responsible for the lack of phorbol ester sensitivity. The C1 domain of Vav1 (together with that of atypical PKCs) thus belongs to that subclass of atypical (nonresponsive) C1 domains that retain the proper structure for ligand binding. However, the presence of four unique hydrophilic residues around the rim of the binding pocket disrupts the lipophilic surface of the tip of the binding pocket and, together with an inappropriately hydrophobic residue distal to the tip of the C1 domain, interferes with the insertion of ligand receptor complex into the lipid membrane, which is an essential step for stabilizing the ternary binding complex of ligand receptor and membrane. Mutating these residues in the Vav1 C1 domain to correspond to the ones in the potent phorbol ester receptor δC1b , we demonstrated almost complete recovery of binding affinity *in vitro* and *in vivo*, which confirms the previous structural findings on the conserved binding pocket geometry of Vav1. Our results raise the possibility that appropriately modified DAG/phorbol ester analogs that can specifi-

cally target these residues might have the potential to selectively bind to Vav1 C1 and to manipulate Vav1 function through this interaction. Finally, we describe some DAG-lactones that display modest selectivity for features of the Vav1-C1-like structure.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—[^3H]Phorbol 12,13-dibutyrate ([^3H]PDBu) (17.2 Ci/mmol) was obtained from PerkinElmer Life Sciences. PDBu and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) were purchased from LC Laboratories (Woburn, MA). Phosphatidyl-L-serine (PS), phosphatidylcholine (PC), and 1,2-dioctanoylglycerol (DOG) were from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). LNCaP human prostate cancer cells, fetal bovine serum (FBS), RPMI 1640 medium, and L-glutamine were from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Reagents used for culturing bacteria (LB Broth, LB agar plates with different selection antibiotics, etc.) were from K-D Medical, Inc. (Columbia, MD). The oligonucleotide primers used for PCR cloning, sequence analysis, and site-directed mutagenesis were obtained from Invitrogen.

Construction of GST-fused C1 Domains of PKC δ and Vav1—The wild-type δC1b domain in a pGEX-5 \times -1 plasmid (GE Healthcare) had previously been constructed in our laboratory (48). To generate a recombinant Vav1 C1 domain fused to glutathione S-transferase (GST) at the N terminus, PCR amplification of the appropriate sequence was performed using Platinum[®] PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The full-length cDNA clone of Vav1 served as template. The following oligonucleotide primers were used in the PCR as follows: (i) forward primer 5'-CGGAATTCAATGCTACAGCCAATGGGC-3' and (ii) reverse primer 5'-CGGAATTCGAAATCTTGCCCATGGCG-3'. The DNA fragments of the PCR were purified with QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA) and subsequently digested with EcoRI (New England Biolabs, Beverly, MA) to create adhesive ends of the C1 fragments. After an additional step of purification with the QIAquick PCR purification kit, the fragments were finally ligated into the GST-containing pGEX-5 \times -1 plasmid (GE Healthcare) using the EcoRI restriction sites. Analysis of the DNA sequence of the construct was conducted by the DNA Minicore (Center for Cancer Research, NCI, National Institutes of Health). Verification of the sequencing data was performed using the following software: BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.0.5 and DNA Baser Sequence Assembler Version 2.91.

Site-directed Mutagenesis of the C1b Domain of PKC δ and the C1 Domain of Vav1—C1 domains consisted of a conserved 50–51-amino acid sequence possessing the characteristic cysteine-rich motif $\text{HX}_{12}\text{CX}_2\text{CX}_n\text{CX}_2\text{CX}_4\text{HX}_2\text{CX}_7\text{C}$, where H is histidine, C is cysteine, X is any other amino acid, and n is 13 or 14 (Fig. 2, *gray-shaded letters*) (11). To facilitate comparisons between C1 domains, we will refer to residues using numbering internal to the C1 domain itself, with the N-terminal histidine residue being labeled His¹. This residue corresponds to His⁵¹⁶ in full-length Vav1 and His²³¹ in the C1b domain of full-length PKC δ . Point mutations of the amino acid residues at positions 9, 10, 11, 22, 24, and 26 of both PKC δ C1b and Vav1 C1 were

introduced using the GeneTailor[™] site-directed mutagenesis system (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. To generate the C1 domain mutants of PKC δ and Vav1, the above mentioned wild-type C1 constructs (PKC δ and Vav1) in pGEX-5 \times -1 were used. Single, double, and triple mutations were introduced in one step, and quadruple and quintuple mutants were generated in a stepwise fashion using triple mutants as templates. The presence of mutations was verified by DNA sequencing (DNA Minicore) and analysis (BioEdit, DNA Baser).

Construction of GFP-labeled C1 Domains of PKC δ and Vav1—To generate GFP-tagged fluorescent fusion proteins for *in vivo* translocation studies, pGEX-5 \times -1 plasmids containing recombinant C1 domain sequences from either PKC δ or Vav1 were digested with EcoRI (New England Biolabs). The DNA fragments from this reaction were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Finally, the C1 fragments were ligated into the pEGFP-C2 vector (Clontech) using the EcoRI restriction sites, and the DNA sequences of the constructs were confirmed by sequence analysis (DNA Minicore).

Construction of Full-length Vav1 (Wild-type, Triple, and Quintuple Mutant) Fused to GFP—The GFP-tagged wild-type Vav1 was generated using the pENTR[™] Directional TOPO[®] cloning kit (Invitrogen), according to the instructions described in the manual. Briefly, PCR amplification of the appropriate full-length Vav1 sequence was first carried out using Platinum[®] PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen). The cDNA clone of Vav1 served as a template, and the following oligonucleotide primers were applied in the PCR: (i) forward primer 5'-CACCGAGCTCTGGCGACAGTGC-3' and (ii) reverse primer 5'-TCAGCAATATTCGGAATAGTCTTCC-3'. The PCR product was then TOPO-cloned into a pENTR[™]/D-TOPO[®] vector, which served as an Entry clone. Next, using the LR recombination reaction of the Gateway method (Invitrogen), we transferred the appropriate full-length Vav1 sequence from the Entry vector into a pcDNA-DEST53 Gateway[™] destination vector (Invitrogen), which encodes an N-terminal GFP tag. The triple (E9M/E10S/T11P) and the quintuple (E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) mutants of the full-length Vav1 were generated using the GeneTailor[™] site-directed mutagenesis system (Invitrogen) described above for the C1 domain mutants. The TOPO-Entry clone of the (full length) wild-type Vav1 served as a template for constructing the triple and quintuple mutants in a stepwise fashion. The mutated Entry clones were then subcloned into pcDNA-DEST53 using the above mentioned LR recombination reaction. The DNA sequences of the GFP-tagged full-length constructs were verified by sequence analysis (DNA Minicore).

Expression and Purification of GST-tagged C1 Domains from Escherichia coli—The C1 domains of both PKC δ and Vav1 in the pGEX-5 \times -1 plasmid were transformed into BL21-AI[™] One Shot[®] chemically competent *E. coli* (Invitrogen). Transformants were grown in LB broth medium (K-D Medical) at 37 °C until the optical density of the bacterial suspension reached 0.6–0.8. Expression of the GST fusion proteins was induced with 0.3 mM isopropyl *O*-D-thiogalactopyranoside and 0.125% L-arabinose (both from Sigma) for 4 h at 37 °C. Bacterial cells were subjected to sonication in B-PER[®] bacterial protein

C1 Domain of Vav1

extraction reagent, supplemented with 50 mg/ml lysozyme and 2500 units/ml DNase I (all from Pierce). The expressed GST-tagged C1 proteins were purified using a B-PER GST spin purification kit (Pierce) according to the manufacturer's instructions. Purification efficiency was evaluated by SDS-PAGE analysis. Protein concentration was assessed with the protein assay kit from Bio-Rad. Purified fusion proteins were stored in 30% glycerol at -80°C .

In Vitro (^3H)PDBu Assays—To assess the affinity of the different C1 domains (wild-type and mutant PKC δ and Vav1) to phorbol esters, purified proteins were subjected to an *in vitro* [^3H]PDBu binding assay, and the dissociation constants (K_d values) of the individual C1 domains were determined. Measurement of [^3H]PDBu binding, using the polyethylene glycol precipitation assay developed in our laboratory, was described in detail previously (37). Competitive binding assays were carried out to assess the affinities (K_i values) of DOG and DAG-lactones as described in detail elsewhere (38). Triton X-100, included in some of the assays, did not exceed 0.003%.

Translocation of GFP-labeled Proteins—LNCaP cells (between passage numbers 5 and 20) were plated at a density of 60,000 cells/plate on Ibidi dishes (Ibidi, LLC, Verona, WI) and subcultured at 37°C in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine. After 48 h in culture, cells were transfected with GFP-tagged recombinant constructs, using Lipofectamine reagent and Plus reagent (both from Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Cellular expression of fluorescent fusion proteins was examined 24 h after transfection on a Zeiss LSM 510 NLO confocal microscopy system (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY) with excitation from a 30-milliwatt argon laser tuned to 488 nm and emission collected with a BP 500–530 filter. Intracellular translocation of the GFP-labeled C1 domains upon PMA treatment was detected sequentially after the administration of the drug. Images were acquired every 30 s for 30 min at varying zoom settings (1 to 3.5) using Zeiss AIM software and a 63×1.4 NA Zeiss Plan-Apochromat oil immersion objective.

Quantitation of Confocal Images—Three regions of $4 \mu\text{m}^2$ each were selected in each cell as follows: one in the cytoplasm, one in the cell membrane, and one in the nucleus, avoiding to the degree possible the selection of subcellular organelles such as Golgi or the nucleoli. Mean intensities of the GFP-tagged constructs in the selected regions were calculated using the Zeiss AIM software for the images at the different time points; the ratio of the intensities for membrane/cytoplasm and nucleus/(membrane + cytoplasm) was then calculated and normalized to the time 0 values. The increase in the membrane/cytoplasm ratio and/or the decrease in the nucleus/(membrane + cytoplasm) ratio indicates translocation. For each series of images presented, the mean \pm S.E. of the maximal translocation for all of the replicate experiments for that assay condition is presented.

Chemistry—The DAG-lactone derivatives were synthesized according to previously published procedures (39). Melting points were determined on an MPA 100 OptiMelt automated melting point system (Stanford Research Systems) or a Mel-Temp II apparatus (Laboratory Devices, USA) and are uncorrected. Column chromatography was performed on a Teledyne

Isco CombiFlash Companion instrument under gradient elution conditions with RediSep disposable flash columns. Analytical TLC was performed on Analtech Uniplates silica gel GF. ^1H NMR spectra were recorded on a Varian Unity Inova instrument at 400 MHz. Spectra are referenced to the solvent in which they were run (7.24 ppm for CDCl_3). Positive ion fast atom bombardment mass spectra (FAB-MS) were obtained on a VG 7070E-HF double-focusing mass spectrometer operated at an accelerating voltage of 6 kV under the control of a MASPEC-II data system for Windows (Mass Spectrometry Services, Ltd.). Either glycerol or 3-nitrobenzyl alcohol was used as the sample matrix, and ionization was effected by a beam of xenon atoms generated in a saddle-field ion gun at 8.0 ± 0.5 kV. Nominal mass spectra were obtained at a resolution of 1200, and matrix-derived ions were background-subtracted during data system processing. Full experimental details and characterization have been reported previously for **6a**, **6c**, and **8b-e** (40). Full characterization of novel DAG-lactones designated as compounds **6b**, **8a**, and **8f** is described below. NMR spectra for these compounds can be found in the supplemental material.

(*E*)-2-(Hydroxymethyl)-4-((1-methyl-1H-indol-3-yl)methylene)-5-oxotetrahydrofuran-2-yl)-methyl 3-isobutyl-5-methylhexanoate (**6b**)— ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, Ar), 7.82 (dt, $J = 7.8, 0.9$ Hz, 1H, Ar), 7.38 to 7.24 (m, 4H, Ar and C = CH), 4.31 (Ab q, $J = 11.9$ Hz, 2H, CH_2), 3.85 (s, 3H, CH_3), 3.77 (AB q, $J = 12.1$ Hz, 2H, CH_2), 3.06 (dd, $J = 17.2, 2.7$ Hz, 1H, CH_{4a}), 2.84 (dd, $J = 17.1, 2.6$ Hz, 1H, CH_{4b}), 2.22 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_2 and OH), 1.90 (app sept, 1H, CH), 1.63 to 1.48 (m, 2H, $2 \times \text{CH}$), 1.17 to 0.96 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 0.83 (dd, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 0.82 (dd, $J = 6.6$ Hz, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), and 0.78 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3); FAB-MS (m/z , relative intensity) 456 (MH^+ , 97), 455 (M^+ , 100).

(*E*)-4-((5-(Hydroxymethyl)-2-oxo-5-((2-propyl-pentanoyloxy)methyl)dihydrofuran-3(2H)-ylidene)methyl)-1-propylpyridinium Bromide (**8a**)— ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.88 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, Ar), 8.16 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, Ar), 7.66 (s, 1H, C = CH), 4.74 to 4.56 (m, 2H, CH_2), 4.33 (s, 2H, CH_2), 3.94 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, H_{4a}), 3.92 (AB q, $J = 15.8$ Hz, 2H, CH_2), 3.73 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, H_{4b}), 2.56 (v br s, 1H, OH), 2.34 (tt, $J = 8.8, 5.4$ Hz, 1H, CH), 2.02 (heptet, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 1.60 to 1.46 (m, 2H, CH_2), 1.43 to 1.32 (m, 2H, CH_2), 1.23 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 0.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3), 0.86 (td, $J = 7.3, 1.6$ Hz, 6H, $2 \times \text{CH}_3$); FAB-MS (m/z , relative intensity) 404 (M^+ , 100).

(*E*)-3-((5-(Hydroxymethyl)-5-((3-isobutyl-5-methylhexanoyloxy)methyl)-2-oxodihydro-furan-3(2H)-ylidene)methyl)-1-pentyl-pyridinium Bromide (**8f**)—MP was $142-143^{\circ}\text{C}$. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.76 (s, 1H, Ar), 8.77 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, Ar), 8.72 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, Ar), 8.08 (irr t, 1H, Ar), 7.39 (s, 1H, C = CH), 4.89 (br s, 2H, CH_2), 4.19 (AB q, $J = 12.3$ Hz, 2H, CH_2), 3.73 (AB q, $J = 12.3$ Hz, 2H, CH_2), 2.88 (dd, $J = 18.6, 2.4$ Hz, 2H, H_{4ab}), 2.19 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2), 2.04 (br s, 2H, CH_2), 1.88 (irr sept, 1H, CH), 1.55 (sept, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH), 1.38 to 1.35 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.15 - 0.94 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 0.92 to 0.75 (m, 15H, $5 \times \text{CH}_3$); FAB-MS (m/z , relative intensity) 474 (M^+ , 100).

Molecular Modeling—Structures for the single- and multiple site mutants of the Vav1 and PKC δ C1 domains were built by replacing residues while keeping their side chain χ angles as

close as possible to the conformation in the other structure. For example, in the Vav1 crystal structure (15), residue Glu⁹ has the conformation $\chi_1 = -74.7$, $\chi_2 = 166.2$, and $\chi_3 = 103.1$. When the M9E mutant of PKC δ was built, the Glu residue was rotated into the same conformation. In almost all cases, this conformation fit well into the structure, and the only exception was the P11T mutation in PKC δ , which required an adjustment of Leu²⁰ and Phe¹³ to accommodate the threonine methyl group. This construction method allowed the structure of the mutated Vav1 C1 domain to be as similar as possible to the PKC δ C1b domain and vice versa.

Docking of phorbol and the DAG-lactones was performed using the software program GOLD Version 5.0 (41). The structure of phorbol 13-acetate was extracted from its co-crystal with the PKC δ C1b domain (7), and the C1 domain of Vav1 (15) was clipped from the larger structure. Hydrogens were added to both protein and ligands. The binding site was defined by atoms within a 10.0-Å sphere around the Ne atom of residue Gln²⁷ (Gln⁵⁴²(B) in the full-length structure). Ligand flexibility flags included internal hydrogen bond detection and ring corner flipping, and the default torsion angle distributions were used. The GoldScore scoring function was used with the default parameter file. The genetic algorithm settings were automatically optimized according to ligand flexibility with the search efficiency set to 100%.

After docking, the structures of the DAG-lactone-triple mutant PKC δ complexes were subjected to conformational searching using MacroModel (42) to identify low energy conformers for the charged ligand and protein side chains. The searches used 50 steps of systematic torsional sampling for each rotatable bond in the DAG-lactone *sn*-1 and *sn*-2 side chains, and in the side chains of residues Glu⁹, Glu¹⁰, and Thr¹¹ in the mutated C1 domain. Minimization of each conformer found was done using the OPLS 2005 forcefield with octanol implicit solvent. All atoms in the DAG-lactone and residues 9–13, 20–24, and 27 in the binding site were free to move during minimization and the rest of the protein was held fixed.

Lipophilicity analysis was performed using the software program VASCo (43). The molecular lipophilicity potential over the surface of the protein was calculated in the following way. First, an atomic logP value was assigned to each atom. The atomic logP (AlogP) values used were those from Ghose *et al.* (44), although the dictionary provided with the VASCo program was modified to use the ionized forms of Asp, Glu, Arg, and Lys. Next, the solvent-excluded surface was constructed using MSMS (45), which yielded a set of surface vertices and triangles. Finally, the lipophilicity of each surface point was calculated using a Fermi-type distance function to map and smooth the logP value of nearby underlying atoms onto the surface, according to the formulation of Heiden *et al.* (46) for large molecules. The overall molecular lipophilicity potential (MLP) of the binding site area was calculated as the sum of the surface point lipophilicities for those points whose closest underlying atom lies on the solvent-accessible surface of the C1 domain in the region that inserts into the membrane and interacts with phorbol (7). This included the following atoms: residue 8, atoms O and C α ; residue 9, all atoms; residue 10, all atoms; residue 11, all atoms; residue 12, atoms N and C α ; resi-

due 20, all atoms; residue 21, atom O; residue 22, atoms O, C α , C β , C γ , and C δ ; residue 23, all atoms; residue 24, all atoms; and residue 27, atoms C γ , C δ , and Ne.

RESULTS

Isolated C1 Domain of Vav1 Does Not Bind Phorbol Esters, Despite Conservation of the Appropriate Geometry of the Binding Pocket—The striking structural resemblance between the binding cleft of Vav1 C1 and that of PKC δ C1b, as revealed by recent x-ray crystallographic data (15), suggests the potential for preserved DAG/phorbol ester responsiveness of Vav1 (Fig. 1B). To confirm the ability of the Vav1 C1 domain binding site to accommodate phorbol ester, we extracted the phorbol 13-acetate ligand from the crystal structure of PKC δ C1b (7) and docked it into the isolated C1 domain from the highest resolution Vav1 crystal structure (15). As expected based on the structural overlay of the binding sites, phorbol ester is predicted to be able to bind to the Vav1 C1 domain with essentially the same binding mode as in the PKC δ C1b domain (Fig. 1, C and D). The binding site residues that form direct hydrogen bonding interactions with phorbol are identical between the two C1 domains, and the pattern of intra- and intermolecular hydrogen bonds formed by bound phorbol is preserved.

In contrast to this structural analysis and modeling, however, Vav1 has been shown experimentally not to interact with DAG or phorbol esters (18). One explanation for this apparent discrepancy could be that the C1 domain is located in the core of the Vav1 structure (rather than being exposed on the surface), and other structural domains prevent the access of ligands to the binding cleft. Examples of such masking of C1 domains, although in both instances not sufficient to fully block binding, are β 2-chimerin (47) and PKC β (48).

To test the possibility that the C1 domain is simply masked, we first cloned the isolated Vav1 C1 domain into a pGEX bacterial plasmid (Clontech) encoding a C-terminal GST tag and assessed the binding properties of the recombinant protein in an *in vitro* [³H]PDBu binding assay. Compared with the GST-tagged PKC δ C1b (δ C1b), a high affinity phorbol ester receptor that served as a positive control in these experiments, the Vav1 C1 showed no evidence for [³H]PDBu binding even at very high (~1–2 μ M) receptor concentration (data not shown) under these conditions.

Because misfolding of the purified protein from a bacterial expression system could be a reason for the absence of phorbol ester binding *in vitro*, we examined the phorbol ester responsiveness of the Vav1 C1 in the intracellular environment after eukaryotic expression. Phorbol ester causes the translocation of typical C1 domains to cellular membranes. We expressed a GFP-tagged Vav1 C1 in LNCaP cells, treated with phorbol ester, and looked for subcellular redistribution using real time confocal microscopy. The GFP-tagged C1b domain of PKC δ (δ C1b-GFP) served as control, whose translocation dynamics had previously been extensively characterized by our laboratory (13, 49). After the administration of 1 μ M PMA, δ C1b-GFP showed a rapid but transient translocation into the cellular membrane, which was followed by translocation into the nuclear membrane (Fig. 5A). In contrast, PMA treatment failed to induce appreciable intracellular redistribution of Vav1

C1 Domain of Vav1

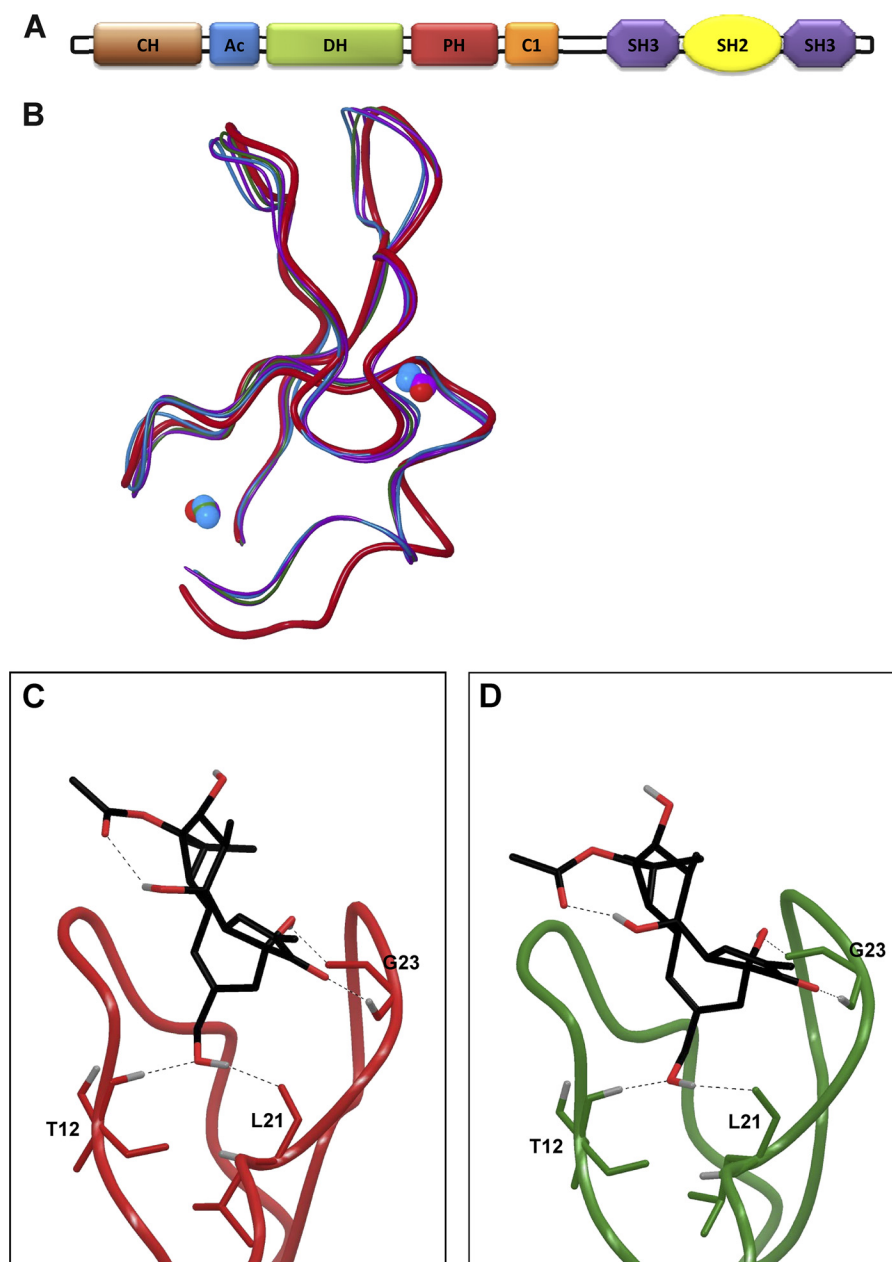


FIGURE 1. *A*, domain structure of the full-length Vav1. *B*, overlaid backbone structures of the C1 domain from PKC δ C1b in red (1PTR (7)), compared with the available structures for Vav1 in green (2VRW) (15), blue (3KY9) (14), and purple (3BJI) (16). The 3KY9 and 3BJI structures are both crystallographic dimers containing two copies of the C1 domain. Zinc atoms are rendered as CPK spheres. The backbone atoms of residues 231–274 in PKC δ are aligned to residues 516–559 in Vav1. The root mean square difference in these aligned atoms is ~ 0.5 Å between the Vav1 structures and PKC δ , and the root mean square difference in their full C1 domain backbones is ~ 1.4 Å. The C1 domains of PKC δ and Vav1 differ in the tilt angle of the small C-terminal helix, but the phorbol/DAG-binding sites remain essentially identical, with the same spacing between the loops forming the sides of the site, although the position of the loops relative to the rest of the domain may be shifted slightly. *C* and *D*, docking of phorbol 13-acetate into the binding cleft of δ C1b and that of Vav1 C1. *C*, binding mode of phorbol 13-acetate as observed in the PKC δ C1b crystal structure (7). *D*, docked position of phorbol 13-acetate in the binding site of Vav1 (15). Hydrogen bonds are indicated by dashed lines.

C1-GFP, in agreement with the *in vitro* phorbol ester binding assays (Fig. 5*B*).

Multiple reports suggest that C1 domains may show somewhat differential recognition of the endogenous ligand, *sn*-1,2-diacylglycerol, relative to phorbol ester (49–51). We therefore examined the ability of dioctanoylglycerol to induce translocation of the GFP-tagged PKC δ C1b and Vav C1 domains (Fig. 5*C*). Clear translocation of the PKC δ C1b domain was observed at 100 μ M DOG, as expected (52, 53). In contrast, no significant translocation of the Vav C1 domain was observed. These results

suggest that the Vav C1 domain is unresponsive either to phorbol ester or to diacylglycerol.

Sequence Alignment of Vav1 C1 with Phorbol-responsive (Typical) C1 Domains Reveals Unique Residues around the Binding Pocket—Because the Vav1 C1 domain fails to bind phorbol esters despite preservation of the binding cleft geometry, a plausible explanation is that individual residues situated along the rim of the binding pocket or in close proximity to it may interfere with ligand-receptor interactions by impeding contacts between the C1 domain and the membrane lipids,

			1	10	20	30	40	50	Uniprot ID	
	C1 motif		HXXXXXXXXXXXXXX	CXX	CXXXXXXXX	-XXXXXXXX	CXX	CXXXXHXX	CXXXXXXXX	
Vav1	hVav1 C1	516	HDFQMFSE	ETT	SKACKQMLLRG	-TFY	QGYRCHR	CRASAHKE	CLGRVP-PC	564 P15498
	mVav1 C1	516	HDFQMFSE	ETT	SKACKQMLLRG	-TFY	QGYRCYRC	CRAPAHKE	CLGRVP-PC	564 P27870
PKC	cPKC α C1a	37	HKFIARFFK	QPTFC	SHCTDFIWG	-FGK	QGFQCQV	CCFVVHKR	CHEFTVFSC	86 P17252
	cPKC β I C1a	37	HKFTARFFK	QPTFC	SHCTDFIWG	-FGK	QGFQCQV	CCFVVHKR	CHEFTVFSC	86 P05771-1
	cPKC β II C1a	37	HKFTARFFK	QPTFC	SHCTDFIWG	-FGK	QGFQCQV	CCFVVHKR	CHEFTVFSC	86 P05771-2
	cPKC γ C1a	36	HKFTARFFK	QPTFC	SHCTDFIWG	-L	GKQGLQCQV	CSFVVHRC	CHEFTVFEC	85 P05129
	nPKC δ C1a	159	HEFIATFFG	QPTFC	SVCKDFVWG	-LNK	QGYKCRQ	CNAAIHKK	CIDKIIGRC	208 Q05655
	nPKC ϵ C1a	170	HKFMATYLR	QPTYC	SHCRDFIWG	-V	GKQGYQCQV	CTCVVHKR	CHHLIITKC	220 Q02156
	nPKC η C1a	172	HKFMATYLR	QPTYC	SHCRDFIWG	-V	GKQGYQCQV	CTCVVHKR	CHHLIITAC	222 P24723
	nPKC θ C1a	160	HEFTATFFP	QPTFC	SVCFEIVWG	-LNK	QGYQCRQ	CNAAIHKK	CIDKVIAC	209 Q04759
	cPKC α C1b	102	HKFKIHTY	SSPTFC	DHCGSLLYG	-LI	HQGMKCDT	CDMNVHKR	QCVINVPSLC	151 P17252
	cPKC β I C1b	102	HKFKIHTY	SSPTFC	DHCGSLLYG	-LI	HQGMKCDT	CMMNVHKR	CVMNVPSLC	151 P05771-1
	cPKC β II C1b	102	HKFKIHTY	SSPTFC	DHCGSLLYG	-LI	HQGMKCDT	CMMNVHKR	CVMNVPSLC	151 P05771-2
	cPKC γ C1b	101	HKFRLHSY	SSPTFC	DHCGSLLYG	-LV	HQGMKCS	CCEMNVHRC	CVRSVPSLC	150 P05129
nPKC δ C1b	231	HRFKVHNY	MSPTFC	DHCGSLLWG	-LV	QGLKCED	CGMNVHRC	CREKVANLC	280 Q05655	
nPKC ϵ C1b	243	HKFGIHNY	KVPTFC	DHCGSLLWG	-LL	RQGLQCKV	CKMNVHRC	ETNVAPNC	292 Q02156	
nPKC η C1b	246	HKFSIHNY	KVPTFC	DHCGSLLWG	-IM	RQGLQCKI	CKMNVHRC	QANVAPNC	295 P24723	
nPKC θ C1b	232	HRFKVYNY	KSPPTFC	CEHCGTLLWG	-L	ARQGLKCD	ACGMNVHRC	QTKVANLC	281 Q04759	
MRCK	MRCK α	1013	HQFFVKSFT	TPTK	CHQCTSLMVG	-LIR	QGCSEV	CGFSC	HITCVNKAPTTC	1062 Q5VT25
	MRCK β	1026	HQFSIKSFS	SPPTQ	CSHCTSLMVG	-LIR	QYACEV	CSFACHV	SCCKDQAPQVC	1075 Q9Y5S2
	MRCK γ	879	HTLRPRSFP	SPPTK	CLRCTSLMVG	-LGR	QGLGCD	ACGYFCH	TTCAPQAP-PC	927 Q6DT37
DAG kinase	DGK β C1a	245	HVWRLKHF	NKPAY	CNLCLNMLIG	-VGK	QGLCCS	FCKYTV	HERCVARAPPSC	294 Q9Y6T7
	DGK γ C1a	272	HAWTMKHF	NKPTY	CNFC	HIMLMG	-VRK	QGLCCT	YCKYTVHERCVSRNIPGC	321 P49619
Munc-13	Munc13-1	554	HNFEVWTAT	TPTYCYE	CEGLLWG	-IAR	QGMRC	TECGVK	HEKQDLLNADC	603 Q9UPW8
	Munc13-2	478	HNFEVWTAT	TPTYCYE	CEGLLWG	-IAR	QGMRC	SECGVK	HEKQDLLNADC	527 O14795
	Munc13-3	1098	HNFEVWTAT	TPTYCYE	CEGLLWG	-IAR	QGMK	LECGVK	HEKQDLLNADC	1147 Q8NB66
RasGRP	RasGRP-1	542	HNFEVWTAT	TPTYCYE	CEGLLWG	-IAR	QGMRC	TECGVK	HEKQDLLNADC	603 Q9UPW8
	RasGRP-3	495	HNFEVWTAT	TPTYCYE	CEGLLWG	-IAR	QGMRC	TECGVK	HEKQDLLNADC	603 Q9UPW8
	RasGRP-4	541	HTFHEVTFR	KPTFC	DCSCSGLFWG	-VT	KQGYRC	REGLCC	HKHCRDQVKEC	590 Q8TDF6
Chimaerins	α 1-chimaerin	81	HNFKVHTFR	GPHWCEY	CANFMWG	-LIA	QGVK	CADG	GLNVHKQCSKMPVND	130 P15882-2
	α 2-chimaerin	206	HNFKVHTFR	GPHWCEY	CANFMWG	-LIA	QGVK	CADG	GLNVHKQCSKMPVND	255 P15882-1
	β 1-chimaerin	79	HNFKVHTFR	GPHWCEY	CANFMWG	-LIA	QGVRC	SDCGLNV	HKQCSKHPVND	128 P52757-2
	β 2-chimaerin	215	HNFKVHTFR	GPHWCEY	CANFMWG	-LIA	QGVRC	SDCGLNV	HKQCSKHPVND	264 P52757-1
PKD	PKD1 C1a	147	HALFVHSYR	APAFCD	HCGEMLWG	-LVR	QGLKCE	GGLNYHKR	CAFKIPNNC	196 Q15139
	PKD2 C1a	139	HALTVHSYR	APAFCD	HCGEMLWG	-LVR	QGLKCE	GGLNYHKR	CAFKIPNNC	188 Q9BZL6
	PKD3 C1a	155	HTLYVHSYK	APTFC	DYCGEMLWG	-LVR	QGLKCE	GGLNYHKR	CAFKIPNNC	204 O94806
	PKD1 C1b	271	HTFVIHSY	TRPTVC	QYCKLLK	G-LFR	QGLQCKD	CRFNCHKR	CAPKVPNNC	320 Q15139
	PKD2 C1b	265	HTFLIHSY	TRPTVC	QACKLLK	G-LFR	QGLQCKD	CKFNCHKR	CATVPNNC	314 Q9BZL6
	PKD3 C1b	272	HTFAVHSY	TRPTIC	QYCKRLLK	G-LFR	QGMQCKD	CKFNCHKR	CASKVPRDC	321 O94806

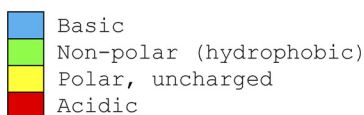


FIGURE 2. Amino acid sequence alignment of the atypical C1 domain of Vav1 with all the members of the typical C1 domain-containing protein superfamily (human). The positions in the C1 domains that were identified to be unique for the Vav1 structure are highlighted in color. The individual residues are categorized into four different groups based on their chemical properties: nonpolar (hydrophobic), polar uncharged, basic, and acidic. The color code is depicted in the panel below the sequences. The C1 consensus sequence is highlighted in gray.

thereby disrupting the ternary binding complex, or by occluding the binding site. This situation would thus be analogous to that of the atypical C1 domains of the aPKCs (13).

C1 domains consist of a conserved 50–51-amino acid sequence possessing the characteristic cysteine-rich motif $HX_{12}CX_2CX_nCX_2CX_4HX_2CX_7C$, where H is histidine, C is cysteine, X is any other amino acid, and n is 13 or 14 (Fig. 2, gray-shaded letters) (11). (In the text below, we will refer to residues using numbering internal to the C1 domain itself, to facilitate

comparisons between C1 domains from different proteins. For example, the N-terminal histidine residue would be labeled His¹. This residue corresponds to His⁵¹⁶ in full-length Vav1 and His²³¹ in the C1b domain of full-length PKC δ .) A comprehensive sequence alignment of the atypical Vav1 C1 versus typical C1 domains highlighted several unique residues in the Vav1 C1 structure (Fig. 2). Six of these unique amino acids (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Arg²², Thr²⁴, and Tyr²⁶) are located at or close to the tip of the apparent binding cleft (see Fig. 3).

C1 Domain of Vav1

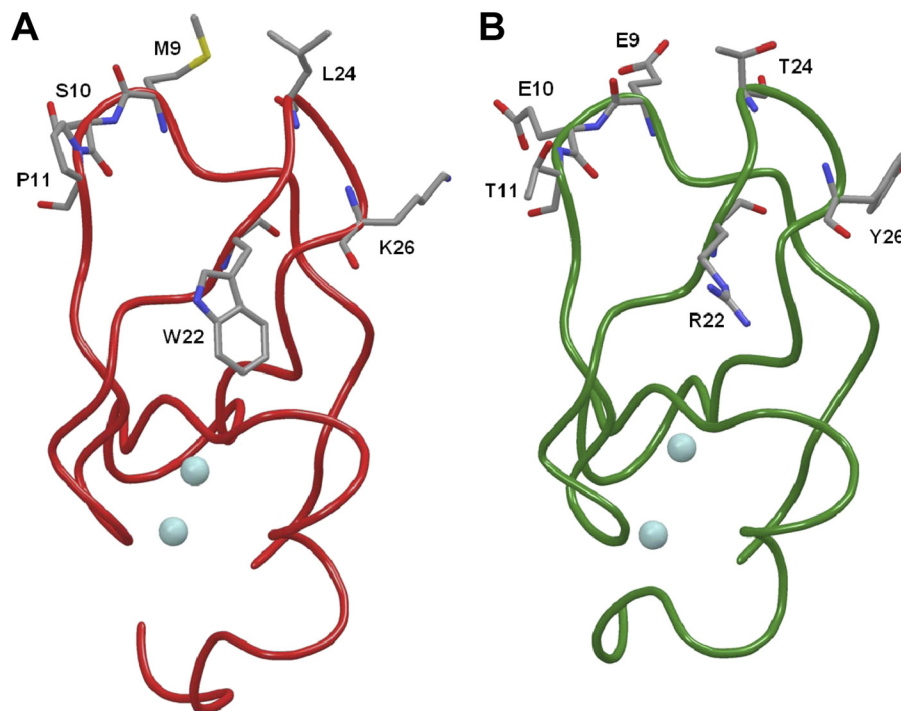


FIGURE 3. **Locations of the mutated residues in the C1 domains.** The locations of the residues subjected to mutation (A) in the PKC δ C1b domain (7) along the two loops forming the phorbol-binding site and the corresponding residues (B) in the Vav1 C1 domain (15) are shown.

Numerous studies indicate that hydrophobic residues exposed to the surface along the rim of the binding pocket of δ C1b (at the tips of both loops forming the cleft: residues 9–12 in the N-terminal loop and 21–24 in the C-terminal loop) facilitate the insertion of the top third of the binding pocket into the membrane after ligand binding thereby stabilizing the formation of the ternary (ligand-receptor-membrane) binding complex (12, 54). The N-terminal loop of the binding pocket in Vav1 C1 contains two negatively charged Glu residues (Glu⁹ and Glu¹⁰) at the tip of the cleft. Although there is a moderate variability at these positions among typical C1 domains (see Fig. 2), acidic residues are not present in any of these sequences. In addition, the presence of Pro at position 11 is highly conserved among phorbol-binding proteins (Fig. 2), although the experimental evidence is not unambiguous regarding the role of Pro¹¹ on binding potency (13, 55, 56). The C-terminal loop of the binding cleft (residues 20–27) contains three unique amino acids (Arg²², Thr²⁴, and Tyr²⁶). With the exception of the C1b domains of protein kinase D isoforms, virtually all typical C1 domains contain highly lipophilic residues at the first two of these positions (positions 22 and 24) (Fig. 3), and the important role of Trp²² and Leu²⁴ in the DAG/phorbol ester sensitivity of PKC δ has been well documented (7, 38, 56, 57). The third candidate in the C-terminal loop for disrupting the phorbol ester sensitivity of Vav1 C1 is Tyr²⁶. Almost every phorbol-sensitive C1 domain has a positively charged residue at this position (Arg²⁶, Lys²⁶, or His²⁶; see Fig. 2). According to the three-dimensional structure of δ C1b, positively charged residues are exposed in the middle third of the C1 domain (“underneath” the top third of the cleft that is buried in the membrane) and interact with anionic phospholipid head groups (e.g. phosphatidylserine) in the membrane, thereby further strengthening the C1

domain-membrane interaction (7). Among the basic residues of δ C1b, Lys²⁶ is situated with closest proximity to the apex of the binding pocket (Fig. 3); therefore, it is a good candidate for such interactions between the C1 domain and acidic phospholipids. Tyr²⁶ in Vav1 C1, being a noncharged residue, would have a reduced capacity to interact with acidic phospholipids.

Characterization of the Phorbol Ester Sensitivity of PKC δ C1b Mutants Possessing Vav1-C1-like Mutations

Single Site δ C1b Mutants Demonstrated Only Moderate Decreases in the Binding Affinity for PDBu in Vitro—To determine the possible effect of the above unique residues on the ligand sensitivity of Vav1 C1, our initial approach was to use the C1b domain of PKC δ as a template and to mutate individual residues to the corresponding residues of Vav1-C1 at these positions (site 9, 10, 11, 22, 24, and 26). We first generated six single site C1b mutants fused to GST and determined their apparent [³H]PDBu binding affinities (Table 1). Five out of six single site mutations (M9E/S10E/P11T/L24T/K26Y) caused a moderate decrease in the binding affinity of δ C1b for [³H]PDBu, whereas the W22R mutation had no effect on its potency for the ligand.

Replacement of the highly hydrophobic Met⁹ residue with a negatively charged hydrophilic Glu⁹ resulted in an 11-fold reduction in the binding affinity for [³H]PDBu ($K_d = 2.11 \pm 0.11$ nM). The introduction of Glu¹⁰ to replace the polar but uncharged Ser¹⁰ caused a 9.2-fold loss of measurable binding ($K_d = 1.77 \pm 0.06$ nM), comparable with that of the previous mutation. These results suggest that, although the presence of an acidic residue at these sites decreases the binding potency by 1 order of magnitude, it does not abrogate the interactions

TABLE 1***In vitro* binding affinities of [³H]PDBu for WT δ C1b and the single and multiple site δ C1b mutants**

Individual C1 domains were fused with GST and expressed in a bacterial system and isolated, and the binding of [³H]PDBu to the individual C1 domains was measured. Values represent the mean \pm S.E. ($n = 3$ independent experiments). NA means no activity.

Receptor (PKC δ C1b)	K_d	Relative to WT
Wild type	0.193 \pm 0.005	1 \times
Single mutants		
M9E	2.11 \pm 0.11	10.9 \times
S10E	1.77 \pm 0.06	9.1 \times
P11T	1.76 \pm 0.21	9.1 \times
W22R	0.16 \pm 0.02	0.8 \times
L24T	2.63 \pm 0.15	13.6 \times
K26Y	0.97 \pm 0.10	5.0 \times
Multiple mutants		
M9E/S10E	50.5 \pm 2.1	261 \times
M9E/S10E/P11T	186.1 \pm 6.0	963 \times
L24T/K26Y	96 \pm 18	499 \times
M9E/S10E/P11T/ L24T/K26Y	NA	NA

within the ternary binding complex, because both the M9E and S10E mutants still retain a considerable potency for [³H]PDBu.

The P11T mutant showed a 9.1-fold weaker affinity for [³H]PDBu ($K_d = 1.76 \pm 0.21$ nM) compared with the wild-type δ C1b. Although the replacement of the nonpolar Pro residue with a polar Thr decreased the binding affinity (to the same degree as the glutamate mutations M9E and S10E), the relatively high residual potency of the P11T mutant argues that a threonine residue at this site is compatible with a significantly high level of phorbol ester affinity. This result is in good agreement with previous studies, which demonstrated that the replacement of Pro¹¹ with arginine caused only a weak (4.4-fold) reduction in the binding potency of δ C1b for [³H]PDBu (13), comparable with the results obtained with the P11T mutant in this study.

The mutation at Trp²² had no effect on the phorbol ester binding of δ C1b. The K_d value of the W22R mutant (0.16 \pm 0.02 nM) remained essentially on the same level as that of the wild-type δ C1b (0.193 \pm 0.005 nM). This result agrees with our previous findings, which showed only a very weak reduction in the phorbol ester binding potency of δ C1b after the introduction of Lys into this site (38). Therefore, we can conclude that, although almost every typical C1 domain (with the exception of some PKD isoforms) conserves a hydrophobic residue at site 22, the presence of positively charged residues at this site generally seems to be fully compatible with a high level of binding affinity, at least for phorbol esters. In contrast with the results for PDBu binding, binding of DAG has been described as being highly dependent on the presence of Trp²² (38, 57, 58).

Mutations at Leu²⁴ (L24T) and Lys²⁶ (K26Y) caused a similar decrease in binding affinity as did the other consequential mutations. Although our sequence alignment found that a polar residue (like Thr²⁴) essentially never occurs at position 24 for typical C1 domains (suggesting a crucial structural role for nonpolar residues), the influence of a polar residue at position 24 is thus apparently limited. Likewise, whereas the presence of a basic residue at site 26 is an almost uniform characteristic of typical C1 domains (with chimaerins being the sole exceptions),

mutating the Lys²⁶ of δ C1b to a noncharged Tyr residue (to correspond to Vav1 C1) had only a modest effect.

We conclude that none of the unique residues (identified by our sequence alignment) in the Vav1 C1 structure by itself account for the lack of phorbol ester affinity. Rather, our results suggest that the loss of binding reflects the cumulative effect of multiple changes, each with more modest effect.

Combination of the Five Vav1-like Mutations in δ C1b Resulted in a Dramatic Reduction in the Binding Affinity for PDBu in Vitro—To explore the combined effect of the above mutations on ligand sensitivity, we generated double, triple, and quintuple δ C1b mutants (see Table 1) that contained multiple Vav1 C1-like residues in the same construct. Because the single site mutation at Trp²² had no effect on the binding affinity of δ C1b for phorbol esters, we omitted this mutation from further study. As shown in Table 1, the double mutations at the apex of both loops of the binding cleft caused a considerable loss of binding affinity, with the L24T/K26Y mutant (C-terminal loop) showing a somewhat more pronounced reduction in its binding potency compared with that of the M9E/S10E mutant at the N-terminal loop. Except in the case of mutants including P11T, the reductions in binding affinities of the combined mutants were greater than the product of the reductions of the individual mutants. These results argue that the combined effect of multiple mutations on the binding affinity cannot be readily predicted based merely on the affinity results of single site mutants. Finally, the combined introduction of all five mutations (M9E/S10E/P11T/L24T/K26Y) into δ C1b abolished detectable binding affinity. Under our *in vitro* assay conditions, this would imply a decrease of more than 5 orders of magnitude in binding potency (*i.e.* the mutated δ C1b would not be able to bind [³H]PDBu in the 10 μ M range).

We conclude that the five unique residues Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Thr²⁴, and Tyr²⁶ in the binding pocket of Vav1 are together sufficient to account for the lack of detectable phorbol ester binding activity by the Vav1 C1 domain. Studies described below will address the question of whether other residues in the Vav1 C1 domain further contribute to the lack of measurable phorbol ester binding.

The translocation experiments had provided no support for the suggestion that the Vav1 C1 domain could respond to diacylglycerol, despite its lack of response to phorbol ester. Although we could not measure binding of diacylglycerol to the Vav1 C1 domain directly, we could approach this question by examining the binding of DOG to several of our multiple site δ C1b mutants that still retained some affinity for phorbol ester. The multiple site δ C1b mutants in fact showed substantially decreased affinities for DOG, although the decreases in affinity were somewhat less than seen for [³H]PDBu (Table 2).

Five Vav1-like Mutations in δ C1b Modestly Influence the Phospholipid Selectivity of the C1 Domain—As described above, the five unique residues would be predicted to influence the interaction of the C1 domain with the phospholipid bilayer. For example, Sossin and co-workers (53) described a role for positively charged residues at positions 9, 10, and 26 of PKC Apl II from *Aplysia* in the recognition of phosphatidylserine and phosphatidic acid. We therefore examined the binding of [³H]PDBu to wild-type PKC δ C1b and the double mutants

C1 Domain of Vav1

TABLE 2

***In vitro* binding affinities of DOG for WT δ C1b and multiple site δ C1b mutants**

Individual C1 domains were fused with GST and expressed in a bacterial system and isolated, and the binding of DOG to the individual C1 domains was measured by competition with [³H]PDBu. Values represent the mean \pm S.E. ($n = 3$ independent experiments).

Receptor (PKC δ C1b)	K_i	Relative to WT
	<i>HM</i>	
Wild type	22.3 \pm 1.6	1 \times
M9E/S10E	1337 \pm 247	60 \times
M9E/S10E/P11T	11,700 \pm 3800	524 \times
L24T/K26Y	3870 \pm 810	174 \times

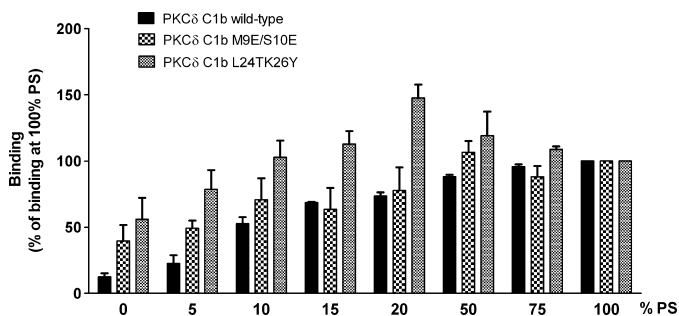


FIGURE 4. Binding of [³H]PDBu to wild-type δ C1b and the double mutants δ C1b M9E/S10E and δ C1b L24T/K26Y was measured in the presence of phospholipid mixtures of PS/PC in the indicated proportions at 100 μ g/ml of total phospholipid. Values were expressed relative to binding in the presence of 100% PS. Data are the mean of triplicate experiments. Bars, \pm S.E.

TABLE 3

***In vitro* binding affinities of [³H]PDBu for WT δ C1b and multiple site δ C1b mutants**

Binding of [³H]PDBu was measured in the presence of a phospholipid mixture of 5% PS, 95% PC (100 μ g/ml total phospholipid). Values represent the mean \pm S.E. ($n = 3$ independent experiments).

Receptor (PKC δ C1b)	K_i
	<i>HM</i>
Wild-type δ C1b	1.51 \pm 0.25
δ C1b M9E/S10E	180 \pm 30
δ C1b L24T/K26Y	360 \pm 140

M9E/S10E and L24T/K26Y in the presence of PS/PC phospholipid mixtures with 100 μ g/ml total lipid and variable proportions of PS (Fig. 4). Both pairs of mutations reduced the dependence on phosphatidylserine for [³H]PDBu binding, as was most evident in lipid mixtures of 0–5% PS. In addition, the L24T/K26Y double mutant showed optimal binding at 20% PS, whereas the δ C1b domain and the M9E/S10E double mutant bound best at 50–100% PS.

To better explore the basis for this difference in lipid selectivity, we determined the binding affinities for [³H]PDBu of δ C1b and the two double mutants in the 5:95 PS/PC lipid mixture. All three C1 domain showed reduced affinity but the loss of affinity was modestly greater in the case of the δ C1b wild-type (Table 3). We conclude that the mutations causing the δ C1b to more resemble Vav1 indeed influenced its lipid recognition. The change in lipid environment did not increase the binding affinity, however, arguing that the specific phospholipid composition was not responsible for the lack of the binding of the Vav1 C1 domain *in vitro*.

As a further control, we examined the ability of the wild-type Vav1 C1 domain to bind [³H]PDBu in the presence of the 5:95

PS/PC lipid mixture. The experiments again failed to reveal binding of appreciable affinity, although under our conditions we cannot exclude affinities in the millimolar range (data not shown).

In Vivo Membrane Translocation Kinetics of GFP-tagged Multiple Site Mutants of δ C1b Mirror Their Binding Activities Measured in Vitro—To explore how these mutations affect the phorbol ester response of δ C1b in the intracellular environment, we investigated the plasma membrane translocation dynamics of the GFP-tagged δ C1b mutants in LNCaP cells after the administration of various concentrations (0.1–10 μ M) of PMA. Representative images for selected experiments are illustrated, but we also include quantitation for the multiple replicates under each experimental condition. In response to 1 μ M PMA, the WT δ C1b translocated rapidly to the plasma membrane, with loss from both the cytosol and nucleus (Fig. 5A). The redistribution of the signal from the cytosol into the plasma membrane was complete within 5–7 min after the application of PMA (data not shown), whereas the nuclear redistribution culminated after 10–15 min. Subsequently, the fluorescent signal began to return to the cytosol within 15–20 min and was clearly detectable at 30 min. The translocation dynamics of the wild-type molecule showed a clear dependence on the concentration of PMA. Reducing the concentration to 0.1 μ M delayed the rapidity of translocation. Fig. 5A shows weak signs of plasma membrane translocation at 2–5 min, which became complete only after 15 min (in clear contrast to the 1 μ M PMA treatment). However, increasing the concentration of the PMA treatment accelerated the translocation process. A very rapid and complete plasma membrane translocation of the WT δ C1b with 10 μ M PMA is visible within 2 min after activation, along with signs of nuclear membrane translocation (data not shown). Moreover, the return of the fluorescent signal into the cytosol began earlier than for the 1 μ M treatment (at 10–15 min). The results obtained with the δ C1b demonstrate that the translocation pattern was indicative of the concentration of PMA in this concentration range. Likewise, the δ C1b domain translocated quickly after addition of DOG (100 μ M) mainly to internal membranes with some plasma membrane translocation (Fig. 5B).

The double mutant M9E/S10E, which displayed a 260-fold reduction of potency compared with the wild-type δ C1b in the above *in vitro* experiments, showed a much weaker response to 0.1 and 1 μ M PMA (Fig. 5A and data not shown for 0.1 μ M PMA). Increasing the concentration of the PMA to 10 μ M resulted in a much faster response of M9E/S10E (Fig. 5A), similar in pattern to that obtained with the wild-type form after the application of 0.1 μ M PMA as follows: (a) signs of plasma membrane translocation detected as early as 2 min; (b) more pronounced although incomplete translocation into the plasma membrane at later time points; and (c) redistribution of M9E/S10E from the nucleus within 20–30 min. The other double mutant (L24T/K26Y) displayed a very similar translocation pattern to M9E/S10E in response to PMA treatment. These results are consistent with the 260-fold (for M9E/S10E) and 498-fold (for L24T/K26Y) reductions in potency compared with WT δ C1b *in vitro*.

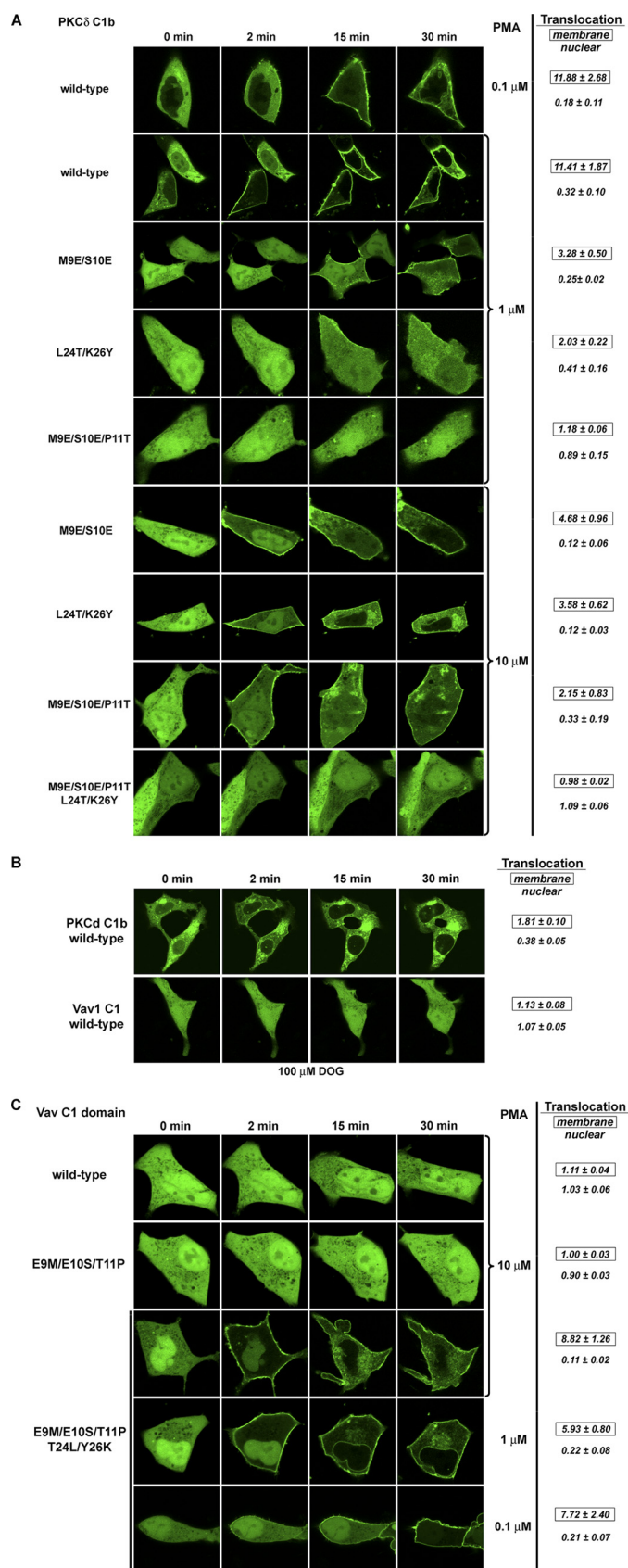


FIGURE 5. Translocation pattern of the GFP-tagged wild-type δ C1b and the multiple site mutants of δ C1b in living LNCaP cells after PMA or DOG treatment. Cells expressing the wild-type δ C1b or the various multiple site mutants of δ C1b were treated with PMA or DOG. The translocation pattern was examined by confocal microscopy as a function of time. Pattern of

The triple mutant (M9E/S10E/P11T) showed a more severe loss of binding potency for [3 H]PDBu *in vitro*, compared with that of the double mutants (963-fold reduction). In agreement with this, the triple mutant (M9E/S10E/P11T) showed a hardly detectable response to PMA at 1 μ M (Fig. 5A). However, similar to the double mutants it did display a fairly quick response to 10 μ M PMA (Fig. 5A), with detectable plasma membrane translocation as early as 2 min, and a partial translocation out of the interior of the nucleus at later time points (20–30 min). This confirms the severe reduction (960-fold) of binding potency that was measured *in vitro* but also demonstrates that, similar to the *in vitro* findings, a certain degree of phorbol ester response remained detectable for the triple mutant *in vivo* as well. In contrast to the double and triple mutants, we could not detect any signs of intracellular redistribution of the quintuple mutant (M9E/S10E/P11T/L24T/K26Y) in response to PMA at this concentration range (Fig. 5A). Increasing the concentration of PMA above 10 μ M resulted in severe disorganization of the cellular architecture, so we were unable to explore possible translocation at higher PMA concentrations. We conclude that our *in vivo* translocation studies support the important contribution of the five unique residues along the rim of the binding pocket to the lack of phorbol ester affinity of Vav1 C1.

Characterization of the Phorbol Ester Sensitivity of Vav1 C1 Mutants Containing δ C1b-like “Back” Mutations

Introduction of Five δ C1b-like Mutations into the Sequence of Vav1 C1 Resulted in an Almost Complete Recovery of Phorbol Ester Sensitivity, Both in Vitro and in Vivo—Although the above studies argue that the five unique residues we identified in the Vav1 C1 domain could be sufficient to account for the loss of Vav1 phorbol ester binding, it is possible that other residues in the Vav1 C1 domain independently might also interfere with binding. To address this question, we generated a quintuple back-mutant of Vav1 C1 (E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K), which contained the corresponding residues of δ C1b at positions 9, 10, 11, 24, and 26 in the binding cleft but retained all the other native residues of Vav1. We evaluated the *in vitro* binding affinity of the GST-tagged quintuple back-mutant for [3 H]PDBu. Strikingly, it bound [3 H]PDBu and did so with high affinity ($K_d = 1.05 \pm 0.15$ nM (Table 4), compared with $K_d = 0.193 \pm 0.005$ nM for the wild-type δ C1b (Table 1)). We conclude that the five residues identified are the primary basis for the failure of Vav1 to bind phorbol ester. An additional residue or residues must make a further minor contribution to affinity, accounting for the remaining 5-fold affinity difference.

The *in vivo* translocation experiments with the GFP-tagged quintuple back-mutant (E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) confirmed the phorbol ester responsiveness. In contrast to the

translocation was in response to A. PKC δ C1b wild-type and the multiple site mutants were treated with PMA (0.1–10 μ M). B. PKC δ C1b wild-type and Vav1 C1 wild-type treated with 100 μ M DOG. C. Vav1 C1 wild-type and the multiple site mutants treated with PMA (0.1–10 μ M). Each panel represents images typical of six to ten independent experiments. Maximal extents of translocation, measured as the increase in the ratio of plasma membrane/cytoplasmic staining (designated *membrane*) or as the decrease in the ratio of nuclear/cytoplasmic staining (designated *nuclear*) were quantitated for all replicates and presented as the mean \pm S.E.

TABLE 4

 K_d values of [3 H]PDBu for binding to wild-type Vav1 C1 and different multiple site Vav1 C1 mutants

GST-tagged C1 domains were expressed in a bacterial system and isolated, and the binding potencies for [3 H]PDBu were determined. Values represent the mean \pm S.E. ($n = 3$ independent experiments). NA means no activity.

Receptor (Vav1 C1)	K_d <i>nM</i>	Relative to PKC δ C1b WT	Relative to Vav1 C1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K
Wild type	NA	NA	NA
E9M/E10S T24L/Y26K	NA	NA	NA
E9M/E10S/T11P	7330 \pm 490	38,000 \times	6985 \times
E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K	1.05 \pm 0.14	5.4 \times	1 \times
Quadruple mutants			
E10S/T11P/T24L/Y26K (–E9M)	980 \pm 120	5052 \times	929 \times
E9M/T11P/T24L/Y26K (–E10S)	26.4 \pm 2.4	137 \times	25.1 \times
E9M/E10S/T24L/Y26K (–T11P)	198 \pm 18	1026 \times	189 \times
E9M/E10S/T11P/Y26K (–T24L)	34.9 \pm 3.9	181 \times	33.2 \times
E9M/E10S/T11P/T24L (–Y26K)	31.4 \pm 5.1	163 \times	29.9 \times

wild-type Vav1 C1, which showed no response to phorbol ester or DOG treatment, the quintuple back-mutant displayed translocation in response to as little as 0.1 μ M PMA (Fig. 5C), reflecting high phorbol ester sensitivity comparable with that obtained with WT δ C1b. In addition, the translocation kinetics/pattern of the quintuple Vav1 back-mutant, like that of the wild-type δ C1b, showed a dose-dependent change on PMA concentration, *i.e.* increasing the concentration of PMA accelerated the process of plasma membrane translocation and that of nuclear translocation.

Collectively, the almost complete recovery of the binding affinity of Vav1 C1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K (consistent with the results obtained with δ C1b mutants) further support previous crystallographic results (15) and our docking results, which demonstrate a retained binding cleft geometry for Vav1 C1 and a conserved binding pocket for ligand interaction. The reason for the lack of ligand affinity is the presence of these five residues at the rim of the binding pocket which presumably hinder the association of the C1 domain with the cellular membrane, thereby destabilizing the ternary binding complex and reducing the potency for phorbol esters.

Introduction of Double-, Triple-, and Quadruple δ C1b-like Mutations into the Sequence of Vav1 C1 Further Dissects the Role of the Individual Residues in the Ligand Affinity of Vav1 C1—To further explore whether all five residues actually contribute to the lack of binding potency in the WT Vav1 C1, we generated double, triple, and quadruple back-mutants of Vav1 C1 (see Table 4). Introducing two back mutations into the N-terminal (Vav1 C1 E9M/E10S) or the C-terminal (T24L/Y26K) loop of the apparent binding cleft of Vav1 C1 was insufficient to recover the phorbol ester response of the molecule. *In vitro* assays could not detect any measurable [3 H]PDBu binding (Table 4), and no translocation could be observed *in vivo* after 10 μ M PMA treatment (data not shown). Back-mutating the three residues in the N-terminal loop (E9M/E10S/T11P) conferred only a very weak binding potency ($K_d = 7330 \pm 490$ nM) on the triple back-mutant (Table 4), which could only be detected *in vitro* but not with translocation assays (data not shown). These results suggest that the presence of compatible residues at the tip of both loops is needed for appropriate binding affinity. They stand in partial contrast to the previous findings with the double (M9E/S10E; L24T/K26Y) and triple (M9E/S10E/P11T) mutants of δ C1b (Table 1 and Fig. 5A), which failed

to completely abolish the binding potency of the δ C1b mutants. Because the difference lies in the presence of other residues in the PKC δ C1b domain *versus* Vav1, it emphasizes both that these residues make a difference and that the effects of the combination of residues are not simply additive.

Next, using quadruple back-mutants of Vav1 C1 (listed in Table 4), we analyzed the individual contribution of each of the five residues in the backbone structure of the Vav1 C1 to the lack of ligand binding, for comparison with their contributions in the context of the PKC δ C1 domain. In this set of experiments, the quintuple back-mutant of Vav1 C1 (E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) can be considered analogous to the WT δ C1b (both containing the appropriate residues for potent ligand binding) and the quadruple back-mutants of Vav1 C1 (see Table 4) analogous to the single site mutants of δ C1b (see Table 1) of our previous experiment (all possessing one residue less than required for the most potent binding cleft geometry). (For brevity we will refer to the quadruple back-mutants by mentioning the residue that they lack, compared with the quintuple Vav1 C1 mutant, with an antecedent negative sign; see Table 4 for details.) The binding constants (K_d values) of three out of five quadruple mutants showed a nearly uniform reduction in potency. The mutants (–E10S), (–T24L), and (–Y26K) all displayed a decrease of 25–35-fold in potency for [3 H]PDBu, compared with the binding affinity of the quintuple Vav1 C1 mutant (Table 4). This is consistent with the uniform reduction (5–13-fold; see Table 1) in the binding affinity of the single site δ C1b mutants compared with their wild-type counterpart, although the degree of reduction is slightly higher than in the case of δ C1b mutants. However, in contrast to the single site mutants of δ C1b at site 9 and 11 (δ C1b M9E and δ C1b P11T), their analogous quadruple Vav1 C1 mutants (Vav1 C1 –E9M and –T11P, respectively) displayed a more severe reduction in their binding potencies (929-fold for –E9M and 189-fold for –T11P compared with the quintuple Vav1 C1 mutant). This suggests a more significant role for Met⁹ and Pro¹¹ in ligand binding within the backbone structure of Vav1 C1, as opposed to that observed in the context of δ C1b. In agreement with the *in vitro* results, the *in vivo* translocation experiments with the quadruple back-mutants confirmed that Met⁹ and Pro¹¹ had a larger effect on phorbol ester response than did the other three residues (Ser¹⁰, Leu²⁴, and Lys²⁶). As seen in Fig. 6, the application of 10 μ M PMA induced a quick plasma membrane translo-

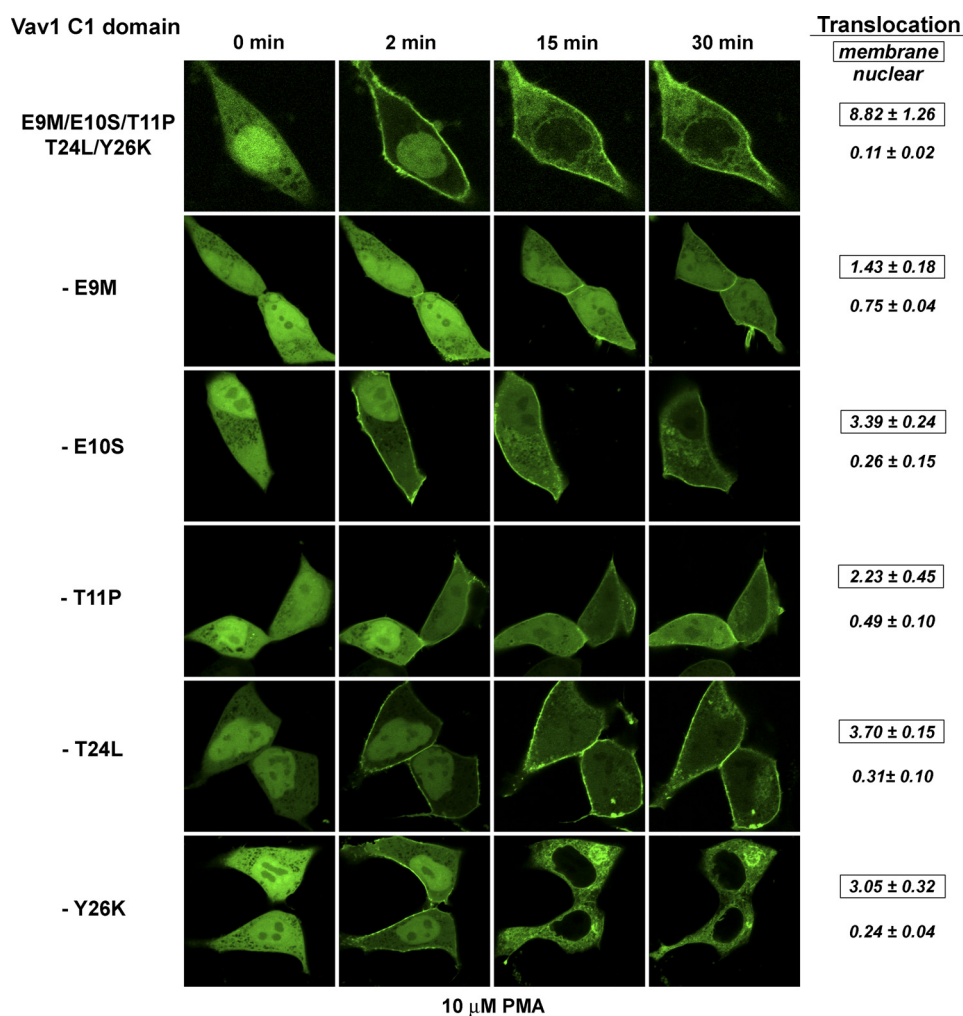


FIGURE 6. Translocation pattern of the GFP-tagged quintuple and quadruple Vav1 C1 back-mutants in living LNCaP cells after PMA treatment. Cells expressing the quintuple back-mutant Vav1 C1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K and the indicated quadruple back-mutants were treated with 10 μM PMA. Cells were imaged by confocal microscopy, and images captured at the indicated times are shown. Each panel represents a typical image of three to five independent experiments. Maximal extents of translocation, measured as the increase in the ratio of plasma membrane/cytoplasmic staining (designated *membrane*) or as the decrease in the ratio of nuclear/(cytoplasm and plasma membrane) staining (designated *nuclear*) were quantitated for all replicates and presented as the mean ± S.E.

cation in the case of the -E10S, -T24L, and -Y26K mutants. In addition, although the redistribution from the cytosol into the plasma membrane was not complete, we could observe a fairly strong fluorescent signal in the membrane within 15 min after the administration of the drug, and an almost complete translocation out of the interior of the nucleus. In contrast, the -E9M mutant displayed only a weak translocation into the plasma membrane that had much slower kinetics than that of the previous three mutants and was limited to certain regions of the plasma membrane. Moreover, the nuclear translocation was also limited for this mutant. The translocation of the -T11P mutant in response to PMA displayed an intermediate pattern compared with that of the three more potent mutants (-E10S, -T24L, and -Y26K) and -E9M, which showed the weakest response. Although a fairly quick initial plasma membrane translocation could be detected, the redistribution from the cytosol was only partial, and the fluorescent signal was absent from certain regions of the plasma membrane. In addition, translocation out of the nucleus was quite limited.

Collectively, the results obtained with the quadruple Vav1 C1 mutants emphasize the prominent contribution of Met⁹ and Pro¹¹ to the binding affinity of the quintuple Vav1 C1 mutant (E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) for phorbol esters, which in turn indicates that Glu⁹ and Thr¹¹ make a more significant contribution to the reduction of the binding potency of the wild-type Vav1 C1, compared with the other three residues (Glu¹⁰, Thr²⁴, and Tyr²⁶).

Rationalizing the Phorbol Binding and Membrane Translocation Behavior of PKCδ and Vav1 Mutants in Terms of Molecular Lipophilicity

A plausible interpretation of the role played by the five unique residues was that the lack of phorbol ester responsiveness in Vav1 was due to the inability of its C1 domain to associate with and insert into the membrane, forming the ternary protein + ligand + lipid complex that is required for successful ligand binding. To better assess this model, we developed a method of calculating and quantifying the differences in lipophilicity between our various C1 domain mutants. We were

C1 Domain of Vav1

interested in seeing how the membrane affinity of a C1 domain mutant correlated with its K_d value for PDBu and its membrane translocation behavior.

The standard metric for quantifying the hydrophobicity or lipophilicity of small molecules is $\log P$, a measure of the partition coefficient between octanol and water. However, $\log P$ is a whole-molecule number and as such is not particularly useful for characterizing macromolecules, where the lipophilicity may vary significantly between different parts of the structure. This is especially true for peripheral membrane proteins such as the typical (DAG/phorbol-responsive) C1 domains. Computational methods for estimating $\log P$ generally involve summing up the fractional lipophilicities of individual atoms or small fragments. These values are based on regression analysis from libraries of small molecules with carefully measured experimental values of $\log P$ (44). The concept of an MLP is an extension of these types of calculations that can be applied to larger molecules such as proteins. The MLP is analogous to an electrostatic potential around a protein based on the partial charges on individual atoms. Each atom is assigned an atomic $\log P$ (AlogP) value, and these values are then projected outward from the underlying atoms onto the solvent-accessible molecular surface. In other words, the lipophilicity value at each point on the surface is a smoothed distance-dependent function of the fractional $\log P$ values of all nearby atoms (59). An algorithm for this calculation has been implemented in the software program VASCo (43), which also includes a plugin for PyMOL (60) for surface visualization.

We built model structures for each of the single and multiple site mutants of the Vav1 and PKC δ C1 domains and calculated the molecular lipophilicity potentials over their surfaces using VASCo. Fig. 7A shows a view of these surfaces, for the wild-type, triple, and quintuple mutant structures, seen from an orientation looking down into the binding site. The surfaces are colored according to the value of the lipophilicity at each point. The binding site surfaces for all the C1 domains are mainly of intermediate lipophilicity (green colored) with patches of stronger hydrophobicity (red color). Wild-type PKC δ is more lipophilic than wild-type Vav1, due mainly to the presence of Met⁹, Pro¹¹, and Leu²⁴. Wild-type Vav1 has only one patch of strong hydrophobicity, at Leu²⁰. However, the presence of Glu⁹ and Glu¹⁰ does not introduce any strong hydrophilic character (blue color) to the binding site, as the polarity of the carboxylate groups is smoothed out by surrounding nonpolar atoms. Similarly, Arg²² in Vav1 does not appear significantly more hydrophilic than Trp²² in PKC δ , because its guanidinium headgroup lies folded down below the surface of the binding site, and it is the methylene groups in the side chain that form part of the rim. Thus, Fig. 7A offers a qualitative explanation of the relatively small effects of individual mutations and suggests that it is the overall lipophilicity of the top third of the C1 domain that drives its ability to respond to phorbol.

To look at the correlation between molecular lipophilicity and phorbol sensitivity, the sum of the MLP over the surface of the binding site for each of the PKC δ C1b and Vav1 C1 domain constructs was extracted from the VASCo output and is plotted in Fig. 7, B and C, along with the [³H]PDBu binding affinities and a color-coded summary of translocation behavior. Trans-

location assays were not performed for all of the PKC δ C1b single mutants, but in those cases good phorbol binding affinity was assumed to imply a normal translocation response. At the two ends of the scale, it is clear that C1 domains with high lipophilicity on the binding site surface bind PDBu *in vitro* with good affinity and translocate *in vivo* in response to PMA; conversely, C1 domains with low binding site lipophilicity do neither of these things. Approximate cutoffs can be drawn to say that C1 domains with binding site MLP values >0.0 will be fully phorbol-responsive, C1 domains with binding site MLP values < -10.0 will not be phorbol-responsive, and C1 domains with binding site MLP values between 0.0 and -10.0 will probably retain some phorbol-binding ability but may or may not be fully responsive.

The quintuple mutated Vav1 C1 domain remains slightly less lipophilic than the wild-type PKC δ C1b domain, and conversely quintuple mutated PKC δ is still more lipophilic than wild-type Vav. This indicates that the five mutations do not completely manage to “convert” one C1 domain into the other, in terms of the overall lipophilicity, but they come quite close. The largest numerical part of the difference is due to Trp *versus* Arg at position 22, but as we have shown earlier, this substitution does not affect phorbol binding at all.

The K26Y and S10E single mutants of PKC δ and the corresponding Vav1 quadruple mutants -E10S and -Y26K show the smallest changes in lipophilicity relative to wild-type PKC and quintuple mutant Vav1. Thus, it is not surprising that these mutants retain strong phorbol binding affinities. In fact, Glu at position 10 is actually more lipophilic than Ser because of the methylene units in the side chain. As discussed above, position 26 is not directly involved in the binding site surface, because it is located below the binding site in the middle third of the C1 domain. However, Tyr at this position does slightly increase the lipophilicity of the surface near residues 8 and 9.

The other PKC δ single mutants and Vav1 quadruple mutants have intermediate lipophilicities, in roughly the same range as the double and triple mutants of PKC δ and the triple mutant of Vav1. In this intermediate range, phorbol binding affinities and translocation dynamics do not necessarily correlate linearly with the numerical MLP values. For example, the molecular lipophilicity calculations do not explain the stronger-than-expected negative effect of double mutations in PKC δ (or the triple mutation in Vav1, which is structurally equivalent to the PKC δ L24T/K26Y double mutant). An alternative interpretation of the data is that the Vav1 quadruple -T24L mutant as well as the PKC δ M9E and L24T mutants show much *better* phorbol responsiveness than would be expected based on their binding site lipophilicities. The difference between Thr and Leu at residue 24 gives a significant difference in the binding site MLP, yet this substitution on its own produces only a modest effect on phorbol binding, and the Vav1 -T24L mutant can translocate rapidly. It is interesting that this mutant does show an altered subcellular distribution, with a concentration in the nucleus, before phorbol is applied to the cells (Fig. 6). These results suggest that for C1 domains with intermediate lipophilicities, the ability to respond to phorbol may depend on the precise locations of hydrophobic and hydrophilic residues in

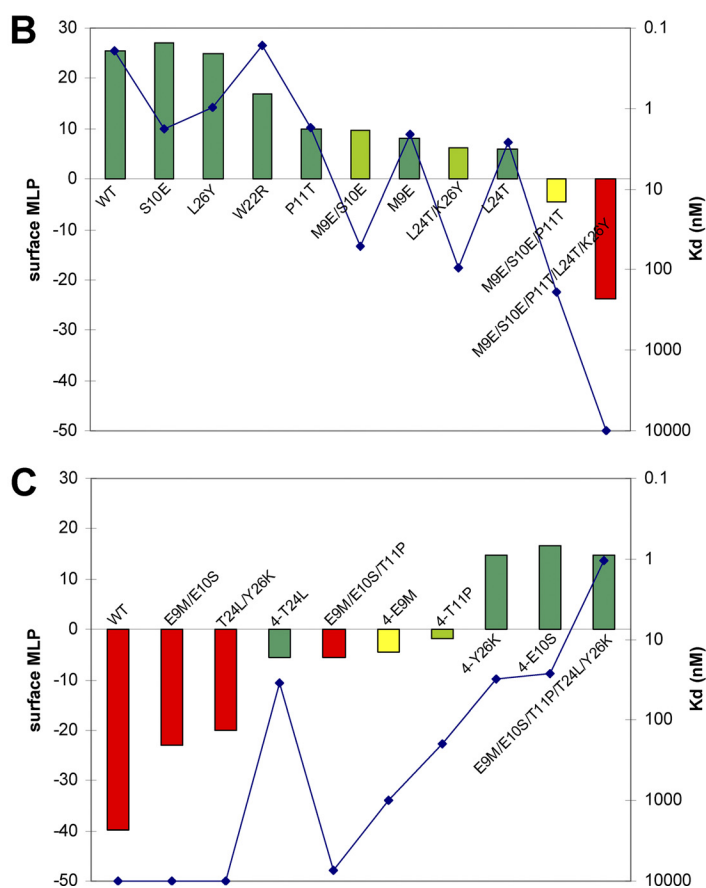
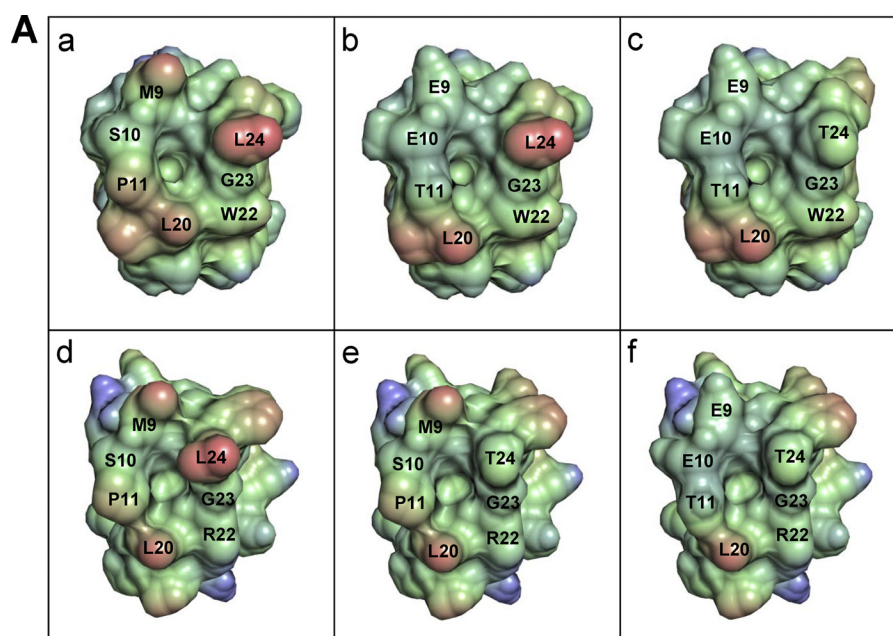


FIGURE 7. *A*, modeling of solvent-accessible surfaces of the C1 domain constructs. The surfaces of C1 domains are colored according to the molecular lipophilicity potential, from blue (hydrophilic) to red (lipophilic). *Panel a*, wild-type PKC δ C1b. *Panel b*, PKC δ C1b M9E/S10E/P11T. *Panel c*, PKC δ C1b M9E/S10E/P11T/L24T/K26Y. *Panel d*, Vav1 C1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K. *Panel e*, Vav1 C1 E9M/E10S/T11P. *Panel f*, wild-type Vav1. Note that residue 26 is not visible in this orientation, which is looking down into the phorbol-binding site from the top of the domain. *B* and *C*, quantification of the overall molecular lipophilicity potential (MLP) of the membrane-interacting and phorbol-binding site area of the δ C1b and Vav1 C1 domains (see "Experimental Procedures" for details on the MLP calculations). *B*, MLP (colored bars) for PKC δ C1b mutant constructs. The wild-type structure is on the left, and the mutants are arranged from most to least lipophilic. *C*, MLP for Vav1 C1 domain mutant constructs. The wild-type structure is on the left, and mutants are ordered from least to most lipophilic. The bars are colored green for C1 domains that translocate normally in response to PMA, light green for domains which translocate more slowly, yellow for domains that showed partial or limited translocation behavior, and red for domains that did not translocate at all or showed negligible translocation. The binding affinity to [3 H]PDBu for each C1 domain is plotted on the right-hand axis on a log scale (blue points and line).

C1 Domain of Vav1

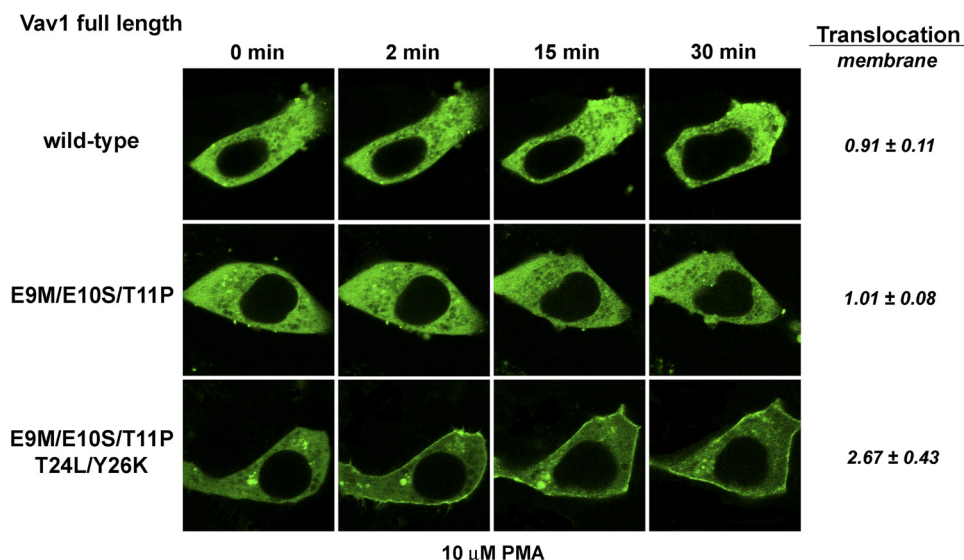


FIGURE 8. Translocation pattern of the full-length versions of GFP-tagged wild-type Vav1 and the triple and quintuple Vav1 back-mutants in living LNCaP cells after PMA treatment. Cells expressing the full-length proteins of the wild-type Vav1, of the triple back-mutant, and of the quintuple back-mutant were imaged by confocal microscopy after the application of 10 μ M PMA. Images captured at the indicated times are shown. Each panel represents a typical image of four to six independent experiments. Maximal extents of translocation, measured as the increase in the ratio of plasma membrane/cytoplasmic staining (designated “membrane”) were quantitated for all replicates and presented as the mean \pm S.E.

the binding site, and the balance of lipophilicity across the C1 domain.

Quintuple Mutated C1 Domain of Vav1 Retains Its Phorbol Ester Sensitivity in the Context of the Full-length Molecule and Is Capable of Targeting the Protein to the Cellular Membrane in Response to Ligand

To elucidate whether the binding cleft of the Vav1 C1 is capable of interacting with phorbol esters in the context of the full-length molecule, we generated a full-length quintuple Vav1 back-mutant, which contained the same five back-mutations (E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) in its C1 domain as the quintuple mutant of the isolated Vav1 C1. We speculated that if the binding cleft is not occluded by other domains in the full-length molecule, the introduction of the five crucial residues into the C1 domain would confer phorbol ester sensitivity on the full-length Vav1 protein as well. We cloned the genes of the quintuple full-length mutant (Vav1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) along with its wild-type counterpart into a vector encoding an N-terminal GFP fusion tag, and we subjected them to *in vivo* translocation assays. (Because of technical difficulties with producing sufficient amounts of purified protein, we were unable to conduct *in vitro* binding experiments on full-length Vav1.) Fig. 8 shows that, similar to the findings with the isolated Vav1 C1, the full-length quintuple back-mutant of Vav1 (Vav1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) possessed affinity for phorbol esters, because the application of 10 μ M PMA resulted in the translocation of the protein into the plasma membrane. In clear contrast with the quintuple Vav1 mutant, the wild-type and the triple mutant (Vav1 E9M/E10S/T11P) of the full-length Vav1 failed to redistribute from the cytosol into the plasma membrane (similar to the results obtained with the isolated Vav1 C1). These results demonstrate unambiguously that replacing the residues of Vav1 at positions 9–11, 24, and 26 (of its C1 domain) with δ C1b-like amino acids confers phorbol ester sen-

sitivity on the full-length Vav1 protein as well. In the context of the interaction of the C1 domain of Vav1 with the DH and PH domains (Fig. 9A), it can be seen that the three residues on the N-terminal loop point out into solvent. Thus, although mutating these three residues can provide some detectable binding affinity for phorbol, their mutation would appear not to disrupt the quaternary packing of the C1 domain. In contrast, both of the mutations in the C-terminal loop would affect its interactions with the rest of the protein. The T24L mutation clashes with residue Val³⁷³ in helix α 6 of the DH domain, and the Y26K mutation introduces an unfavorable electrostatic interaction between the lysine and either residue Arg⁴⁰² or residue Lys⁴²⁹ in the PH domain. This suggests that the N-terminal loop mutations act to increase the lipophilicity of the C1 domain for membrane binding and the C-terminal loop mutations act to loosen or disrupt the packing of the C1 domain as well as increasing lipophilicity. Both sets of mutations are required for responsiveness to phorbol.

The modeling has a further implication. Because of the proximity of the C-terminal loop of the C1 domain of Vav1 to the α 6 helix of the DH domain, a prediction is that an appropriately bulky ligand binding to the C1 domain should disrupt interaction with the DH domain (Fig. 9B). Because the C1 domain interaction is required to stabilize the GEF activity of the DH domain, such a ligand might be expected to function as a Vav1 inhibitor.

Comparison of the Binding Affinities of Novel DAG-lactones Designed to Target the Structure of Vav1 C1

The modeling and site-directed mutagenesis results shown above suggested that eliminating the charged Glu residues in the N-terminal loop is necessary (but not sufficient) for restoring phorbol sensitivity to Vav1. We theorized that a ligand bearing a positive charge might similarly “cancel out” the membrane binding penalty imposed on the C1 domain

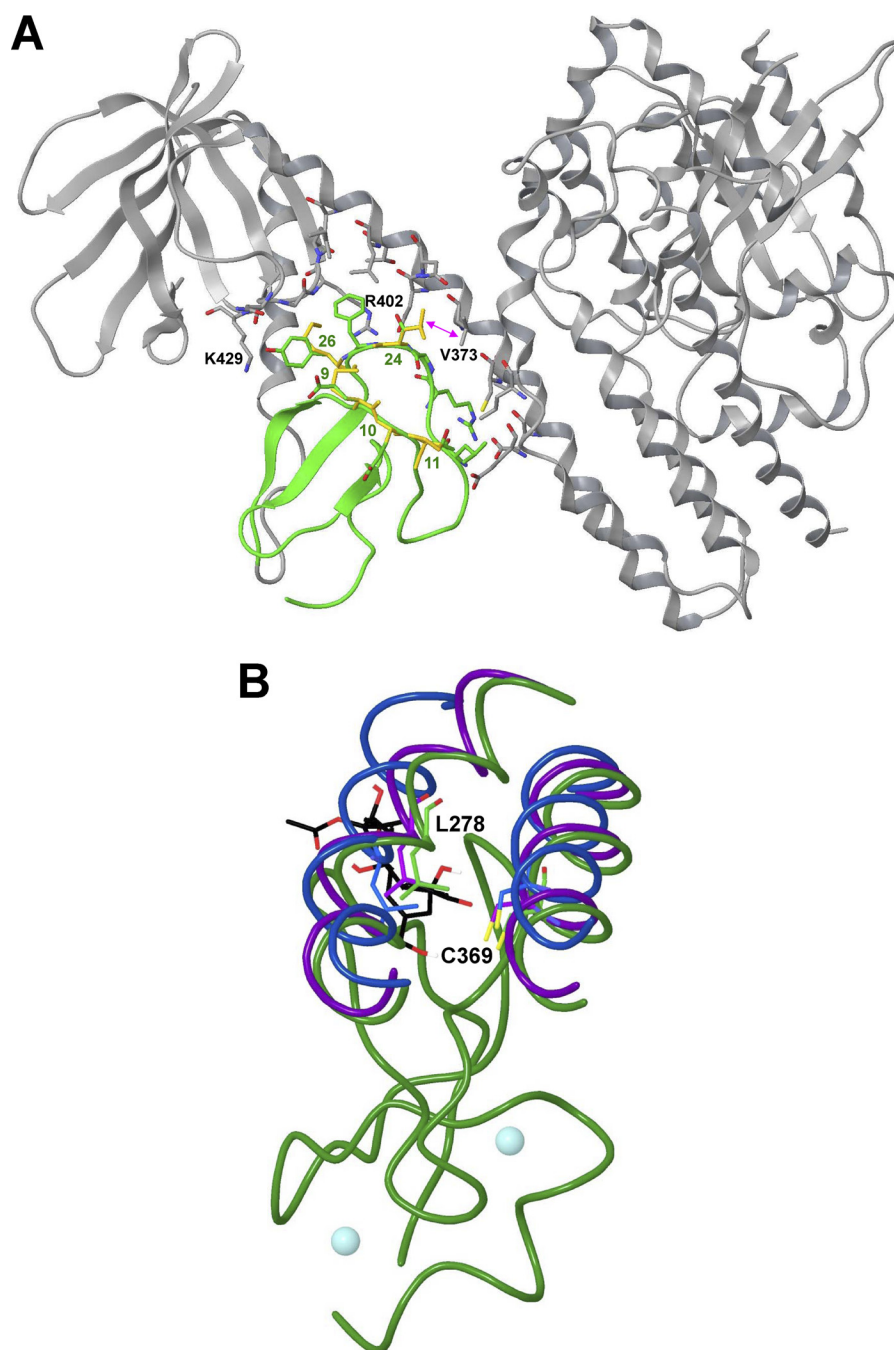


FIGURE 9. *A*, mutations of the C1 domain of Vav1 in the context of adjacent regions (the DH and PH domains) of the full-length protein (15). The C1 domain is colored *green*, and the DH and PH domains are colored *gray*. Mutations in the C1 domain are overlaid with the wild-type residues and colored *yellow*. Residues in the DH and PH domains that conflict with mutations are labeled. *A magenta arrow* marks the steric clash between residue Val³⁷³ and a Leu at position 24 in the C1 domain. *B*, phorbol 13-acetate docked into the C1 domain of Vav1 (2VRW (15), colored *green*), in the context of its interactions with the DH domain. The other lower resolution crystal structures of Vav1 are aligned as in Fig. 1*B* and colored blue (3KY9) (14) and purple (3BJI) (16). Although the orientation of the DH helix differs slightly depending on whether or not the CH domain is present and/or the exchange factor Rac1 is bound (15, 16), in all structures residues in the $\alpha 3$ and $\alpha 6$ helices of the DH domain are positioned to clash with a ligand in the C1 domain binding site. The residues with the strongest steric clashes to phorbol are shown and labeled.

by the negatively charged residues in the N-terminal loop. It is believed that ions in salt-bridged pairs have a reduced desolvation penalty or increased lipophilicity for interaction with the bilayer (61). Such a strategy is used pharmaceutically to improve the intestinal absorption of charged or ionizable drugs (62).

To test this theory we used a series of DAG-lactones. DAG-lactones have proven to provide a high affinity template readily

amenable to the introduction of structural variation to probe the nature of ligand-C1 domain interactions (10). The chemical structures of the specific derivatives examined are illustrated in Fig. 10*A*. The various DAG-lactones possess positively charged guanidinium (6*c*) and pyridinium (8*a*–*f*) moieties at the *sn*-2 side chain position. In addition, we included compounds with neutral pyridine (6*a*) and methylindole (6*b*) side chains for comparison.

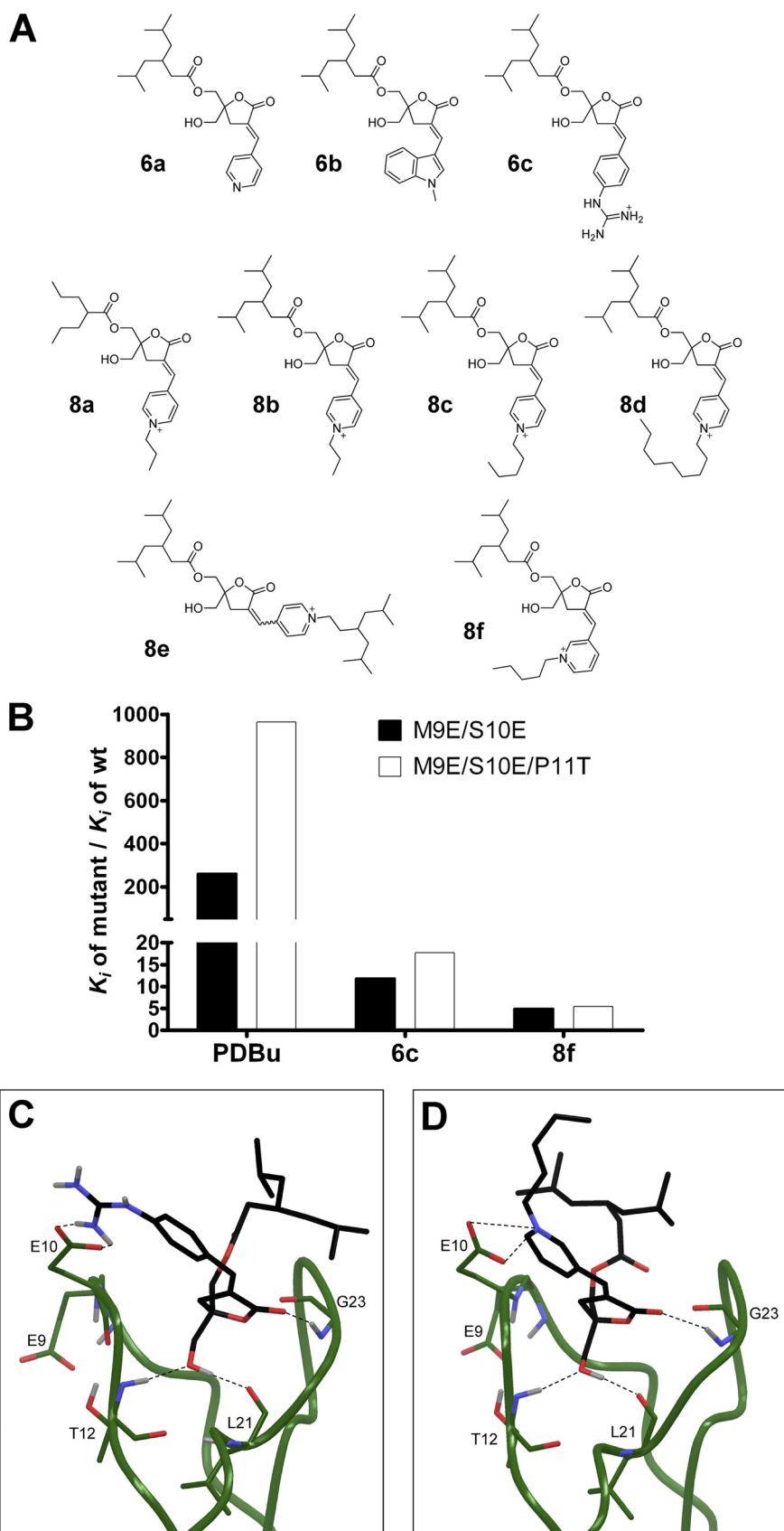


FIGURE 10. *A*, chemical structure of the positively charged diacylglycerol-lactone derivatives. *B*, relative binding affinities for [³H]PDBu and compounds **6c** and **8f** of the double and triple mutants of δ C1b. The ratios of the binding affinities of the indicated compounds for the mutant δ C1b domain relative to the wild-type δ C1b domain are plotted. For [³H]PDBu, the binding affinity was measured as the K_d value; for compounds **6c** and **8f**, it represents the K_i value, as indicated in Table 5. *C* and *D*, charged DAG-lactones **6c** (*C*) and **8f** (*D*) docked into the C1 domain of PKC δ C1b M9E/S10E/P11T. Electrostatic interactions are indicated by dashed lines.

TABLE 5

Binding of different DAG-lactone derivatives to δ C1b double and triple mutants

The inhibitory dissociation constants (K_i) of δ C1 M9E/S10E and of δ C1 M9E/S10E/P11T for the DAG lactones were defined in the presence of [3 H]PDBu. Values represent the mean \pm S.E. ($n = 3$ independent experiments). NA means no activity; ND means not determined.

Compound name	Receptor PKC δ C1b wild type	Receptor PKC δ C1b M9E/S10E	Receptor PKC δ C1b M9E/S10E/P11T
	K_i	K_i	K_i
	<i>nm</i>	<i>nm</i>	<i>nm</i>
[3 H]PDBu	0.193 \pm 0.005	50.5 \pm 2.1	186.1 \pm 6.0
6a	10.0 \pm 1.5	451 \pm 70	ND
6b	0.66 \pm 0.6	54.0 \pm 4.1	ND
6c	16.1 \pm 1.7	191 \pm 15	285 \pm 28
8a	5810 \pm 420	NA	ND
8b	714 \pm 97	6690 \pm 550	ND
8c	215 \pm 19	1760 \pm 140	ND
8d	792 \pm 67	11680 \pm 840	ND
8e	25.2 \pm 1.3	1061 \pm 27	ND
8f	27.7 \pm 6.2	137 \pm 15	151 \pm 36

To test the relative selectivity of these compounds for the Vav1 C1 structure, we performed *in vitro* competition assays with [3 H]PDBu using the double (M9E/S10E) and triple (M9E/S10E/P11T) mutants of δ C1b. These mutants retained appreciable binding affinities for [3 H]PDBu (which is a prerequisite of our detection of reduced binding in competition assays), however, they displayed marked reduction of binding potency as a result of incorporating Vav1 C1-like residues in their structure. They nevertheless provide useful surrogates as we begin to explore strategies for targeting the specific structural features of Vav1.

As shown in the 1st column of Table 5, introduction of a positive charge into the DAG-lactone yielded compounds that were 83-fold (**6c**) to 30,000-fold (**8a**) weaker in affinity for the wild-type PKC δ C1b domain than was [3 H]PDBu. However, when these charged compounds were assayed against the double and triple mutants, the decrease in their binding affinity was significantly less than the decrease in binding affinity seen with neutral PDBu and the neutral DAG-lactones. The binding of [3 H]PDBu for the double and triple mutants was reduced 261- and 963-fold, respectively, compared with that for the WT δ C1b. The binding affinities of the neutral DAG-lactones **6a** and **6b** to the double mutant were also reduced 45- and 82-fold, respectively, consistent with the loss of binding that we had observed for DOG (Table 2). In contrast, the affinity of the pyridinium-containing lactone **8f** for these mutants decreased only 5-fold in the case of the double mutant (M9E/S10E) and 5.5-fold in the case of the triple mutant (M9E/S10E/P11T). Similarly, the affinity of the guanidinium-containing lactone **6c** decreased only 12- and 17-fold, respectively. The relative binding affinities of these two charged compounds and [3 H]PDBu to the double and triple mutants *versus* the wild-type δ C1b domain are depicted in Fig. 10B.

Within the pyridinium-containing DAG-lactones, the greater affinity of **8f** for the double mutant, relative to its less active isomer **8c**, suggests that the exact orientation of the positive charge in the pyridinium ring is important for effective neutralization. Comparing compound **8c**, with a 5-carbon chain on the pyridinium ring, to the less potent compounds **8b** (3-carbon chain) and **8d** (9-carbon chain) suggests that the exact length of this alkyl chain is also important. The presence

and extent of branching in the alkyl groups on either the *sn*-1 or the *sn*-2 side chains also affect their binding affinities. We have shown previously that subtle differences in the chemical structure of the side chains on the DAG-lactone template can produce widely varying biological responses (63), due in part to differences in the degree of penetration of charged DAG-lactones into the membrane (40). These results suggest that the 3-pyridyl and guanidyl series of compounds could be explored further to optimize their alkyl substituents and examine their biological effects against charged C1 domains *in vivo*.

To rationalize and visualize our results, we docked the highest affinity charged DAG-lactones **6c** and **8f** into the triple (M9E/S10E/P11T) mutant structure of δ C1b. Because docking holds the receptor structure fixed, we followed it with a conformational search of the ligand and the charged binding site side chains to allow them to form favorable interactions. As shown in Fig. 10, C and D, Glu¹⁰ can easily form a salt bridge to both the charged nitrogen in the pyridinium group of DAG-lactone **8f** and the guanidinium group of DAG-lactone **6c**. The additional alkyl chain on the *sn*-2 pyridinium ring of compound **8f** provides greater hydrophobic coverage over the top surface of the C1 domain, which could promote the insertion of this complex into the bilayer, and explain its slightly better affinity.

These results illustrate that the DAG-lactone template is in principle structurally capable of forming ion-pair interactions with charged residues in the C1 domain binding site. Although these compounds represent only an early stage in the design of agents targeting the C1 domain of Vav1, they support the concept that appropriate interaction with the unique negatively charged residues at positions 9 and 10 may represent one element in the strategy.

DISCUSSION

C1 domain-containing proteins have been classified into two major groups based on ligand responsiveness (11). Typical C1 domains bind DAG/phorbol esters, whereas atypical C1 domains do not. Previous findings of our laboratory with the atypical PKCs (aPKCs) indicated that the family of atypical C1 domains could be further divided (13). *c*-Raf and KSR exemplify atypical C1 domains with a structurally distorted binding pocket that is not compatible with ligand interactions, whereas the aPKCs have a C1 domain that retains a compatible binding cleft geometry but possesses other characteristics that interfere with efficient ligand interactions, namely the four arginine residues lining the rim of the binding pocket can fold into the cleft, effectively competing with ligand. Vav1 is another member of the subclass of atypical C1 domains with compatible binding pocket geometry and the potential to interact with DAG analogs. In this study, we showed that the basis for the lack of activity of Vav1 appears to be different from that in the case of the aPKCs. Modeling emphasizes that the rim of the binding cleft of Vav1 displays enhanced hydrophilicity, interfering with membrane insertion and stabilization of the ternary binding complex. We identified four hydrophilic residues in Vav1 C1 (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, and Thr²⁴) that drive its lack of binding. Beyond the hydrophobic cap, C1 domains have an annulus of charged residues that interact with negatively charged phospholipid headgroups. In Vav1, we identified an additional resi-

C1 Domain of Vav1

due (Tyr²⁶) in this annular region that further contributes to the inhibition of binding.

A striking finding, for Vav1, as well as for the aPKCs, was that in neither case did a critical residue cause a major structural change in the binding pocket that abrogated ligand affinity. Rather, lack of binding represented the cumulative effect of the otherwise modest impact of multiple individual residues on binding potency, a mechanism of “death by a thousand cuts.”

Our experimental approaches using forward and back mutagenesis afforded somewhat different conclusions about the importance of different residues. The δ C1b single site mutants indicated an almost uniform contribution for each of the five unique residues to the lack of ligand binding. However, the findings with the Vav1 C1 quadruple mutants (analogous to δ C1b mutants in this setting) suggested a more robust effect for each residue in the lack of ligand binding, and in addition they revealed a more prominent impact for the Glu⁹ and Pro¹¹ residues on binding potency. These differences, together with the lack of additivity of the effects upon multiple changes in residues, provide a reminder that the context, *i.e.* the influence of the other residues in the C1 domain, on the overall behavior cannot be ignored. It also is consistent with our calculations that the overall lipophilicity of the δ C1b is greater than that of the Vav1 C1 domain, even after introduction of the mutated residues.

Because of the structural similarities between the C1 domains of Vav1, Vav2, and Vav3, we speculate that factors similar to those that interfere with the phorbol ester binding of Vav1 might also apply in the cases of Vav2 and Vav3. Likewise, Vav orthologs have been described in both *Caenorhabditis elegans* and in *Drosophila melanogaster* (64, 65). Evaluation of their behavior should further extend our understanding of C1 domain structure-function relationships. A number of other C1 domains reported either to be weakly sensitive or not sensitive to phorbol esters or diacylglycerol, such as those of RasGRP2 (66) or PKC θ C1a (67, 68), afford a further opportunity to probe factors influencing C1 domain ligand interactions. As with Vav1, such structural differences in turn may afford the opportunity for the design of specific ligands exploiting these structural differences.

Vav1 represents a therapeutic target rich in potential applications. Vav1 is an essential regulator of leukocyte functions, including T-cell activation and development, B-cell function, induction of the killing function of Natural Killer cells, and the migration and phagocytic activity of macrophages (22). Although mutated versions of Vav1 have never been described in human cancer, the aberrant expression of the wild-type Vav1 in several malignancies (*e.g.* melanoblastoma, pancreatic ductal adenocarcinoma) suggests that it can play a pivotal role in tumorigenesis and tumor progression (28, 29). Finally, the actin cytoskeleton remodeling mediated by Vav1 through the Rho/Rac1 family of small GTPases may contribute to the increased invasive and metastatic potential of neoplastic cells (69).

The C1 domain has been shown to play a critical role in the enzymatic function of Vav1 (34). Our current understanding, from the x-ray crystallographic analysis of Rapley *et al.* (15), is that there is a complex network of intramolecular contacts between the C1 (and the PH) domain and the DH domain,

which help to restrict the flexibility of a crucial $\alpha 6$ helix in the DH domain, thereby stabilizing it in a conformation that facilitates maximal exchange activity. The solvent-exposed cavity formed from the apparent binding pocket of the C1 domain lies in the vicinity of these intimate interactions. In fact, the authors identified that Arg²², Thr²⁴, and Phe²⁵ (using the C1 domain terminology) form very significant connections with the residues situated at the $\alpha 6$ -helix of DH domain within this DH-C1 interface. These residues are located at the C-terminal loop of the binding pocket of C1. Our findings reveal that the Vav1 C1 domain indeed possesses the potential to accommodate DAG/phorbol esters. Although the presence of unique residues along the binding cleft renders the molecule noncompatible with membrane insertion, these residues provide a unique opportunity for drug design, engineering specific contacts. Given the high selectivity of phorbol esters, DAG-lactones, and related compounds for C1 domains (10), the combination of this chemistry with further features exploiting the specific features of a class of atypical C1 domain targets such as those of Vav should provide great specificity. Our current understanding makes the strong prediction that such ligand binding, by disrupting the C1 domain-DH domain interactions, should inhibit the exchange activity of Vav.

Although these possibilities remain speculative, in this study we tested a series of diacylglycerol-lactones to begin to explore this concept. A strategy adopted by the Marquez and Blumberg group (10) for efficient synthesis of ligands that interact with the binding pockets of the C1 domain-containing proteins (most notably PKCs) was the cyclization of the structure of the low affinity endogenous ligand DAG to generate the conformationally constrained DAG-lactones, which with optimization can achieve affinities approaching high μ M. Using this approach, we have previously developed the novel DAG-lactone 130C037, which displayed marked selectivity among the recombinant C1a and C1b domains of PKC α and PKC δ , as well as substantial selectivity for the guanyl exchange factor RasGRP relative to PKC α (49). We have further shown the potential of combinatorial chemistry for identification of diacylglycerol-lactones with selectivity for any of a variety of biological end points (63). Although the diacylglycerol-lactones described here were only of moderate nanomolar affinity, several showed markedly enhanced selectivity, compared with the prototypical ligand PDBu, for the δ C1b domain containing several of the Vav1-specific residues, which we used as a surrogate for the wild-type Vav1 C1 structure. These DAG-lactone derivatives contained a positively charged side chain that had the potential to interact with the negatively charged glutamic acid residues. Although such compounds provide proof of principle, it should be emphasized that they represent only a first step.

REFERENCES

1. Carrasco, S., and Mérida, I. (2007) Diacylglycerol, when simplicity becomes complex. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 27–36
2. Newton, A. C. (1995) Protein kinase C. Structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* **270**, 28495–28498
3. Kazanietz, M. G. (2002) Novel “nonkinase” phorbol ester receptors. The C1 domain connection. *Mol. Pharmacol.* **61**, 759–767
4. Blumberg, P. M., Kedei, N., Lewin, N. E., Yang, D., Czifra, G., Pu, Y., Peach, M. L., and Marquez, V. E. (2008) Wealth of opportunity. The C1 domain as

- a target for drug development. *Curr. Drug Targets* **9**, 641–652
5. Griner, E. M., and Kazanietz, M. G. (2007) Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 281–294
 6. Xu, R. X., Pawelczyk, T., Xia, T. H., and Brown, S. C. (1997) NMR structure of a protein kinase C- γ phorbol-binding domain and study of protein-lipid micelle interactions. *Biochemistry* **36**, 10709–10717
 7. Zhang, G., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., and Hurley, J. H. (1995) Crystal structure of the Cys-2 activator-binding domain of protein kinase C δ in complex with phorbol ester. *Cell* **81**, 917–924
 8. Stewart, M. D., Morgan, B., Massi, F., and Igumenova, T. I. (2011) Probing the determinants of diacylglycerol binding affinity in the C1B domain of protein kinase C α . *J. Mol. Biol.* **408**, 949–970
 9. Pak, Y., Enyedy, I. J., Varady, J., Kung, J. W., Lorenzo, P. S., Blumberg, P. M., and Wang, S. (2001) Structural basis of binding of high affinity ligands to protein kinase C. Prediction of the binding modes through a new molecular dynamics method and evaluation by site-directed mutagenesis. *J. Med. Chem.* **44**, 1690–1701
 10. Marquez, V. E., and Blumberg, P. M. (2003) Synthetic diacylglycerols (DAG) and DAG-lactones as activators of protein kinase C (PK-C). *Acc. Chem. Res.* **36**, 434–443
 11. Hurley, J. H., Newton, A. C., Parker, P. J., Blumberg, P. M., and Nishizuka, Y. (1997) Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci.* **6**, 477–480
 12. Colón-González, F., and Kazanietz, M. G. (2006) C1 domains exposed. From diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 827–837
 13. Pu, Y., Peach, M. L., Garfield, S. H., Wincovitch, S., Marquez, V. E., and Blumberg, P. M. (2006) Effects on ligand interaction and membrane translocation of the positively charged arginine residues situated along the C1 domain binding cleft in the atypical protein kinase C isoforms. *J. Biol. Chem.* **281**, 33773–33788
 14. Yu, B., Martins, I. R., Li, P., Amarasinghe, G. K., Umetani, J., Fernandez-Zapico, M. E., Billadeau, D. D., Machius, M., Tomchick, D. R., and Rosen, M. K. (2010) Structural and energetic mechanisms of cooperative autoinhibition and activation of Vav1. *Cell* **140**, 246–256
 15. Rapley, J., Tybulewicz, V. L., and Rittinger, K. (2008) Crucial structural role for the PH and C1 domains of the Vav1 exchange factor. *EMBO Rep.* **9**, 655–661
 16. Chrencik, J. E., Brooun, A., Zhang, H., Mathews, I. I., Hura, G. L., Foster, S. A., Perry, J. J., Streiff, M., Ramage, P., Widmer, H., Bokoch, G. M., Tainer, J. A., Weckbecker, G., and Kuhn, P. (2008) Structural basis of guanine nucleotide exchange mediated by the T-cell essential Vav1. *J. Mol. Biol.* **380**, 828–843
 17. Gulbins, E., Coggeshall, K. M., Baier, G., Telford, D., Langlet, C., Baier-Bitterlich, G., Bonnefoy-Berard, N., Burn, P., Wittinghofer, A., and Altman, A. (1994) Direct stimulation of Vav guanine nucleotide exchange activity for Ras by phorbol esters and diglycerides. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4749–4758
 18. Kazanietz, M. G., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Kolch, W., Mischak, H., Wong, G., Pettit, G. R., Bruns, J. D., and Blumberg, P. M. (1994) Zinc finger domains and phorbol ester pharmacophore. Analysis of binding to mutated form of protein kinase C ζ and the *vav* and *c-raf* proto-oncogene products. *J. Biol. Chem.* **269**, 11590–11594
 19. Bustelo, X. R. (2000) Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1461–1477
 20. Hornstein, I., Mortin, M. A., and Katzav, S. (2003) DroVav, the *Drosophila melanogaster* homologue of the mammalian Vav proteins, serves as a signal transducer protein in the Rac and DER pathways. *Oncogene* **22**, 6774–6784
 21. Tybulewicz, V. L. (2005) Vav family proteins in T-cell signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 267–274
 22. Bustelo, X. R. (2001) Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* **20**, 6372–6381
 23. Katzav, S., Martin-Zanca, D., and Barbacid, M. (1989) *vav*, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J.* **8**, 2283–2290
 24. Movilla, N., and Bustelo, X. R. (1999) Biological and regulatory properties of Vav-3, a new member of the Vav family of oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7870–7885
 25. Henske, E. P., Short, M. P., Jozwiak, S., Bovey, C. M., Ramlakhan, S., Haines, J. L., and Kwiatkowski, D. J. (1995) Identification of VAV2 on 9q34 and its exclusion as the tuberous sclerosis gene *TSC1*. *Ann. Hum. Genet.* **59**, 25–37
 26. Dustin, M. L., and Shaw, A. S. (1999) Costimulation. Building an immunological synapse. *Science* **283**, 649–650
 27. Fischer, K. D., Zmuldzinas, A., Gardner, S., Barbacid, M., Bernstein, A., and Gidos, C. (1995) Defective T-cell receptor signaling and positive selection of Vav-deficient CD4⁺ CD8⁺ thymocytes. *Nature* **374**, 474–477
 28. Katzav, S. (2009) Vav1. A hematopoietic signal transduction molecule involved in human malignancies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1245–1248
 29. Katzav, S. (2007) Flesh and blood. The story of *Vav1*, a gene that signals in hematopoietic cells but can be transforming in human malignancies. *Cancer Lett.* **255**, 241–254
 30. Fernandez-Zapico, M. E., Gonzalez-Paz, N. C., Weiss, E., Savoy, D. N., Molina, J. R., Fonseca, R., Smyrk, T. C., Chari, S. T., Urrutia, R., and Billadeau, D. D. (2005) Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer Cell* **7**, 39–49
 31. Prieto-Sánchez, R. M., Hernández, J. A., García, J. L., Gutiérrez, N. C., San Miguel, J., Bustelo, X. R., and Hernández, J. M. (2006) Overexpression of the VAV proto-oncogene product is associated with B-cell chronic lymphocytic leukemia displaying loss on 13q. *Br. J. Haematol.* **133**, 642–645
 32. Bartolomé, R. A., Molina-Ortiz, I., Samaniego, R., Sánchez-Mateos, P., Bustelo, X. R., and Teixidó, J. (2006) Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer Res.* **66**, 248–258
 33. Movilla, N., Dosil, M., Zheng, Y., and Bustelo, X. R. (2001) How Vav proteins discriminate the GTPases Rac1 and RhoA from Cdc42. *Oncogene* **20**, 8057–8065
 34. Booden, M. A., Campbell, S. L., and Der, C. J. (2002) Critical but distinct roles for the pleckstrin homology and cysteine-rich domains as positive modulators of Vav2 signaling and transformation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2487–2497
 35. Zugaza, J. L., López-Lago, M. A., Caloca, M. J., Dosil, M., Movilla, N., and Bustelo, X. R. (2002) Structural determinants for the biological activity of Vav proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 45377–45392
 36. Heo, J., Thapar, R., and Campbell, S. L. (2005) Recognition and activation of Rho GTPases by Vav1 and Vav2 guanine nucleotide exchange factors. *Biochemistry* **44**, 6573–6585
 37. Lewin, N. E., and Blumberg, P. M. (2003) [³H]Phorbol 12,13-dibutyrate binding assay for protein kinase C and related proteins. *Methods Mol. Biol.* **233**, 129–156
 38. Wang, Q. J., Fang, T. W., Nacro, K., Marquez, V. E., Wang, S., and Blumberg, P. M. (2001) Role of hydrophobic residues in the C1b domain of protein kinase C δ on ligand and phospholipid interactions. *J. Biol. Chem.* **276**, 19580–19587
 39. El Kazzouli, S., Lewin, N. E., Blumberg, P. M., and Marquez, V. E. (2008) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol. 30. An investigation of diacylglycerol-lactones containing heteroaryl groups reveals compounds with high selectivity for Ras guanyl nucleotide-releasing proteins. *J. Med. Chem.* **51**, 5371–5386
 40. Raifman, O., Kolusheva, S., El Kazzouli, S., Sigano, D. M., Kedei, N., Lewin, N. E., Lopez-Nicolas, R., Ortiz-Espin, A., Gomez-Fernandez, J. C., Blumberg, P. M., Marquez, V. E., Corbalan-Garcia, S., and Jelinek, R. (2010) Membrane-surface anchoring of charged diacylglycerol-lactones correlates with biological activities. *ChemBioChem* **11**, 2003–2009
 41. Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., and Taylor, R. (1997) Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **267**, 727–748
 42. MacroModel, Version 9.8, Schrödinger, LLC, New York 2010
 43. Steinkellner, G., Rader, R., Thallinger, G. G., Kratky, C., and Gruber, K. (2009) VASCo. Computation and visualization of annotated protein surface contacts. *BMC Bioinformatics* **10**, 32
 44. Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., and Wendoloski, J. J. (1998) Prediction of hydrophobic (lipophilic) properties of small organic molecules using fragmental methods. An analysis of ALOGP and CLOGP methods. *J. Phys.*

- Chem. A* **102**, 3762–3772
45. Sanner, M. F., Olson, A. J., and Spehner, J. C. (1996) Reduced surface. An efficient way to compute molecular surfaces. *Biopolymers* **38**, 305–320
 46. Heiden, W., Moeckel, G., and Brickmann, J. (1993) A new approach to analysis and display of local lipophilicity/hydrophilicity mapped on molecular surfaces. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **7**, 503–514
 47. Canagarajah, B., Leskow, F. C., Ho, J. Y., Mischak, H., Saidi, L. F., Kazanietz, M. G., and Hurley, J. H. (2004) Structural mechanism for lipid activation of the Rac-specific GAP, β 2-chimerin. *Cell* **119**, 407–418
 48. Leonard, T. A., Róycki, B., Saidi, L. F., Hummer, G., and Hurley, J. H. (2011) Crystal structure and allosteric activation of protein kinase C β II. *Cell* **144**, 55–66
 49. Pu, Y., Perry, N. A., Yang, D., Lewin, N. E., Kedei, N., Braun, D. C., Choi, S. H., Blumberg, P. M., Garfield, S. H., Stone, J. C., Duan, D., and Marquez, V. E. (2005) A novel diacylglycerol-lactone shows marked selectivity *in vitro* among C1 domains of protein kinase C (PKC) isoforms α and δ as well as selectivity for RasGRP compared with PKC α . *J. Biol. Chem.* **280**, 27329–27338
 50. Stahelin, R. V., Digman, M. A., Medkova, M., Ananthanarayanan, B., Rafter, J. D., Melowic, H. R., and Cho, W. (2004) Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase C δ . *J. Biol. Chem.* **279**, 29501–29512
 51. Irie, K., Nakagawa, Y., and Ohigashi, H. (2004) Indolactam compounds as new medicinal leads with binding selectivity for C1 domains of protein kinase C isozymes. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 1371–1385
 52. Oancea, E., Teruel, M. N., Quest, A. F., and Meyer, T. (1998) Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J. Cell Biol.* **140**, 485–498
 53. Farah, C. A., Nagakura, I., Weatherill, D., Fan, X., and Sossin, W. S. (2008) Physiological role for phosphatidic acid in the translocation of the novel protein kinase C Apl II in *Aplysia* neurons. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4719–4733
 54. Cho, W., and Stahelin, R. V. (2005) Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **34**, 119–151
 55. Ahmed, S., Kozma, R., Lee, J., Monfries, C., Harden, N., and Lim, L. (1991) The cysteine-rich domain of human proteins, neuronal chimaerin, protein kinase C, and diacylglycerol kinase binds zinc. Evidence for the involvement of a zinc-dependent structure in phorbol ester binding. *Biochem. J.* **280**, 233–241
 56. Kazanietz, M. G., Wang, S., Milne, G. W., Lewin, N. E., Liu, H. L., and Blumberg, P. M. (1995) Residues in the second cysteine-rich region of protein kinase C δ relevant to phorbol ester binding as revealed by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 21852–21859
 57. Dries, D. R., Gallegos, L. L., and Newton, A. C. (2007) A single residue in the C1 domain sensitizes novel protein kinase C isoforms to cellular diacylglycerol production. *J. Biol. Chem.* **282**, 826–830
 58. Chen, J., Deng, F., Li, J., and Wang, Q. J. (2008) Selective binding of phorbol esters and diacylglycerol by individual C1 domains of the PKD family. *Biochem. J.* **411**, 333–342
 59. Furet, P., Sele, A., and Cohen, N. C. (1988) 3D molecular lipophilicity potential profiles. A new tool in molecular modeling. *J. Mol. Graphics* **6**, 182–189
 60. Delano, W. L. (2002) *The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 0.99 Ed., DeLano Scientific, Palo Alto, CA
 61. Neubert, R. (1989) Ion pair transport across membranes. *Pharm. Res.* **6**, 743–747
 62. Miller, J. M., Dahan, A., Gupta, D., Varghese, S., and Amidon, G. L. (2010) Enabling the intestinal absorption of highly polar antiviral agents. Ion-pair facilitated membrane permeation of zanamivir heptyl ester and guanidino oseltamivir. *Mol. Pharm.* **7**, 1223–1234
 63. Duan, D., Sigano, D. M., Kelley, J. A., Lai, C. C., Lewin, N. E., Kedei, N., Peach, M. L., Lee, J., Abeyweera, T. P., Rotenberg, S. A., Kim, H., Kim, Y. H., El Kazzouli, S., Chung, J. U., Young, H. A., Young, M. R., Baker, A., Colburn, N. H., Haimovitz-Friedman, A., Truman, J. P., Parrish, D. A., Deschamps, J. R., Perry, N. A., Surawski, R. J., Blumberg, P. M., and Marquez, V. E. (2008) Conformationally constrained analogues of diacylglycerol. 29. Cells sort diacylglycerol-lactone chemical zip codes to produce diverse and selective biological activities. *J. Med. Chem.* **51**, 5198–5220
 64. Norman, K. R., Fazio, R. T., Mellem, J. E., Espelt, M. V., Strange, K., Beckerle, M. C., and Maricq, A. V. (2005) The Rho/Rac-family guanine nucleotide exchange factor VAV-1 regulates rhythmic behaviors in *C. elegans*. *Cell* **123**, 119–132
 65. Dekel, I., Russek, N., Jones, T., Mortin, M. A., and Katzav, S. (2000) Identification of the *Drosophila melanogaster* homologue of the mammalian signal transducer protein, Vav. *FEBS Lett.* **472**, 99–104
 66. Johnson, J. E., Goulding, R. E., Ding, Z., Partovi, A., Anthony, K. V., Beaulieu, N., Tazmini, G., Cornell, R. B., and Kay, R. J. (2007) Differential membrane binding and diacylglycerol recognition by C1 domains of RasGRPs. *Biochem. J.* **406**, 223–236
 67. Irie, K., Nakagawa, Y., and Ohigashi, H. (2005) Toward the development of new medicinal leads with selectivity for protein kinase C isozymes. *Chem. Rec.* **5**, 185–195
 68. Melowic, H. R., Stahelin, R. V., Blatner, N. R., Tian, W., Hayashi, K., Altman, A., and Cho, W. (2007) Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase C θ . *J. Biol. Chem.* **282**, 21467–21476
 69. Hornstein, I., Alcover, A., and Katzav, S. (2004) Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell. Signal.* **16**, 1–11