

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

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés

**Írta:
Dr. Griger Zoltán**

**Témavezető:
Dr. Bíró Tamás, egyetemi docens
Dr. Kovács László, akadémikus, egyetemi tanár**



TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	3
<i>Szisztémás lupus erythematosus</i>	3
<i>A PKC izoenzimek szerepe egészséges és SLE-s humán limfocitákban</i>	8
<i>A PKC izoenzimek szerepe egészséges és SLE-s humán monocitákban</i>	10
<i>A MonoMac-6 sejtek</i>	12
CÉLKITŰZÉSEK	14
BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	16
<i>A vizsgált betegek</i>	16
<i>A tisztított T-sejtek és monociták preparálása</i>	17
<i>A MonoMac-6 sejtek tenyésztése</i>	17
<i>A PKC izoformák tranzienst transzfekciója</i>	18
<i>Áramlási citometria</i>	18
<i>RNS interferencia (siRNS)</i>	19
<i>Antitestek</i>	19
<i>Western (immuno)blot</i>	19
<i>A sejtproliferáció vizsgálata</i>	21
<i>Arachidonsavfelszabadulás vizsgálata</i>	22
<i>Statisztikai elemzések</i>	22
EREDMÉNYEK	23
<i>A PKC izoenzimek kvantitatív expressziója különböző autoimmun betegekből és egészséges önkéntesekből származó T-limfocitákban</i>	23
<i>Változások a PKC izoenzimek expressziójában szteroid kezelésben részesült, illetve nem részesült SLE-s betegek monocitáiban</i>	25
<i>In vitro kortikoszteroid kezelés hatása a PKC rendszer expressziójára és az AA termelésre</i>	27
<i>A MonoMac-6 sejtvonal PKC rendszere</i>	29
<i>A PMA szerepe a MonoMac-6 sejtek proliferációjának és AA termelésének szabályozásában</i>	30
<i>A cPKCβ és a nPKCδ overexpressziója fokozza a MonoMac-6 sejtek bazális, míg a cPKCα transzfekciója gátolja a PMA-indukált AA felszabadulást</i>	33
<i>A cPKCβ és nPKCδ AA termelést fokozó hatását kalcium-independens PLA$_2$ és DAG lipáz útvonalon keresztül fejti ki</i>	36
<i>A cPKCβ és nPKCδ pozitív, míg a cPKCα negatív módon szabályozza a MonoMac-6 sejtek proliferációját</i>	38
<i>Kortikoszteroid kezelés a MonoMac-6 sejtekben kizárólag a nPKCϵ „up-regulációját” eredményezi</i>	40
MEGBESZÉLÉS	43
<i>Számos PKC izoenzim expressziós szintje csökkent az SLE-s betegek T-limfocitáiban az egészséges kontrollhoz viszonyítva</i>	43
<i>Csökkent nPKCδ és ϵ expresszió az SLE-s betegek monocitáiban, melyeket a szteroid kezelés normalizál</i>	44
<i>A nPKCδ és a cPKCβ központi szereppel bír a MonoMac-6 sejtek proliferációjának és AA termelésének serkentésében</i>	45
<i>A cPKCα kismértékben gátolja, míg a nPKCϵ és az aPKCζ nem befolyásolja a MonoMac-6 sejtek proliferációját és AA termelését</i>	47
<i>Kísérleteink klinikai jelentőségei, eredményeink potenciális hasznosítása</i>	49
ÖSSZEFOGLALÁS	52
IRODALOMJEGYZÉK	53
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	65
KÖZLEMÉNYEK	66

BEVEZETÉS

Szisztémás lupus erythematosus

A szisztémás lupus erythematosus (SLE) a poliszisztémás autoimmun betegségek egyik jelentős képviselője, ami a T- és B-sejtek, valamint az antigén-prezentáló sejtek (APC) diszregulációjával jellemezhető [Kyttaris és mtsai 2006]. A megváltozott sejtműködés patológiás autoantitest termelést indukál, ami a legtöbb szerv (leggyakrabban az ízületek, savós hártyák, bőr, vese, központi idegrendszer) gyulladással érintettségéhez vezet. A betegségre jellemző a női dominancia, lefolyását tekintve a váltakozó súlyosságú exacerbációk és remissziók megjelenése. A betegség aktivitásának mérésére számos indexet dolgoztak ki, melyek közül az egyik az SLE Disease Activity Index (SLEDAI) [Bombardier és mtsai, 1992].

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

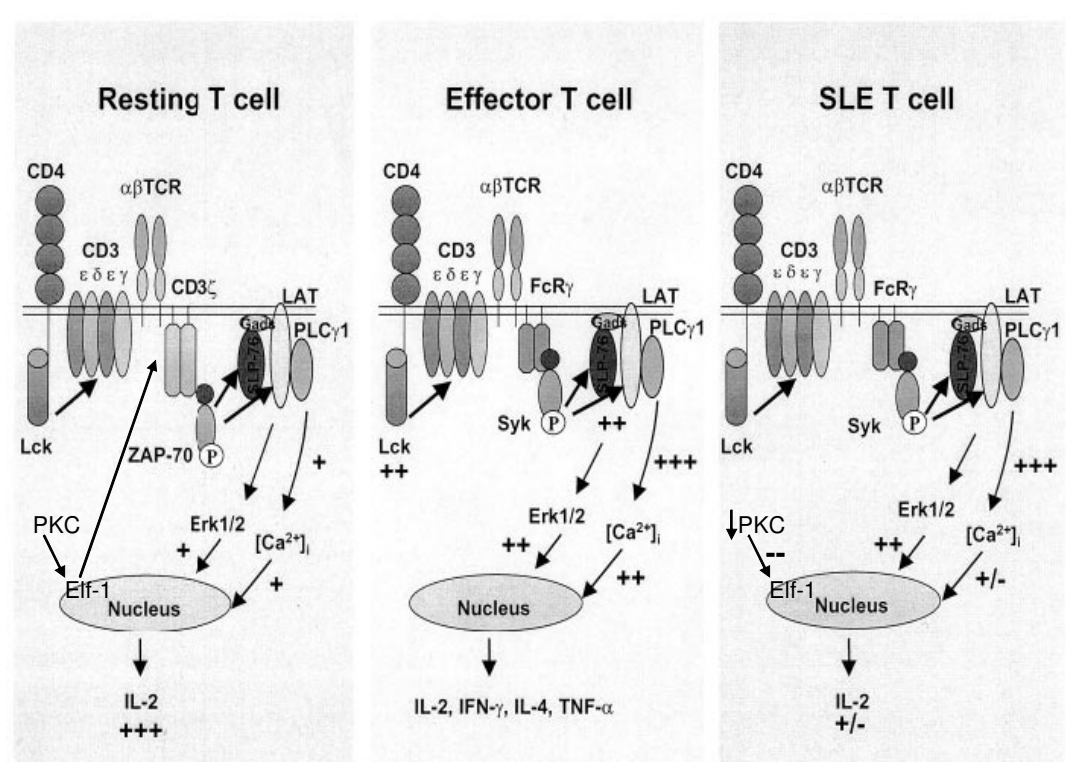
Gyakorlatilag minden beteg kórtörténetében megtalálható az anaemia, aminek hátterében számos tényező állhat. Ide tartozik a betegség aktivitása, veseelégtelenség, hemolízis (autoimmun hemolitikus anaemia), hiperszplénia, mielofibrózis, illetve az autoimmun aplasztikus anaemia, emellett akár a gyógyszeres kezelés mellékhatása is eredményezhet anaemiát [Nossent és mtsai, 1991; Keeling és mtsai, 1993; Voulgarelis és mtsai, 2000]. A betegek mintegy 50 %-ban mutatható ki leukopénia, ami leginkább a betegség aktivitását tükrözi. Neutropénia fordul elő leginkább a gyógyszeres terápia (cyclophosphamid, azathioprin) mellékhatásaként, emellett csontvelő-elégtelenség, illetve direkt immunreakció

következménye is lehet [Shoenfeld és Ehrenfeld, 1996]. A limfocitopénia az SLE-s betegek 75 %-át is érintheti, leginkább a betegség aktív periódusa alatt jelentkeznek. A sejtek fokozott apoptózisa szintén hozzájárulhat a csökkent limocitaszám kialakulásához, amit a T-sejtek emelkedett Fas antigén expressziója magyaráz [Amasaki és mtsai, 1995]. A betegek 25-50 %-ban fordul elő enyhe thrombocitopénia (100-150 G/l), míg az esetek 10 %-ban súlyos thrombopenia alakul ki (<50 G/l). A csökkent vérlemezkeszám hátterében is leggyakrabban autoimmun reakció áll [Laurence és mtsai, 1992; Budman és Steinberg, 1977].

A betegség etiológiája és patogenezise multifaktoriális, a mai napig sem ismert minden részletében. Bebizonyosodott ugyanakkor, hogy a kórkép kialakulásában számos genetikai, hormonális és környezeti faktor játszik szerepet. A genetikai tényezők fontosságára utal például az autoimmun betegségek halmozódása az SLE-s családokban, vagy az egyetű ikreken elvégzett konkordanciavizsgálatok. A hormonális tényezők szerepére hívja fel a figyelmet a kifejezett női dominancia, míg a környezeti faktorok közül a fertőző ágensek, ultraibolya sugárzás, valamint bizonyos gyógyszerek említhetők meg, amelyek hozzájárulhatnak a betegség exacerbációjához, súlyosbodásához. Az utóbbi időben egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a betegség patomechanizmusában alapvető szerepet játszik - illetve egyik legfontosabb kezdeti és fenntartó tényező - az autoreaktív T-sejtek kialakulása, ami végeredményben patológiás autoantitesteket termelő B-sejtek keletkezéséhez vezet.

A T-sejt aktivációt a T-sejt receptornak (TCR) az antigénnel konjugált fő hisztokompatibilitási komplexszel (MHC/Ag) történő kontaktusa indítja be, ami biokémiai események sorozatát mediálja, átjuttatva ezzel a T-sejt felszínéről a szignált a sejtmagba [Krishnan és mtsai, 2003]. Ennek hatására számos gén transzkripciója változik meg, elősegítve a T-sejtek proliferációját és differenciációját. A fokozott T-sejt aktivitás hozzájárul a B-sejtek autoantitest termeléséhez és ezzel az autoimmun folyamat fellángolásához. A TCR MHC/Ag komplexszel történő kapcsolódása a TCR alegységek különböző kinázok általi

foszforilációjához vezet, amelyek serkentik a T-sejt specifikus ζ -asszociált protein 70 (ZAP-70) működését [Jordan és mtsai, 2003]. A ZAP-70 egy tirozin-kináz aktivitással bíró fehérje, amely foszforilálni képes a T-sejtek aktiválódásában részt vevő adapter molekulákat (linker for activation of T cells, LAT), beindítva ezzel egy foszforilációs kaszkád eseménysort, ami kalciumbeáramláshoz, a mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) aktiválódásához és a sejtmagban történő géntranszkripció módosításához vezet (1. ábra bal oldali és középső panel) [Clements és mtsai, 1999; Kane és mtsai, 2000].

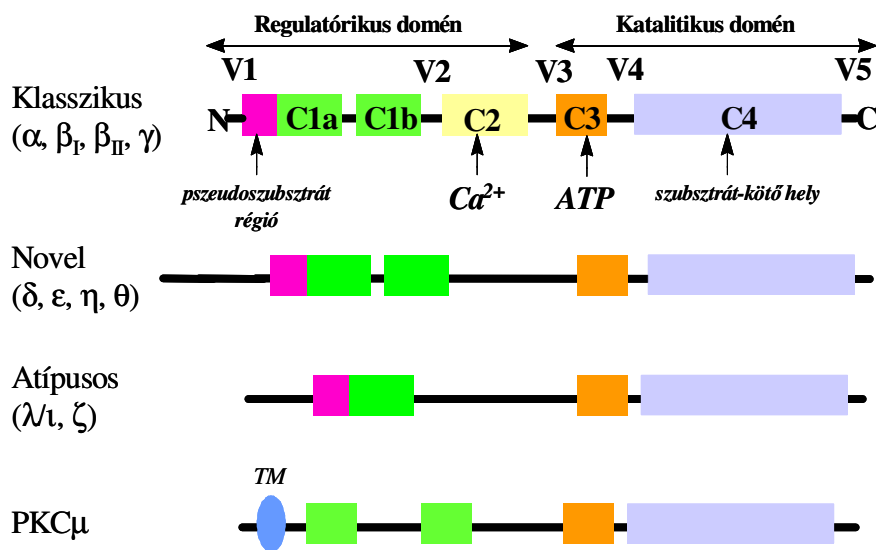


1. ábra A T-sejt receptor szerepe a szignáltranszdukcióban az effektor T-sejtekké történő differenciáció során és SLE-ben (Krishnan és mtsai, 2003 alapján módosítva)

A protein kináz C izoenzimek

A protein kináz C (PKC) izoenzimcsalád a szerin-threonin kinázok egyik jelentős képviselője. A mai napig 11 különböző PKC izoenzimet különböztettek meg [Nishizuka, 1988, Jaken, 1996], melyeket aktivációs mechanizmusaik és szerkezeti jellegük alapján 4 nagyobb csoportba sorolhatunk (**2. ábra**).

A „klasszikus” csoportba (cPKC) a cPKC α , β I, β II és a γ izoenzimek tartoznak. Ezen izoformák közös jellemzője, hogy diacil-glicerol (DAG) és kalcium-dependensek, vagyis aktiválódásukhoz ezen anyagokat kofaktorként igénylik. A második csoportba a kalcium-független, de DAG-függő „novel” nPKC δ , ϵ , η és θ izoenzimek tartoznak. Közös tulajdonságuk, hogy kalcium nélkül, diacil-glicerollal (illetve annak exogén megfelelőjeként bizonyos forbol-észterekkel) is maximálisan aktiválhatók. A harmadik csoportba az „atípusos” izoenzimek sorolhatók (aPKC), melyek közé az aPKC ζ és λ /I tartoznak. Jellemzőjük, hogy aktiválódásukhoz sem kalciumot, sem forbol-észtert nem igényelnek. A negyedik csoportot egyetlen enzim alkotja, a PKC μ (újabb nevén a PKD), mely mind aktivációját, mind struktúráját tekintve rendhagyó izoformának tekinthető.



2. ábra. A protein kináz C izoenzimek szerkezeti jellemzői

A PKC izoformák általános aktiválódásának sémája egy többlépcsős eseménysorral jellemezhető [Nishizuka, 1988; Jaken, 1996; Nishizuka, 1992]:

– az aktivátor molekulák regulátor doménhez való kötődése olyan konformációváltozást indukál, amelynek hatására a főként citoszólikus enzim pszeudoszubsztrát régiója eltávolodik a katalitikus domén szubsztrátkötő régiójáról, így az szabadabbá válik a foszforilálandó szubsztrát számára;

– ezután az enzim a C1 doménon keresztül egy intracelluláris struktúrához (sejtmembrán, Golgi-komplex, maghártya, citoskeletális komponensek) transzlokálódik, majd a katalitikus C3 domén foszforilálja az enzimre specifikus szubsztrátot (pl. citoskeletális fehérjék, ioncsatornák, receptorok, transzkripciós faktorok, kinázok, foszfatázok);

– a tartós enzimaktivitás elkerülésére intracelluláris proteolitikus enzimek az aktivált PKC enzimet hasítják és lebontják (down-reguláció).

A humán szervezet minden sejtípusa rendelkezik valamely PKC izoformával, illetve izoformákkal. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy nem mindegyik izoenzim található meg minden sejtípusban; azaz a PKC izoenzimek a szervezetben az adott szövetre, valamint sejtre jellemző megoszlást és mintázatot mutatnak [Goodnight és mtsai, 1994; Nishizuka, 1988, 1992; Gutcher és mtsai, 2003; Way és mtsai, 2000]. Ezen megoszlás gazdagságából fakad, hogy a PKC enzimek az élettani szabályozó folyamatok legszélesebb skáláját képesek befolyásolni. Alapvető és központi szereppel bírnak (a teljesség igénye nélkül) például a sejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában, a programozott sejthalál (apoptózis) folyamatsorában, meghatározott sejtípusok által termelt mediátorok (vazoaktív anyagok, növekedési faktorok, citokinek) szintézisének szabályozásában, ingerlékeny szövetek elektrofiziológiai jellegzetességeinek (csatornaaktivitás, akciós potenciál kódolás, izomkontrakció) optimális kialakításában, a központi idegrendszer integritásának és működésének fenntartásában, a szervezet védekező mechanizmusainak regulációjában

(fagocitózis, immunglobulin termelés), stb. [Nishizuka, 1988, 1992; Jaken, 1996; Gutcher és mtsai, 2003; Decker, 2003; Becker és Hannun, 2005].

Az utóbbi időben azonban egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a PKC izoenzimek nemcsak szerkezeti, aktivációs és megoszlási heterogenitást mutatnak, hanem regulációjuk és biológiai szerepük is jelentősen különböz(het)ik egymástól [Nishizuka, 1992; Decker, 2003]. Bebizonyosodott emellett az is, hogy egy adott sejtválasz (különös tekintettel a proliferáció és differenciálódás) kialakításában a különböző izoenzimek nemcsak eltérő aktivitással vehetnek részt, de hatásuk gyakran ellentétesnek adódik. Így például kiderült, hogy K-562 erythroleukémia sejtvonalban a cPKC α felelős a forbol-észter által indukált citosztázis kialakulásáért, míg a cPKC β_{II} ezen sejtek proliferációjában játszik szerepet [Murray és mtsai, 1993]. Humán keratinocytákban [Papp és mtsai, 2004] és NIH 3T3 fibroblasztokban [Mischak és mtsai, 1993] kimutatták azt is, hogy míg a nPKC δ megállította a sejtek proliferációját, addig a nPKC ϵ fokozta azt. Ezzel ellentétben C2C12 izomsejteken a cPKC α és β csökkentette a sejtek növekedési ütemét, az nPKC ϵ nem befolyásolta azt, míg az nPKC δ konstitutív overexpressziója drámai módon megnövelte a sejtek *in vitro* proliferációját, lecsökkentette a differenciálódási marker dezmin kifejeződését, valamint *in vivo* igen nagyméretű, malignusan transzformált daganatok kialakulását indukálta immunhiányos egerekben. Emellett igazolódott, hogy humán vázizomsejteken az izomregeneráció folyamatának egyik központi molekulája, az IGF-I mitogén (azaz növekedést és differenciálódást fokozó) hatásának kifejlődésében a PKC izoformák közül a nPKC δ izoenzim bír kizárólagos szereppel. [Czifra és mtsai, 2006].

A PKC izoenzimek szerepe egészséges és SLE-s humán limfocitákban

Számos tanulmány igazolta, hogy a PKC izoenzimek központi szerepet töltenek be a limfociták sejtfolyamatainak szabályozásában is. Az SLE-s T-sejtek esetében nagyszámú

olyan protein expressziójában írtak le változásokat, amelyek a korábban bemutatott **(1. ábra)** szignáltranszdukciós útvonal alkotóelemei, illetve annak szabályozásában töltnek be alapvető szerepet. Számos párhuzam vonható az egészséges egyének effektor T-sejtjei, valamint SLE-s betegek frissen izolált T-sejtjei között **(1. ábra középső és jobb oldali panel)**. Tada és munkatársai 1991-ben igazolták, hogy az SLE-s betegek T-sejtjeiben csökkent protein kináz C aktivitás mutatható ki [Tada és mtsai, 1991]. Ismert emellett az is, hogy az SLE-s T-sejtek csökkent TCR ζ lánc expresszióval rendelkeznek [Liossis, Ding és mtsai 1998], ami egy sokkal potensebb 1-es típusú FcR γ lánc kapcsolódását eredményezi a receptorhoz, megváltoztatva ezzel a további szignáltranszdukciós kaszkád működését [Enyedy és mtsai, 2001], fokozott kalciumbeáramlást, abnormális cAMP regulációt [Kammer és mtsai, 1996] és facilitált intracelluláris foszforilációt eredményez [Liossis, Sfikakis, és mtsai, 1998]. A megváltozott TCR ζ lánc expresszió hátterében a gén csökkent transzkripciója áll, aminek szabályozásában az Elf-1 (E-74-like faktor) transzkripciós faktor, az Ets (E-26-specifikus) transzkripciós család tagja játszik központi szerepet **(1. ábra, bal oldali panel)** [Rellahan és mtsai, 1998; Leiden és mtsai, 1992; Gottschalk és mtsai, 1993; Wang és mtsai, 1994]. Ismert emellett az is, hogy SLE-s T-sejtekben az Elf-1 transzkripciós faktor aktív formájának molekuláris defektusa jött létre, ami a molekula abnormis poszttranszlációs módosításának következménye. Több hipotézis szól emellett, hogy az Elf-1 transzkripciós faktor defektusának (és ezáltal a csökkent TCR ζ lánc expressziójának) hátterében a molekula csökkent foszforilációja áll, ami az SLE-s T-sejtek szuprimált PKC aktivitásának következménye **(1. ábra jobb oldali panel)** [Juang és mtsai, 2002].

A T-sejtek ezen jelátviteli abnormalitásainak egyik következménye SLE-ben a megváltozott citokintermelés, melyek közül alapvető jelentőséggel bír a T-sejtek csökkent interleukin-2 (IL-2) produkciója [Horwitz és mtsai, 1997; Linker-Israeli és mtsai, 1983; Alcocer-Valera és mtsai, 1982]. Ezzel párhuzamban kimutatták, hogy a cPKC α és a nPKC θ

serkenti az egészséges humán T-sejtek IL-2 receptor expresszióját, ugyanakkor a cPKC β , valamint nPKC δ és ϵ fokozza a sejtek IL-2 szintézisét [Szamel és mtsai, 1998; Long és mtsai, 2001]. A nPKC θ központi szerepére hívja fel a figyelmet az is, hogy a T-sejt aktiváció során ezen izoforma az immunológiai szinapszisokban található lipid raftokba transzlokálódik [Bi és mtsai, 2001]. Wong és munkatársai vizsgálták SLE-s és egészséges T-sejtek nukleáris faktor κ B (NF- κ B) aktivitását, melyről ismert, hogy egy olyan transzkripció faktor, ami nagyszámú immunválaszban részt vevő mediátor (köztük például az IL-2) transzkripcióját szabályozza [Musso és mtsai, 1996; Shannon és mtsai, 1995; Delphin és Stavnezer, 1995; Kasibhatla és mtsai, 1999], illetve a gyulladáscsökkentő gyógyszerek target molekulája is [Auphan és mtsai, 1995]. Az eredmények szerint az SLE-s betegek T-sejtjeiben jelentősen csökkent az NF- κ B aktivitása [Wong és mtsai, 1999], aminek hátterében esetlegesen az nPKC θ megváltozott működése állhat [Coudronniere és mtsai, 2000]. Szintén ezt a hipotézist erősíti meg, hogy Jurkat T-sejtekben a nPKC θ transzfekciója jelentősen növelte az IL-2 termelést [Fujii és mtsai, 2006].

A PKC izoenzimek szerepe egészséges és SLE-s humán monocitákban

A monociták esetében a sejtek aktivációja szintén számos jelátviteli útvonal indukcióját eredményezi. A PKC enzimcsalád esetleges szerepével kapcsolatban azonban már kevesebb adat áll rendelkezésre az irodalomban, aminek hátterében feltehetőleg a biokémiai és molekuláris biológia technikák végrehajtásához szükséges elegendő számú sejt szeparálási nehézségei állhatnak, hiszen a monociták a perifériás mononukleáris sejtek sokkal kisebb százalékát alkotják. Másrészt az irodalmi adatok gyakran heterogén információkat közölnek. Bebizonyosodott például, hogy a PKC izoenzimek központi, egymással ellentétes szerepet töltenek be a humán monociták FC-gamma receptor mediált intracelluláris ölü mechanizmusainak szabályozásában (cPKC β fokozta, míg a cPKC α és az nPKC ϵ gátolta)

[Zheng és mtsai, 1995]. Azt is leírták továbbá, hogy különböző PKC izoenzimek, úgymint a cPKC α és β , a nPKC δ és ϵ funkciója elengedhetelen a monociták proinflammatorikus citokintermeléséhez (TNF α , IL-1- β , IL-6) [Kontny és mtsai, 1999]. Ezzel ellentétben a bakteriális lipopoliszacharidok (LPS) által aktivált humán monociták sejtválasza, nevezetesen a TNF α , IL-1, és IL-6 termelés az aPKC ζ aktiválódásán keresztül valósul meg [Herrera-Velit és mtsai, 1997].

Fontos eközben megjegyezni, hogy a sejtek fagocitotikus aktivitása és gyulladásoz mediátortermelése nagymértékben függ a foszfolipáz A₂ enzimcsalád működésétől, így az arachidonsav (AA) termelésétől [Smith és mtsai, 2000; Balsinde és mtsai, 2002]. Ismeretes, hogy az AA szintézisben központi szerepet játszó PLA₂ enzimek - úgymint a citoszolikus foszfolipáz A₂ (cPLA₂), a kalcium-független foszfolipáz A₂ (iPLA₂) és a diacilglicerol (DAG) lipáz - „down-stream” targetjei lehetnek a különböző PKC izoenzimeknek [Karimi és Lennartz, 1995; Lin és Chen, 1998; Guidarelli és mtsai, 2005]. Leírták, hogy a PKC rendszer, nevezetesen a cPKC α , a kalcium-független iPLA₂ aktiválása révén serkenti az AA felszabadulást P388D1 makrofágokban [Akiba és mtsai, 2002]. Ezzel ellentétben a J774 makrofágokban a metil-arachidonil-fluorofoszfónát (MAFP), szintén a PKC által, de a cPLA₂ és iPLA₂ gátlása révén fokozta a sejtek prosztaglandin E₂ (PGE₂) szintézisét a PKC-ERK-p38MAPK-függő útvonalon [Lin és Chen, 1999]. Karimi és Lennartz igazolták, hogy egy humán monocitoid sejtvonal, a MonoMac-6 sejtek esetében, a PKC-nak (habár nem írták le, hogy mely izoformáknak) van alapvető szerepe a sejtek IgG mediált fagocitózisának kialakításában [Karimi és Lennartz, 1995], aktiválva a monocitáknál is ismert PKC→PLA₂→AA→fagocitózis jelátviteli útvonalat [Lennartz és Brown, 1991; Lennartz és mtsai, 1993; Zheleznyak és Brown, 1992]. Ezt a teóriát erősítette meg Li és munkatársainak dolgozata, amiben izoformaspecifikus antiszensz oligonukleotidok felhasználásával igazolták, hogy a cPKC α szabályozza a cPLA₂ foszforilációját és enzimatis aktivációját humán

perifériás monocitákban [Li és mtsai, 2007]. Laboratóriumunk korábban kimutatta, hogy az SLE-s betegek monocitáiban jelentősen csökkent az AA termelés az egészséges kontrollhoz viszonyítva [Sipka és mtsai, 2001]. Igazoltuk továbbá azt is, hogy az alkalmazott kortikoszteroid kezelés megemeli (normalizálja) a sejtek AA felszabadulását.

A MonoMac-6 sejtek

A különböző szövetekből izolált és immortalizált sejtvonalak értékes modelleket jelentenek a sejtek jelátviteli folyamatainak tanulmányozása kapcsán, különösen olyan sejtek esetén, melyeket nehéz elegendő mennyiségben izolálni. Ezek közé a sejtek közé tartoznak a primer humán monociták is, melyek relatíve (a limfocitákhoz képest) alacsony százalékban találhatóak meg a perifériás mononukleáris sejtseparátumban. Bár a jelenlegi molekuláris biológiai technikák fejlődése révén mind kevesebb kiindulási sejtmenyiségből is egyre több információhoz lehet jutni, a sejtvonalakkal végzett kísérletek az alapjai a későbbi primer kultúrákból nyert eredményeknek. A mielo-monocitoid differenciációban érintett számos sejtvonal (ideértve az U937 és a THP-1 sejteket) jellegzetességei kerültek már leírásra az irodalomban [Sundstrom és Nilsson, 1976; Tsuchiya és mtsai, 1980; Gallagher és mtsai, 1979; Ohno és mtsai, 1986; Ohta és mtsai, 1986]. Ezek a sejtek a monocita fejlődési vonal korai stádiumait reprezentálják, azaz a sejtek valamilyen ágenssel történő (forbol észter, IFN- γ) differenciáltatása szükséges ahhoz, hogy rendelkezzenek olyan érett monocitákra jellemző tulajdonságokkal, mint például a fagocitózis, vagy az antitest dependens celluláris citotoxicitás. Zeigler-Heitbrock és munkatársai hozták létre a MonoMac-6 sejtvonalat, amely az érett humán monociták számos funkcionális és fenotípusos jellemzőit hordozza [Zeigler-Heitbrock és mtsai, 1988, 1994]. Nevezetesen expresszálják (ellentétben az U937 és THP-1 sejtekkel) a CD14 molekulát, fagocitálják az IgG-opszonizált partikulumokat, reaktív oxigén gyököket termelnek és nonspecifikus észteráz aktivitással rendelkeznek [Zeigler-Heitbrock és

mtsai, 1988]. Ezen adatokra alapozva elmondható, hogy a MonoMac-6 sejtek a legdifferenciáltabb monocitoid sejtvonalak közé tartoznak és kitűnő modellként szolgálnak a monocita sejtfunciók tanulmányozásához.

A PKC izoenzimek szerepével kapcsolatban a MonoMac-6 sejtek esetében azonban igen szegényes adatokkal rendelkezünk az irodalomban. Számos más, a mielo-monocitoid differenciálódás korábbi stádiumában lévő sejt, illetve sejtvonal PKC rendszere azonban már tanulmányozásra került. A THP-1 sejtek esetében például kimutatták, hogy a cPKC α és β egymással ellentétes szerepet tölt be a sejtek differenciálódási, illetve proliferációs folyamatainak szabályozásában. A cPKC α fokozza a THP-1 sejtek differenciálódását, mialatt gátolja a proliferációt, míg ezzel ellentétben a cPKC β serkenti a proliferációt és gátolja a makrofág-szerű sejtekké történő érést [Dieter és Schwende, 2000]. Ehhez hasonlóan a K562 erythroleukémia sejtvonal esetében igazolták, hogy a cPKC β rekombináns overexpressziója növeli, míg a cPKC α csökkenti a sejtproliferációt [Murray és mtsai, 1993]. A nPKC ϵ jelenléte szükséges a MAPK-foszfataz-1 indukciójához LPS által stimulált makrofágokban [Vallador és mtsai, 2000], valamint a bakteriális fertőzések elleni védekezéshez [Castrillo és mtsai, 2001]. Mint már korábban említettük, a MonoMac-6 sejtek esetében ismeretes, hogy a PKC izoenzimcsaládnak alapvető szerepe van a sejtek fagocitózisának és AA termelésének szabályozásában [Karimi és mtsai, 1995]. Nem történt meg még ugyanakkor a sejtek PKC izoforma-mintázatának karakterizálása, összehasonlítása normál humán monocitákéval, emellett szintén nincs információnk a PKC izoenzimek proliferációban betöltött szerepével kapcsolatban.

CÉLKITŰZÉSEK

Ahogy az eddigiekben bemutattuk, meglehetősen kevés információval rendelkezünk a PKC rendszer izoforma- és sejtspecifikus szerepéről autoimmun betegek periériás mononukleáris sejtjeiben. Szerények az eddig ismert eredmények az izoenzimek pontos funkciójáról az immundiszreguláció kialakításában, ezért a kísérleteink első részében a következő célkitűzéseinket fogalmaztuk meg:

1. Meg kívántuk határozni az egészséges humán limfocitákban és monocitákban jelen lévő PKC izoenzimek expressziós mintázatát.
2. Következő lépésként az így kapott eredményeket akartuk összehasonlítani különböző autoimmun betegségben szenvedők hasonló sejtpopulációinak PKC profiljával.
3. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy befolyásolja-e a PKC izoformák kifejeződési szintjét az immunbetegek kezelésében gyakran alkalmazott szteroid terápia, majd meghatároztuk a kortikoszteroid kezelés szerepét a sejtek AA termelésében, mind egészséges önkéntesek, mind SLE-s betegek esetében.

Kísérleteink második részében a PKC izoformák szerepét vizsgáltuk meg a sejtproliferáció és az AA termelés szabályozásában a MonoMac-6 sejtek esetében.

1. Elsőként tanulmányoztuk a MonoMac-6 sejtek PKC expressziós mintázatát mRNA és protein szinten.
2. Ezt követően különböző PKC aktivátorok és szelektív gátlók felhasználásával elemeztük a proliferáció és az AA felszabadulás változását.
3. Ezután molekuláris biológiai technikák (a jelen lévő izoformák transzient overexpressziója, illetve RNA interferencia) segítségével vizsgáltuk az arachidonsavtermelést, illetve a sejtproliferációt.

4. Végezetül célunk volt tanulmányozni az AA termelésben szerepet játszó enzimek és a PKC izoformák kapcsolatát a MonoMac-6 sejtek esetében.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgált betegek

A tanulmány során vizsgált egészséges önkéntesek, illetve betegek a mintavétel előtt mindannyian részletes tájékoztatásban részesültek az Intézeti Etikai Bizottság protokollja szerint, és ezt követően beleegyezésüket adták a vizsgálatok elvégzésére. Az SLE-s populáció 22 betegből (20 nőből és 2 férfiból) állt, az átlagéletkor 36 év volt (21-58 év). Mindannyian rendelkeztek az amerikai reumatológiai társaság (ACR) által meghatározott klasszifikációs kritériumtünetek közül legalább 4-gyel. A betegség aktuális aktivitásának megállapítása a SLEDAI rendszerének felhasználásával történt. A több mint 3,0 SLEDAI értékkel rendelkező betegeket a klinikailag aktív populációba soroltuk. Az átlagos SLEDAI pontszám 3,6 (0-20), míg a betegség átlagos fennállási ideje 5,1 év (2-20) volt. Tizenegy beteg nem részesült kortikoszteroid kezelésben (átlagos SLEDAI: 0,9), míg szintén 11 beteg napi 2-40 mg kortikoszteroid terápiát kapott (átlagos SLEDAI: 6,6). Egy nőbeteg, akinek betegsége az első akut fellángolás során frissen lett diagnosztizálva (SLEDAI: 20), mind a pulzus szteroid kezelés (4x500 mg metilprednizolon/nap, majd 1x250 mg iv.) előtt, mind 8 nappal a terápia megkezdését követően is résztvett a vizsgálatban. A lupus nefritises betegeket nem vontuk be a tanulmányba. Minden beteg szérumában kimutatható volt az anti ds-DNS és az anti-Sm antitestek jelenléte. A vizsgálatban 9 Sjögren szindrómás nőbeteg vett részt, akik átlagéletkora 60,3 év (51-73 év), a betegség átlagos fennállási ideje 10,2 év (4-19 év) volt. SS-A (Ro) elleni antitest pozitivitás 6 esetben, SS-B (La) elleni antitest pozitivitás 4 esetben volt kimutatható. Mindegyik Sjögren-szindrómás beteg alternáló, 8 mg-os másnapenkénti kortikoszteroid kezelésben részesült. A hat kevert kötőszöveti betegségben (MCTD) szenvedő beteg mindegyike nő volt, átlagéletkoruk 48,6 évnek (38-56 év), betegségük átlagos fennállási ideje 16,7 évnek (8-19 év) volt mondható. Minden MCTD-s beteg szérumában jelen volt az

anti-U1-RNP antitest. Két beteg nem részesült szteroid kezelésben, két beteg napi 4 mg metilprednizolont kapott, mialatt 4 beteg másnaponta kapott 8 mg metilprednizolon-t és naponta 100 mg Cytosant. A kontroll populációt 21 egészséges kaukázusi személy alkotta (12 nő és 9 férfi), átlagéletkoruk 41 évnek (21-56 év) mutatkozott.

A tisztított T-sejtek és monociták preparálása

A humán perifériás mononukleáris sejtek szeparálása az SLE-s betegek és egészséges önkéntesek heparinnal alvadásgátolt perifériás véréből történt Boyum módszerét alkalmazva [Boyum, 1968], Ficoll gradiens centrifugálással. A T-sejtek és a monociták preparálásához Magnetic Cell Sorting (MACS) technikát alkalmaztunk [DynaL, 1996]. A sejteket mágnesezen jelzett CD3, illetve CD14 MACS Microbeads antitestekkel inkubáltuk 4 °C-on 15 percig, majd ismételt mosást követően a sejtszuszpenziót MACS szeparátorba helyeztük és a pozitív sejtpopulációt használtuk a további kísérletekhez (a reagenseket és az eszközöket a Miltényi Biotec-től (Bergisch Gladbach, Németország) rendeltük). A szeparálás hatékonyságát a CD3, illetve a CD14 sejtfelszíni markerekre alapozva áramlási citométerrel ellenőriztük (Coulter Epics XL, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), amely során az átlagos monocita tisztaság >85 %-osnak, míg a T-sejtek tisztasága >95 %-osnak mutatkozott.

A MonoMac-6 sejtek tenyésztése

A kísérleteinkben a MonoMac-6 sejteket 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú atmoszférában, lipopoliszacharid-mentes környezetben tenyésztettük RPMI-1640 tápoldatban (Sigma, St. Louis, MO, USA). A médium 10 % főtális borjúsavót (Invitrogen, Paisley, UK), 2 mM L-glutamint, 1 mM nátrium-piruvátot, 0.1 mM nem-esszenciális aminosavakat, 200 U/ml penicillint, 200 µg/ml streptomocint (mindegyik a Sigma-tól) tartalmazott. A sejteket mindig szubkonfluens állapotban, 8x10⁵/ml denzitás elérésekor passzáltuk.

A PKC izoformák tranziens transzfekciója

A MonoMac-6 sejtek transzfekciója az Amaxa nukleofekciós technika (Amaxa, Köln, Németország) használatával történt. A sejteket ($3,5 \times 10^6$ /nukleofekció) centrifugálást követően 100 μ l nukleofektor oldatban (Cell optimization kit, Amaxa) szuszpendáltuk fel, majd az oldathoz 4 μ g zöld fluoreszcens protein (eGFP) konjugált cDNS vektort (amely tartalmazta a különböző PKC izoformákat kódoló szekvenciákat, illetve az üres eGFP vektort, Clontech, Mountain View, CA, USA) adtunk. Ezt követően a sejtsuszpenziót a gyártól rendelt küvettába helyeztük és az Amaxa Nukleofektor készülékben U1 pulzusparamétert használva végeztük el a nukleofekciót. A procedúrát követően a sejteket azonnal előmelegített 37 °C-os tápoldatba helyeztük, majd 48 órán keresztül tenyésztettük 12-lyukú tenyésztőedényekben. A transzfekciós hatékonyságot fluoreszcens mikroszkóppal, áramlási citométerrel, valamint Western blot technikával ellenőriztük (lásd alább).

Áramlási citometria

A szeparációs és transzfekciós hatékonyság, valamint a sejtpusztulás meghatározása áramlási citométer (Coulter Epics XL) használatával történt. A szeparáció effektivitásának vizsgálata során a tisztított T-sejt, illetve monocita sejtpopulációkat fluoreszcens festékkel konjugáltatott monoklonális anti-CD3, illetve anti-CD14 ellenanyagokkal (Beckman Coulter) 25 percig inkubáltunk, majd a sejteket 1 %-os paraformaldehiddel fixáltuk. A sejtpopuláció tisztaságának megállapítása a fluoreszcensen jelzett sejtek százalékos arányának mérésével történt. A MonoMac-6 sejtek esetében a transzfekciót követően a sejteket 12-lyukú tenyésztőedényekben növeltük, majd 24, illetve 48 órával az overexpresszió után végeztük a vizsgálatokat. A transzfekció hatékonyságának az ellenőrzése az eGFP konjugált PKC vektorokat expresszáló sejtek fluoreszcencia intenzitásának meghatározásával történt, míg az

elpusztult sejtek százalékos aránya az előre és oldalra irányuló fényszórás (forward és side scatter paraméterek) vizsgálatával történt.

RNS interferencia (siRNS)

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

Antitestek

A PKC izoenzimek meghatározásánál alkalmazott antitesteket, melyek igazoltan specifikusan reagálnak a humán PKC izoformákkal [Boczán és mtsai, 2000, 2001], nyúlban termeltették. Az anti-PKC α , β , η , ϵ és ζ a Sigma, míg az anti-PKC δ , θ és μ a Santa Cruz terméke. A futtatási vizsgálatokhoz használt anti- β -aktin antitestet a Santa Cruz-tól rendeltük.

Western (immuno)blot

A tenyésztett sejteket hideg kalcium/magnézium-mentes foszfát-pufferben (CMF-PBS, pH: 7,4) mostuk, lízis-pufferben (5 mM EGTA, 20 mM Tris-Cl, 20 μ M leupeptin, 1 mM 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid, pH 7,4; Sigma) homogenizáltuk, végül ultrahangos

szonikálóval a sejteket feltártuk [Lázár és mtsai, 2003]. Az így elkészített minták proteintartalmának meghatározása BCA protein assay-vel (Pierce, Rockford, IL, USA) történt. Ezután a minták proteintartalmát 2 mg/ml-re állítottuk be, majd az azonos proteintartalmú mintákat SDS mintapufferben (10% glicerin, 2% SDS, 0,062 M Tris, 20 mM ditiotritol, 0,002% brómfenolkék és 5% β -merkaptoetanol; Sigma) 10 percig főztük. Az így elkészített mintákat SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970] 100 V konstans feszültségen választottuk el. A gélelektroforézishez 7,5%-os gélt készítettünk, amelyekre 20 μ g/vályú proteint vittünk fel. Ezután a gélről a fehérjéket 100 V konstans feszültségen nitrocellulóz membránra (Bio-Rad, Bécs, Ausztria) transzferáltuk. Ezt követően a membrán szabad kötőhelyeit 5% tejet tartalmazó PBS-sel 20 percig blokkoltuk, majd a megfelelő elsődleges antitesttel inkubáltuk. Az elsődleges antitestek hígítása 5% tejet tartalmazó PBS-ben történt, majd a membránokat egy éjszakán keresztül 4 °C-on tartottuk. Az inkubációt követően a membránokat 30 percig PBST-ben (0,1% Tween-20-at tartalmazó PBS-ben, Sigma) mostuk, és megfelelő torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (1:1000 hígítás 5% tejet tartalmazó PBS-ben) (Bio-Rad) inkubáltuk. Az immunjelek rögzítése minden esetben kemilumineszcens (ECL) kit (Pierce, Rockford, IL, USA), a detektálás pedig fényérzékeny film (AGFA, Brüsszel, Belgium) vagy Fujifilm LAS 3000-es darkbox (Fujifilm, Tokió, Japán) segítségével valósult meg. Az expresszió kvantitatív meghatározását denzitométer, valamint megfelelő szoftver (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Inc. Georgia, USA) segítségével hajtottuk végre. Annak megállapítására, hogy a minták felvitele egyformán történt-e, a nitrocellulóz membránokat 65 °C-on 1 órán át inkubáltuk 200 ml 50 mM Tris-HCl pufferben (pH 7.5) (2% SDS és 1% β -mercaptoethanol). A membránokat ezután egérben termeltetett cytochrome-C (Cyt-c), vagy β -aktin ellenes antitesttel (1:100 PBS tejben) (Santa Cruz) festettük meg, majd az előzőekhez hasonlóan elemeztük az intenzitásokat.

Kvantitatív „real-time” 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 szeparált sejtszuszpenziókból, illetve a MonoMac-6 sejtekből a teljes RNS-t TRIzol-lal izoláltuk (Invitrogen), a gyártó protokollját követve (homogenizálás, RNS szeparálás, RNS precipitáció, RNS mosás, majd az RNS feloldása nukleáz-mentes vízben). Ezt követően 1 µg teljes RNS-ből cDNS-t készítettünk 15 egység AMV reverse transzkriptáz és 0.025 µg/ml random primer felhasználásával (Promega, Madison, WI, USA). A PCR amplifikációs reakciót TaqMan primerekkel és próbákkal végeztük (Assay ID-k: cPKC α : Hs00176973_m1; cPKC β : Hs00176998_m1; nPKC δ : Hs00178914_m1; nPKC ϵ : Hs00178455_m1; aPKC ζ : Hs00177051_m1) a TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol-t követve (Applied Biosystems). Belső kontrollnak a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) expresszióját határoztuk meg (Assay ID: Hs99999905_m1). A génexpressziók megállapításához az eredményeket a Δ CT, illetve a $\Delta\Delta$ CT módszert alkalmazva prezentáltuk.

A sejtprolifерáció vizsgálata

A proliferáció vizsgálatokor kolorimetriás MTT assay-t alkalmaztunk, aminek alapja a sárga színű tetrazolium MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid) lila színű formazán kristállyá alakulása az élő sejtek mitokondriumában. A sejteket 96-lyukú tenyésztőedényekben szélesztettük 5×10^5 /ml denzitásban, majd a megfelelő ideig alkalmazott reagensek különböző koncentrációival kezeltük. Ezt követően minden lyukba 5 mg/ml MTT (Sigma) oldatot pipettáztunk, és a keletkező formazán kristályok koncentrációját kolorimetriás úton határoztuk meg. Minden kezelést 3-5-szörös ismétléssel végeztünk, az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg.

Arachidonsavfelszabadulás vizsgálata

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

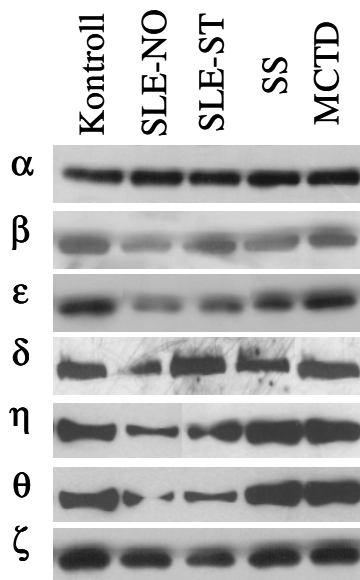
Statisztikai elemzések

Mérési eredményeinket átlag \pm SEM formában adtuk meg. Az adatok statisztikai kiértékelésére és összehasonlítására, 5%-os szignifikancia szinttel dolgozva, a Student-féle t -tesztet alkalmaztuk.

EREDMÉNYEK

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

Kísérleteink első részében specifikus antitesteket felhasználó Western blot segítségével meghatároztuk a különböző T-sejt populációk PKC expressziós mintázatát. Kimutattuk, hogy az egészséges egyének T-limfocitáiban 7 PKC izoforma található meg, nevezetesen a klasszikus izoformák közül a cPKC α és β , a novel nPKC δ , ϵ , η és θ , valamint az atípusos aPKC ζ (**3. ábra**). Nem tudtuk ugyanakkor kimutatni a cPKC γ , aPKC λ/ι és a PKC μ jelenlétét.



T-limfociták

3. ábra. *Változások a szisztémás lupus erythematosusos betegek limfocitáinak PKC izoforma mintázatában*

Egészséges alanyok (Kontroll), szteroid kezelésben nem részesülő (SLE-NO), illetve részesülő (SLE-ST) SLE-s betegek, valamint Sjögren-szindrómás (SS) és kevert kötőszöveti betegségben szenvedők (MCTD) tisztított T-limfocitáit proteáz inhibitorot tartalmazó lízis pufferben feltártuk, majd Western blotot végeztünk. Elsődleges antitestként poliklonális (nyúl) anti-PKC antitesteket (görög betűk), majd peroxidáz konjugált nyúl ellenes, kecskében termeltetett másodlagos antitestet (IgG) használtunk. Az immunreaktív sávokat erősített kemilumineszcens (ECL) Western blot detektáló kittel vizualizáltuk. Az ábra számos meghatározás közül mutat be egy reprezentatívát.

Ezt követően különféle alcsoportok létrehozása mellett döntöttünk az SLE-s betegek esetében, megvizsgálva ezzel, hogy a betegség státusa, illetve a kezelés befolyásolja-e a PKC izoforma szinteket. Az izoenzimek kvantitatív expresszióját tanulmányozva bebizonyosodott, hogy azon SLE-s betegek limfocitáiban, akik szteroid kezelésben nem részesültek, számos izoforma kifejeződési szintje jelentősen és szignifikáns mértékben csökkent, míg bizonyos izoformáké nem változott az egészséges kontrollhoz viszonyítva. Megállapítottuk, hogy a cPKC β , valamint a nPKC δ , ϵ , η és θ expressziója (különböző mértékben) jelentősen és szignifikánsan csökkent, míg az aPKC ζ szintje mérsékelt, még szignifikáns szupressziót mutatott, ugyanakkor a cPKC α kifejeződése nem változott a kontrollhoz viszonyítva (**3. ábra és 1. táblázat**).

1. táblázat. SLE-s, SS-s, és MCTD-s betegek T-sejtjeinek PKC izoforma mintázata Western blot analízis denzitometriás vizsgálatával

Izoforma	SLE SZTEROID NÉLKÜL	SLE SZTEROID KEZELÉS	SS	MCTD
PKC α	102 \pm 6	108 \pm 11	103 \pm 8	101 \pm 8
PKC β	58 \pm 8 ^a	91 \pm 12 ^b	110 \pm 6	106 \pm 6
PKC ϵ	32 \pm 13 ^a	75 \pm 9 ^b	108 \pm 5	110 \pm 7
PKC δ	49 \pm 7 ^a	83 \pm 12 ^b	102 \pm 7	104 \pm 4
PKC η	42 \pm 10 ^a	78 \pm 9 ^b	93 \pm 4	91 \pm 8
PKC θ	21 \pm 6 ^a	19 \pm 8	102 \pm 3	101 \pm 10
PKC ζ	72 \pm 8 ^a	76 \pm 12	97 \pm 8	99 \pm 4

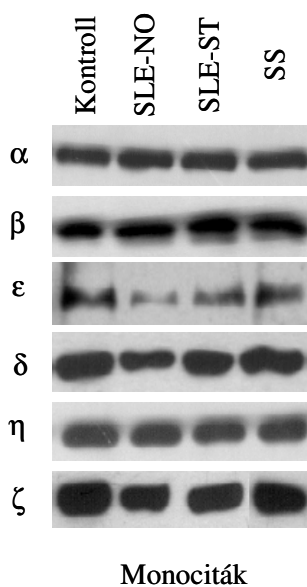
PKC = protein kináz C; SLE = Szisztémás lupus erythematosus; SS = Sjögren szindróma; MCTD = Kevert kötőszöveti betegség. Az egészséges és a beteg sejtek Western blotos vizsgálata során kapott immunreaktív sávok optikai denzitás értékeit határoztuk meg. A beteg minták értékeit ezután az ugyanazon gélen futott egészséges kontroll értékekre normáltuk, majd az azonos betegségben szenvedők ezen normalizált adatait átlagoltuk. Minden adatot átlag \pm SEM formában fejeztük ki, ahol a SEM értékeket a kontrollhoz, mint 100%-hoz viszonyítottuk. A kontrollhoz mért szignifikáns ($P < 0.05$) csökkenéseket ^a -val jelöltük, míg ^b mutatja a szignifikáns ($P < 0.05$) növekedéseket a szteroid kezelésben részesülő csoport esetében a szteroid kezelésben nem részesülő csoporthoz viszonyítva.

Összehasonlítva ezen eredményeket a kortikoszteroid kezelésben részesülő SLE-s betegek hasonló sejtpopulációival azt találtuk, hogy a legtöbb izoenzim expressziója részlegesen, de csaknem teljes mértékben normalizálódott, ugyanakkor a nPKC θ , valamint az aPKC ζ

kifejeződése nem különbözött a szteroid kezelésben nem részesülő csoporthoz viszonyítva (**3. ábra és 1. táblázat**). Úgy tűnik, hogy mindezen változások SLE-re specifikusnak voltak mondhatók, hiszen az MCTD-s, illetve SS-s betegek limfocitáit tanulmányozva a PKC izoformák szignifikáns mértékű változását nem tudtuk kimutatni.

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

A következő lépésben megvizsgáltuk a PKC izoforma mintázatát az SLE-s betegek monocita sejtpopulációiban is. A limfocitákkal összehasonlítva a monociták (bizonyítva ezzel a PKC izoformák sejt- és szövetspecifikus kifejeződését és szerepét [Goodnight és mtsai, 1994; Nishizuka, 1988, 1992; Gutcher és mtsai, 2003]) eltérő PKC izoenzim profillal rendelkeztek. Nevezetesen, expresszálták a cPKC α és β , a nPKC δ , ϵ és η , valamint az aPKC ζ izoenzimeket (**4. ábra**).



4. ábra. *Változások a szisztémás lupus erythematosusos betegek monocitáinak PKC izoforma mintázatában*
Egészséges alanyok (Kontroll), szteroid kezelésben nem részesülő (SLE-NO), illetve részesülő (SLE-ST) SLE-s betegek és Sjögren-szindrómás (SS) betegek monocitáit izoláltuk, majd Western blotot készítettünk. Megfelelő poliklonális anti-PKC antitestek (görög betűk), majd peroxidáz konjugált másodlagos antitestek (IgG) használatával az immunreaktív sávokat erősített kemilumineszcens (ECL) Western blot detektáló kit segítségével vizualizáltuk. Az ábra számos meghatározás közül mutat be egy reprezentatívát.

Az izoenzimek kifejeződését tanulmányozva megállapítottuk, hogy a szteroid kezelésben nem részesült SLE-s betegek monocitáiban, a limfociták esetében kapott adatokkal szöges ellentétben, néhány izoforma szintje nem változott (cPKC α és β , nPKC η), míg a nPKC δ és ϵ expressziója jelentős, az aPKC ζ szintje mérsékelt, de még szignifikáns mértékű csökkenést mutatott az egészséges kontroll csoporthoz viszonyítva (**4. ábra és 2. táblázat**).

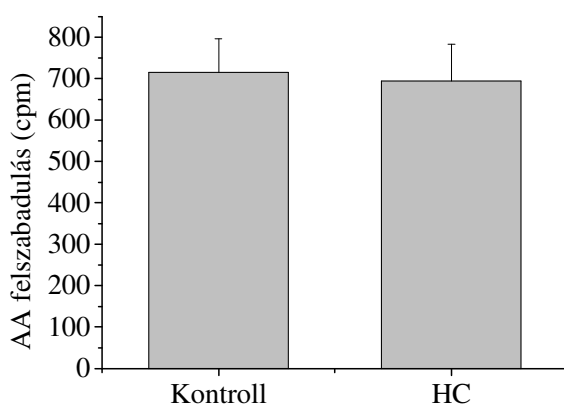
2. táblázat. SLE-s és SS-s betegek monocitáinak PKC izoforma mintázata Western blot analízis denzitometriás vizsgálatával

Izoforma	SLE SZTEROID NÉLKÜL	SLE SZTEROID KEZELÉS	SS
PKC α	102 \pm 3	101 \pm 4	103 \pm 8
PKC β	96 \pm 6	105 \pm 8	108 \pm 6
PKC ϵ	25 \pm 9 ^a	63 \pm 11 ^b	97 \pm 8
PKC δ	51 \pm 6 ^a	85 \pm 5 ^b	110 \pm 5
PKC η	105 \pm 7	96 \pm 7	102 \pm 7
PKC θ	NEM MÉRHETŐ		
PKC ζ	69 \pm 8 ^a	73 \pm 13	103 \pm 8

PKC = protein kináz C; SLE = Szisztémás lupus erythematosus; SS = Sjögren-szindróma. Az egészséges és a beteg sejtek Western blotos vizsgálata során kapott immunreaktív sávok optikai denzitás értékeiket határoztuk meg. A betegekből származó minták értékeit ezután az ugyanazon gélen futott egészséges kontroll értékekre normáltuk, majd az azonos betegségben szenvedők ezen normalizált adatait átlagoltuk. Minden adatot átlag \pm SEM formában fejeztük ki, ahol a SEM értékeket a kontrollhoz, mint 100%-hoz viszonyítottuk. A kontrollhoz mért szignifikáns (P<0.05) csökkenéseket ^a –val jelöltük, míg ^b mutatja a szignifikáns (P<0.05) növekedéseket a szteroid kezelésben részesülő csoport esetében a szteroid kezelésben nem részesülő csoporthoz viszonyítva.

Hasonlóan a T-sejtekben kapott eredményekhez, a kortikoszteroid terápiában részesülő SLE-s betegek monocitáiban a különféle (csökkent szintű) PKC izoformák expressziója különböző mértékben tért vissza a kontrollhoz közeli szintre. Nevezetesen, mialatt a nPKC δ és ϵ szintje jelentősen és szignifikánsan megemelkedett (összevetve a szteroid nélküli csoporttal), addig az aPKC ζ szintje továbbra is az egészséges monocitáké alatt marad (**2. táblázat és 4. ábra**). Végezetül ezen monocitákban kimutatott változások szintén SLE specificitást mutattak, hiszen a SS-s betegek hasonló sejtpopulációjában nem tudtuk a PKC mintázat szignifikáns változását kimutatni (**4. ábra és 2. táblázat**).

Kvantitatív „real time” Q-PCR technikát alkalmazva kimutattuk, hogy egészséges kontrollokban a szteroid adása szelektíven és szignifikáns mértékben növelte az nPKC ϵ mRNS szintjét, ugyanakkor SLE-s monocitákban az *in vitro* kortikoszteroid kezelés hatására mind a nPKC δ , mind a nPKC ϵ mRNS expressziója jelentősen növekedett (**5. ábra A és B.**) Munkacsoportunk korábbi kísérletei során kimutatta, hogy SLE-s betegek perifériás monocitáiban csökkent az AA termelés az egészséges kontrollhoz viszonyítva, ugyanakkor ezen csökkent produkció nem volt igazolható a szteroid kezelésben részesülő betegek sejteinek vizsgálatakor [Sipka és mtsai, 2001].



6. ábra. Hidrokortizon kezelés hatása kontroll humán monociták AA termelésére

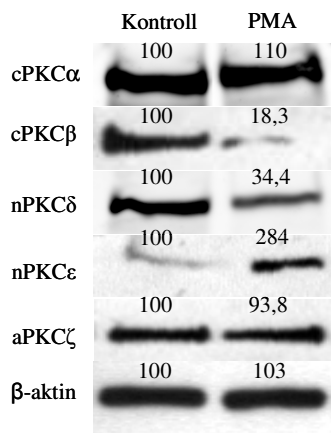
Az izolált kontroll humán monocitákat két napig vivőanyaggal, illetve 10 μ M hidrokortizonnal (HC) kezeltük, majd 10^5 /ml denzitásban [3 H]AA jelenlétében 12-lyukú tenyésztőedényekben 20 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk és meghatároztuk a sejtek AA termelését. Az ábrán látható eredmények átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve.

Ezért kísérleteinkben elvégeztük az egészséges egyének monocitáinak kortikoszteroid kezelését is. Meglepetésünkre azt tapasztaltuk, hogy a hidrokortizon terápia a nPKC ϵ mRNS overexpressziójának ellenére nem befolyásolta szignifikáns mértékben az AA termelést (**6. ábra**). Mindezen adatok arra utalnak, hogy egészséges és SLE-s monocitákban a kortikoszteroid kezelés különböző módon képes befolyásolni a PKC izoenzimek kifejeződési szintjeit, valamint úgy tűnik, hogy a nPKC ϵ expressziójának növelése és az AA termelés között nincs összefüggés.

A MonoMac-6 sejtvonal PKC rendszere

Eddigi eredményeink azt sugallják, hogy a limfocitákban és monocitákban látható PKC abnormalitások részben magyarázhatják a megváltozott jelátviteli útvonalakat és sejtfunkciós defektusokat SLE-ben. Mindemellett az is valószínűsíthető, hogy a különböző PKC izoformáknak alapvető jelentősége van bizonyos sejtfunkciók, úgymint az AA termelés szabályozásában. Ezért egyértelműnek tűnt számunkra, hogy további kutatásokat végezzünk az egyes PKC izoenzimek szerepének pontos megítélésé végett. Tekintettel azonban arra, hogy az SLE nagyon gyakran súlyos mono- és limfopéniával társul, illetve a betegség kezelése nagymértékben befolyásolhatja az általunk vizsgálni kívánt rendszer expresszióját, működését, kísérleteinkben a MonoMac-6 monocitoid sejtvonalat, mint monocita modellt [Karimi és Lennartz, 1995; Zeigler-Heitbrock és mtsai, 1988, 1994], alkalmazva kívántuk meghatározni a PKC izoenzimek differenciált szerepét a sejtproliferációban és az AA termelés szabályozásában.

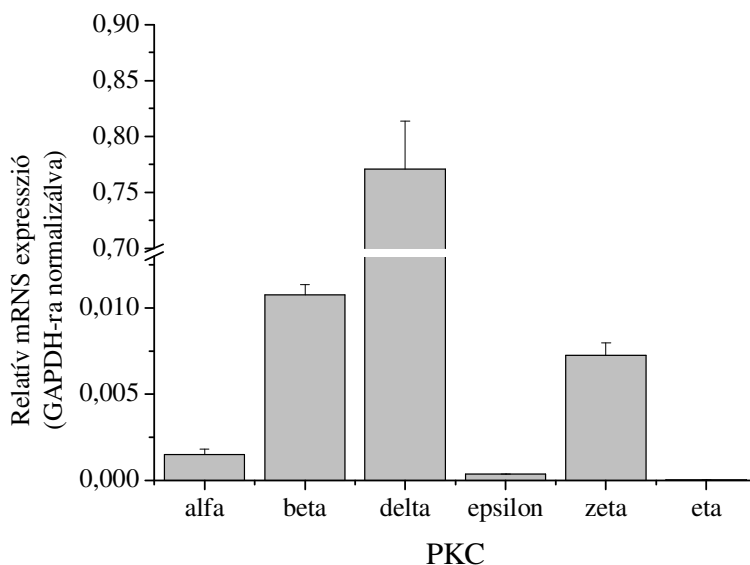
Western blot technikát alkalmazva kimutattuk, hogy a MonoMac-6 sejtek expresszálják a klasszikus cPKC α és β -t, a novel nPKC δ és ϵ -t, valamint az atípusos aPKC ζ -t; nem tudtuk ugyanakkor kimutatni a nPKC η – ami perifériás humán monocitákban megtalálható – és más PKC izoenzimek (cPKC γ , nPKC θ , aPKC λ/ι , és PKC μ) jelenlétét (**7. ábra**).



7. ábra. A MonoMac-6 sejtek PKC izoforma mintázata és a PMA kezelés hatása

A sejteket 100 nM PMA-val kezeltük 2 napon keresztül, majd (a kontroll sejtekkel egyetemben) Western blotot végeztünk specifikus anti-PKC antitestek felhasználásával. Ezt követően az egyes PKC izoformák immunreaktív sávjait denzitométer segítségével kvantifikáltuk, majd az így kapott értékeket a kontroll sejtekhez viszonyítva %-os formában tüntettük fel.

Ezen eredményeket megerősítették a Q-PCR-ral kapott adatok (**8. ábra**), amelyek arról is informáltak, hogy a különböző PKC izoenzimek relatív kifejeződési szintjei különböznek. Nevezetesen, bizonyos PKC izoformák relatív magas (nPKC δ >>>>cPKC β >aPKC ζ), míg mások alacsony (cPKC α >nPKC ϵ) expressziós szinttel bírnak az endogén kontroll GAPDH-hoz viszonyítva.



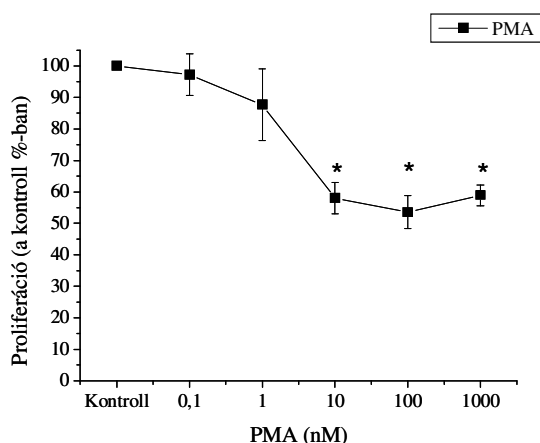
8. ábra. A MonoMac-6 sejtek PKC izoforma mintázata

A sejtekből teljes RNS-t izoláltunk, majd reverz transzkripciót végeztünk random primerek segítségével. Az elkészített cDNS preparátumokból triplikált formában PKC specifikus Taqman primerek és próbák felhasználásával Q-PCR amplifikációt végeztünk. Az így kapott abszolút értékeket a glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), mint endogén kontroll értékeire normalizáltuk.

A PMA szerepe a MonoMac-6 sejtek proliferációjának és AA termelésének szabályozásában

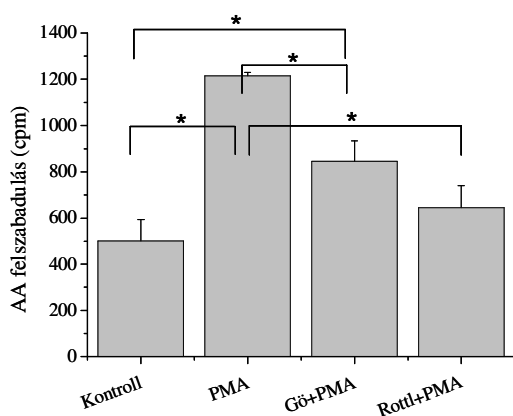
Ezt követően a MonoMac-6 sejtek PKC rendszerének funkcionális szerepét kívántuk tanulmányozni. Ahogyan a **9. ábra** mutatja, az általános PKC aktivátor PMA két napig történő alkalmazása a sejtproliferáció szignifikáns és dóziszfüggő csökkenését eredményezte. Mindezzel párhuzamban Western blottal kimutattuk (**7. ábra**), hogy a cPKC β és nPKC δ expressziója nagymértékben csökkent (feltehetőleg az izoformák down-regulációja miatt), míg a cPKC α és aPKC ζ szintjei nem változtak. Érdekes módon a nPKC ϵ kifejeződése

növekedett a PMA kezelést követően. Mindezen adatok arra utalnak, hogy a megváltozott (down- és up-regulált) PKC izoenzimek mediálhatják a PMA sejtosztódást gátló hatását.



9. ábra. PMA kezelés hatása a MonoMac-6 sejtek proliferációjára
A MonoMac-6 sejteket 50000 sejt/lyuk denzitásban 96-lyukú tenyésztőedényben szélesztettük, majd két napon keresztül különböző koncentrációjú PMA-val kezeltük, végül MTT-assay-t végeztünk. Az ábrán 4 független kísérlet eredményei láthatók átlag ± SEM formában. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelölik (p<0,05).

Ezt követően, megvizsgálva a PMA hatását az AA termelésre, azt tapasztaltuk, hogy a forbol-észter kalcium jelenlétében jelentős növekedést okozott a sejtek AA felszabadulásában (10. ábra), ami tovább erősíti a PKC rendszer szerepét a monociták ezen sejtfolyamatának szabályozásában.

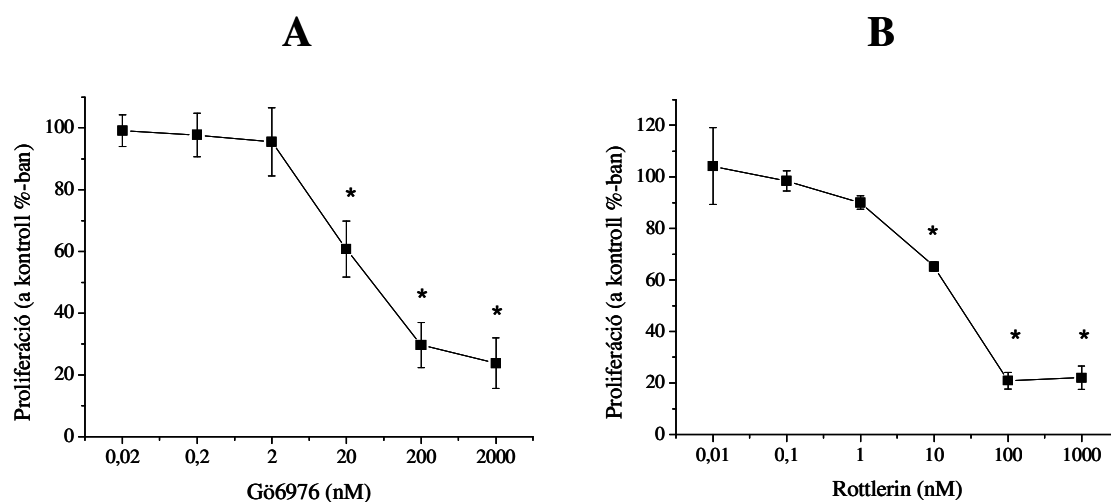


10. ábra. PMA kezelés hatása a MonoMac-6 sejtek AA termelésére
A MonoMac-6 sejteket 10⁵/ml denzitásban [³H]AA jelenlétében 12-lyukú tenyésztőedényekben 20 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd vivőanyaggal (kontroll), illetve 100 nM PMA és 5 μM kalcium ionofórral A23187 (PMA) kezeltük 4 órán keresztül. Ezt követően triplikált formában meghatároztuk a sejtek AA termelését. Ezen utóbbi kísérletünket megismételtük a cPKC gátlószer 20 nM Gö6976 (Gö+PMA), valamint az nPKCδ gátlószer 100 nM Rottlerin (Rott+PMA) 1 órás preinkubációját követően is. Az ábrán látható eredmények átlag ± SEM formában vannak feltüntetve. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelölik (p<0,05).

Annak kiderítésére, hogy mely PKC izoformák játszhatnak szerepet a PMA ezen hatásának kiváltásában, kísérleteinket elvégeztük különböző PKC inhibitorok preinkubációját követően is. A 10. ábrán látható, hogy a Gö6976 (20 nM), a klasszikus (esetünkben tehát a

cPKC α és β) gátlószere [Martiny-Baron és mtsai, 1993], valamint a Rottlerin (100 nM) (az nPKC δ specifikus inhibitora [Gschwendt és mtsai, 1994]) sikeresen (szignifikánsan) kivédte a forbol-észter AA termelést fokozó hatását.

Az eddig bemutatott eredményeink arra utalnak, hogy bizonyos PKC izoenzimek szabályozó szereppel bírhatnak a MonoMac-6 sejtek AA termelésében és proliferációjában. Az adatok ugyanakkor azt sugallják, hogy az izoformák meglehetősen komplex módon (feltehetőleg egymással ellentétesen) vesznek részt a PMA hatásának létrehozásában. Ezért következő lépésként az előbbi inhibitorokat alkalmazva megváltoztattuk az izoenzimek endogén aktivitását és megvizsgáltuk, hogy ezen beavatkozás hogyan befolyásolja a sejtek nyugalmi, „bazális” proliferációját és AA termelését.

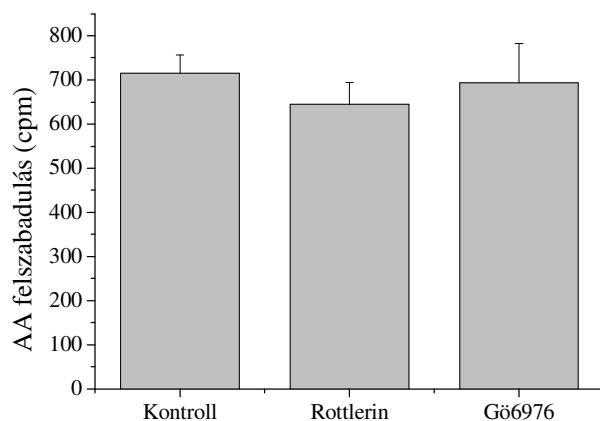


11. ábra. Különböző PKC inhibitorok hatása MonoMac-6 sejtek proliferációjára

A MonoMac-6 sejteket 50000 sejt/lyuk denzitásban 96-lyukú tenyésztőedényben szélesztettük, majd két napon keresztül különböző koncentrációjú A) cPKC gátlószert Gö6976-tal vagy B) nPKC δ gátlószert Rottlerinrel kezeltük a sejteket, végül naponta MTT assay-t végeztünk. Az ábrán 4 független kísérlet eredményei láthatók átlag \pm SEM formában. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelölik ($p < 0,05$).

A Gö6976, a klasszikus izoformák gátlószere alkalmazva megállapítottuk, hogy a sejtproliferáció jelentős mértékben és dózisfüggő módon csökkent (**11/A. ábra**). Hasonló eredményt kaptunk az nPKC δ inhibitor Rottlerin esetében is (**11/B. ábra**), így az adatok arra utalnak, hogy a „klasszikus” izoformák valamelyike, valamint a nPKC δ endogén aktivitása

alapvetően szükséges a MonoMac-6 sejtek „nyugalmi” proliferációjához. Az AA termelés tekintetében azt tapasztaltuk, hogy sem a Gö6976, sem a Rottlerin önmagában alkalmazva nem volt képes befolyásolni a bazális AA felszabadulást (**12. ábra**).



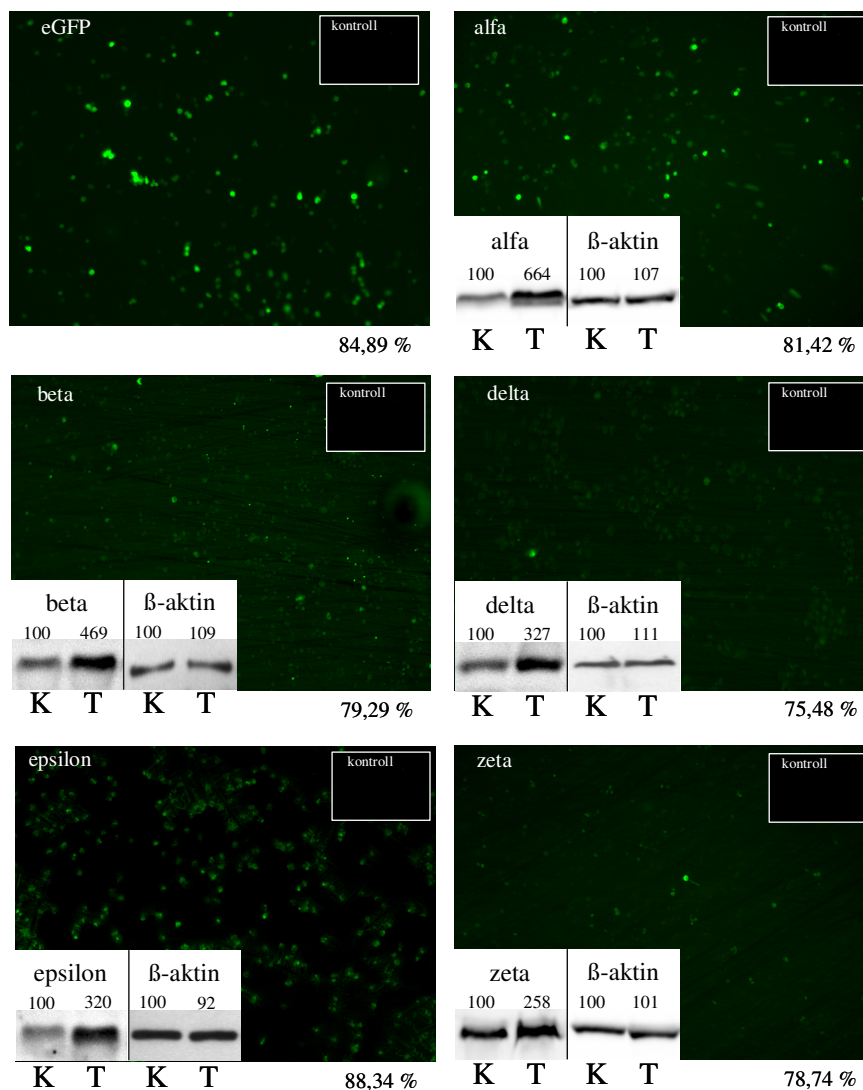
12. ábra. *Különböző PKC inhibitorok hatása a MonoMac-6 sejtek AA termelésére*

A MonoMac-6 sejteket 10^5 /ml denzitásban [^3H]AA jelenlétében 12-lyukú tenyésztőedényekben 20 órán keresztül 37°C -on inkubáltuk, majd vivőanyaggal (kontroll), illetve cPKC gátlószer 20 nM Gö6976-tal, valamint az nPKC δ gátlószer 100 nM Rottlerinnel kezeltük 4 órán át. Ezt követően triplikált formában meghatároztuk a sejtek AA termelését. Az ábrán látható eredmények átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve.

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

Kísérleteink ezen biokémiai módszerekkel történő további folytatását számos tényező korlátozta. Nevezetesen, az utóbbi időben számos adat jelent meg az irodalomban [Davies és mtsai, 2000; Soltoff és mtsai, 2001; Kayali és mtsai, 2002; Tapia és mtsai, 2006], amelyek az előbb bemutatott PKC inhibitorok nem megfelelő specificitására és szelektivitására utalnak, valamint a jelenleg forgalomban lévő inhibitorok közül nem áll rendelkezésünkre specifikus nPKC ϵ és aPKC ζ elleni gátlószer. Mindezek arra ösztönöztek bennünket, hogy a PKC izoenzimek differenciált szerepének további tanulmányozása végett különböző molekuláris biológiai technikákat alkalmazzunk. Első lépésként elvégeztük a MonoMac-6 sejtekben a jelenlévő PKC izoenzimek rekombináns overexpresszióját. Nukleofekciós technikát használva a sejtekbe eGFP konjugált, konstitutívan aktív, rekombináns PKC izoformákat juttatunk, míg a kontroll esetében üres eGFP vektort használtunk. A transzfekció hatékonyságát fluoreszcens mikroszkóppal és Western blottal detektáltuk, mely előbbi során

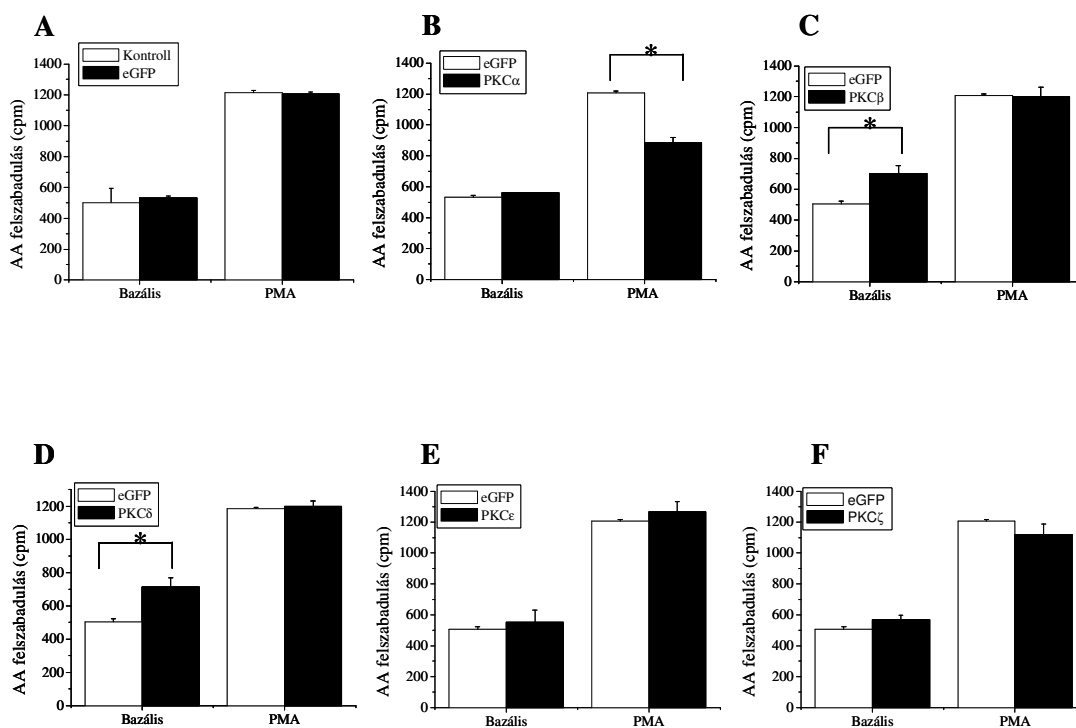
bebizonyosodott, hogy 24 órával a nukleofekciót követően a sejtek 70-80 %-a expresszálja a megfelelő exogén PKC izoformát (**13. ábra**). Hasonló transzfekciós hatékonyságra utaltak az áramlási citometriával kapott eredmények is (adatok nem mutatva).



13. ábra. A tranziensen overexpresszált eGFP-kapcsolt PKC izoformák, valamint az üres eGFP vektor transzfekciós hatásfoka

A MonoMac-6 sejteket eGFP kapcsolt üres, illetve a megfelelő PKC kódot tartalmazó vektorokkal transzfektáltuk a „Betegek és módszerek” fejezetben részletesen ismertetett módon, majd fluoreszcens képeket készítettünk 24 órával a transzfekciót követően. Minden kép jobb felső részében láthatóak azon kontroll kísérletek eredményei, ahol a transzfekciós médium nem tartalmazott vektort. 24 órával a transzfekciót követően a kontroll (K) és a transzfektált (T) sejtekből Western blot technikával a PKC izoformák protein expresszióját határoztuk meg (bal alsó panelek). A immunjeleket denzitometriával kvantifikáltuk, majd az eredményeket (a kontroll %-ban) az immunreaktív sávok fölött tüntettük fel.

A tranziens overexpressziót követően összehasonlítottuk a kontroll, üres eGFP vektorral transzfektált, illetve minden egyes PKC overexpresszor bazális, valamint PMA indukált AA termelését.



14. ábra. A PKC izoformák tranziens overexpressziójának hatása a MonoMac-6 sejtek AA termelésére

A MonoMac-6 sejteket eGFP kapsolt üres, illetve a megfelelő PKC kódot tartalmazó vektorokkal transzfektáltuk a „Betegek és módszerek” fejezetben részletesen ismertetett módon. 24 órával a transzfekciót követően a sejteket 10^5 /ml denzitásban [3 H]AA jelenlétében 12-lyukú tenyésztőedényekben 20 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd vívőanyaggal (Bazális), illetve 100 nM PMA és 5 μ M A23187 kalcium ionofórral (PMA) kezeltük 4 órán keresztül. Ezt követően triplikált formában meghatároztuk a sejtek AA termelését. Az ábrán látható eredmények átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelölik ($p < 0,05$).

Amint a **14/A. ábra**, valamint a **3. táblázat** mutatja, az üres eGFP vektorral történő transzfekció semmilyen aspektusban nem változtatta meg a sejtek AA felszabadulását, ami igazolja, hogy a transzfekciós procedúra nem befolyásolja a kísérletek specificitását.

3. táblázat. A PKC izoformák tranziens overexpressziójának hatása a MonoMac-6 sejtek AA termelésére

Izoforma	Bazális	PMA
Kontroll	515±54	1214±15
eGFP	532±11	1207±18
PKC α	558,6±4,9	885±33 ^a
PKC β	701±52 ^b	1197±64
PKC δ	713±57 ^b	1198±33
PKC ϵ	552±77	1267±67
PKC ζ	569±29	1119±69

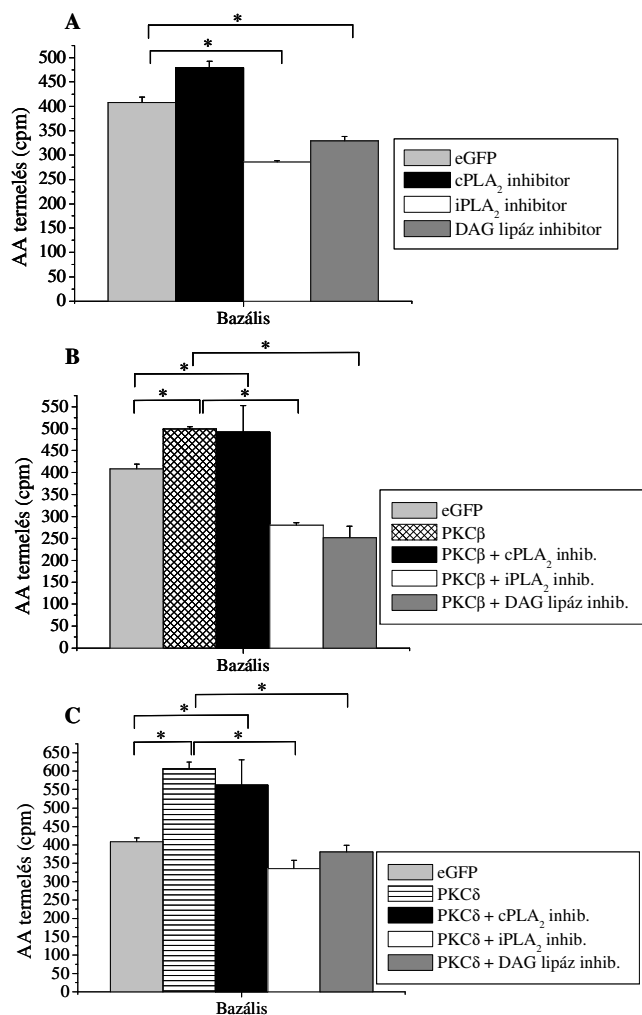
A MonoMac-6 sejteket eGFP kapsolt üres, illetve a megfelelő PKC kódot tartalmazó vektorokkal transzfektáltuk a „Betegek és módszerek” fejezetben részletesen ismertetett módon. 24 órával a transzfekciót követően a sejteket 10^5 /ml denzitásban [3 H]AA jelenlétében 12-lyukú tenyésztőedényekben 20 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd vivőanyaggal (bazális), illetve 100 nM PMA és 5 μ M kalcium ionofórral A23187 (PMA) kezeltük 4 órán keresztül. Ezt követően triplikált formában meghatároztuk a sejtek AA termelését. Az ábrán látható eredmények átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. ^a: szignifikáns csökkenés a PMA indukált AA termeléshez viszonyítva; ^b: szignifikáns növekedés a bazális AA termeléshez képest; ($p < 0,05$).

Látható emellett az is, hogy a cPKC α , nPKC ϵ és az aPKC ζ overexpressziója nem eredményezett változást a sejtek bazális AA termelésében (**14/B., E., F. ábra**). Ezzel ellentétben a cPKC β és nPKC δ overexpressziója szignifikáns mértékben növelte a bazális AA felszabadulást (**14/C. és D. ábra**). Mindazonáltal megállapítottuk azt is, hogy a cPKC α -val történő overexpressziót követően (ellentétben a többi izoformával), a PMA indukált AA termelés szignifikáns mértékben csökkent, azaz a konstitutívan aktív cPKC α -val rendelkező sejtek részlegesen „kivédtek” a PMA AA termelést fokozó hatását (**14/B. ábra**).

A cPKC β és nPKC δ AA termelést fokozó hatását kalcium-independens PLA₂ és DAG lipáz útvonalon keresztül fejtí ki

Általánosan elfogadott, hogy az AA szintézisében résztvevő foszfolipáz enzimek [Smith és mtsai, 2000; Balsinde és mtsai, 2002] – úgymint a citoszolikus (kalcium-dependens) cPLA₂, kalcium-independens iPLA₂, valamint a DAG lipáz – gyakran lehetnek a különféle PKC izoformák „down-stream” célpontjai [Karimi és Lennartz, 1995; Lin és mtsai,

1998; Guidarelli és mtsai, 2005]. Ezért, hogy megállapítsuk, hogy a cPKC β és nPKC δ által mediált AA termelés mely PLA $_2$ enzim aktiválásán keresztül történik, megvizsgáltuk a MonoMac-6 sejtek bazális AA termelését különböző PLA $_2$ inhibitorok, nevezetesen a cPLA $_2$ -t gátló AACOCF3 (100 μ M), az iPLA $_2$ inhibitor PACOCF3 (10 μ M), valamint a DAG lipázt specifikusan gátló RHC-80267 (10 μ M) anyagok jelenlétében.



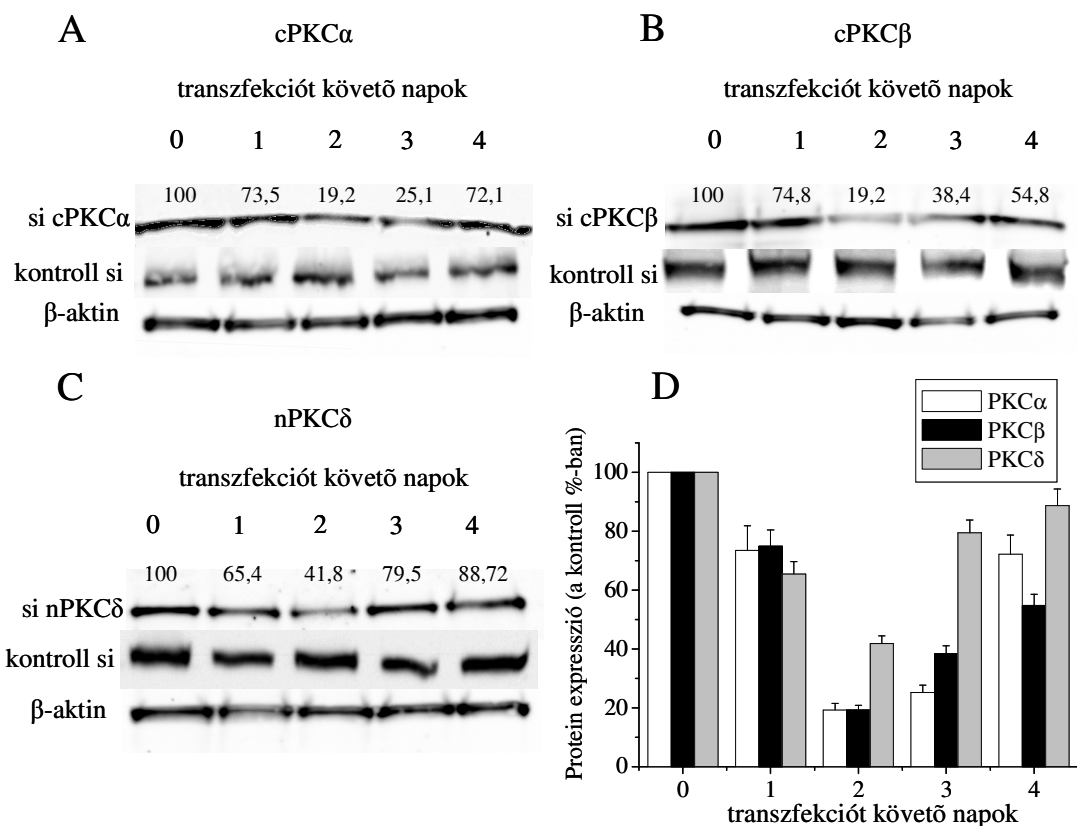
15. ábra. A PLA $_2$ inhibitorok hatása a MonoMac-6 sejtek bazális AA termelésére

A MonoMac-6 sejteket eGFP kapcsolt üres, illetve a megfelelő PKC kódot tartalmazó vektorokkal transzfektáltak a „Betegek és módszerek” fejezetben részletesen ismertetett módon. 24 órával a transzfekciót követően a sejteket 10^5 /ml denzitásban [3 H]AA jelenlétében 12-lyukú tenyésztőedényekben 20 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd cPLA $_2$ inhibitorral (100 μ M AACOCF3), iPLA $_2$ inhibitorral (10 μ M PACOCF3), illetve DAG lipáz gátlóval (10 μ M RHC-80267) kezeltük 4 órán keresztül. Ezt követően triplikált formában meghatároztuk a sejtek bazális AA termelését. Az ábrán látható eredmények átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelölik ($p < 0,05$).

A kontroll, nem transzfektált sejtekben a cPLA₂ gátlószer alkalmazása nem befolyásolta, ugyanakkor az iPLA₂, valamint DAG lipáz inhibíciója azonos mértékben és szignifikánsan csökkentette a bazális AA felszabadulást (**15/A. ábra**). Fontos hangsúlyozni mindazonáltal, hogy ugyanezen jelenséget tapasztaltuk a két overexpresszor esetében is; azaz az iPLA₂ inhibitor és a DAG lipáz gátlószere szignifikánsan csökkentette a cPKC β és nPKC δ transzfekcióját követően létrejött “megemelkedett” bazális AA produkciót, ugyanakkor a cPLA₂ inhibitor ineffektívnek bizonyult ezen gátlás létrehozásában (**15/B. és C. ábra**). Ezen adatok megerősítik tehát azon feltételezést, miszerint a iPLA₂ és DAG lipáz enzimek “downstream” foszforilációs célpontjai lehetnek a különböző (jelen esetben a cPKC β és nPKC δ) PKC izoformáknak.

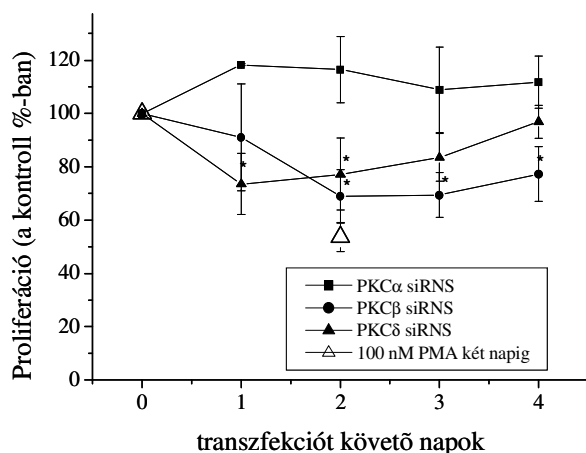
A cPKC β és nPKC δ pozitív, míg a cPKC α negatív módon szabályozza a MonoMac-6 sejtek proliferációját

A tranziens overexpressziós módszer sajnálatos módon több okból kifolyólag sem tette lehetővé a sejtek proliferációjának vizsgálatát. Egyrészt a transzfekciót követő 48-72 órában a sejtek nagy része (>50 %) elpusztult, másrészt fluoreszcens mikroszkóppal detektálva a GFP-fúziós proteinek expressziójának szignifikáns csökkenését észleltük. Ezért másik molekuláris biológiai módszert (nevezetesen az RNS interferencia technikát) alkalmaztunk, hogy megállapítsuk az előbbi három izoforma (cPKC α és β , valamint nPKC δ) specifikus, endogén szerepét a MonoMac-6 monocitoid sejtvonal proliferációjának szabályozásában. A sejteket először specifikus PKC ellenes siRNS próbákkal transzfektáltuk (kontroll esetben a transzfekciós médium üres vektort tartalmazott). Ezt követően a beavatkozás hatékonyságát naponta végzett Western immunoblot és denzitometria segítségével monitorizáltuk, kontroll fehérjeként a β -aktin expresszióját határoztuk meg. Ezzel párhuzamban a sejtproliferációt naponta végzett MTT assay-vel vizsgáltuk.



16. ábra. A PKC izoformák elleni siRNS próbák transzfekciójának hatása az izoformák expressziójára (A-C): A MonoMac-6 sejteket cPKC α és β , nPKC δ ellenes siRNS próbákkal, valamint kontroll siRNS-sel kezeltük az „Betegek és módszerek” fejezetben részletesen ismertetett módon. A beavatkozás hatékonyságát ellenőrizve specifikus PKC ellenes antitesteket felhasználó Western immunoblot technikát alkalmaztunk (felső két sáv). Emellett endogén kontrollként a nem specifikus β -aktin protein expresszióját is meghatároztuk (alsó sáv). A megfelelő PKC izoformák kvantitatív denzitometriai eredményeit a számok reprezentálják (részletesen a D pont alatt). (D): Minden kísérlet során az izoformák immunjeleit denzitometriával kvantifikáltuk, majd a β -aktin expressziójára normalizáltuk. Ezt követően az eredményeket a 0. nap, mint kontroll, százalékában fejeztük ki.

Ahogy a **16/A-C. ábra** mutatja, az siRNS transzfekciót követően a megfelelő PKC izoformák kifejeződési szintjei jelentősen lecsökkentek a kísérletsorozat 2. napján. Úgy tűnik, hogy ez a jelenség reverzibilisnek volt mondható, hiszen a Western bloton látható immunjelek erőssége a denzitometriás eredményekkel összhangban (**16/D. ábra**) a 4. napon visszatért az eredeti szint közelébe. Kimutattuk, hogy a PKC inhibitorokkal kapott adatokhoz hasonlóan (**11. ábra**) a cPKC β és nPKC δ „knock-down”-ja csökkentette (a 2. napon szignifikáns mértékben) a sejtek növekedési ütemét (**17. ábra**), valamint, hogy ez a gátló effektus a kísérlet 4. napjára (a protein szintek normalizálódásával párhuzamban) megszűnt.



17. ábra. A PKC izoformák elleni siRNS próbák transzfekciójának hatása a MonoMac-6 sejtek proliferációjára.

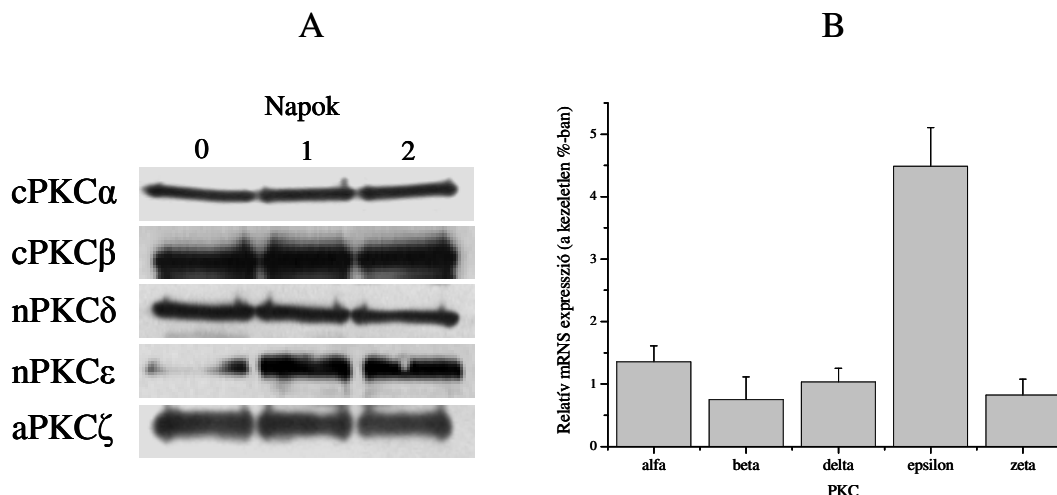
A MonoMac-6 sejteket 96-lyukú tenyésztőedényekben 50000/lyuk denzitásban szélesztettük, majd naponta MTT assay-t végeztünk. Az ábrán 4 független kísérlet eredményei láthatók átlag \pm SEM formában. Az értékeket az aznapi kontrollra normáltuk, a kontroll siRNS-sel transzfektált sejteket tekintettük 100 %-nak. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelölik ($p < 0,05$).

Fontos emellett megjegyezni azt is, hogy az siRNS technológiával „kiütött” cPKC β és nPKC δ eredményeképpen a 2. napon létrejött hatást összeadva pontosan a 2 napig önmagában alkalmazott 10-1000 nM PMA által kiváltott növekedést gátló hatással megegyezőt kaptunk (9. és 17. ábra). Mindezekkel ellentétben a cPKC α siRNS-vezérelt „down-regulációjának” következtében a proliferáció kismértékben (és szintén reverzibilisen) növekedett. Összességében ezek az adatok arra utalnak, hogy a cPKC β és nPKC δ fokozza, míg a cPKC α inkább gátolja a MonoMac-6 sejtek proliferációját.

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

Kísérleteink következő lépéseként, ismerve a PKC izoenzimek pontos szerepét a MonoMac-6 sejtek proliferációjának és AA termelésének szabályozásában, meg kívántuk vizsgálni az *in vitro* szteroid kezelés hatását a sejtek PKC expressziós mintázatára és az AA termelésére. Megismételve korábbi kísérletünket (5. ábra) kimutattuk, hogy a MonoMac-6 sejtek esetében 10 μ M hidrokortizon két napig történő alkalmazása (az egészséges kontroll

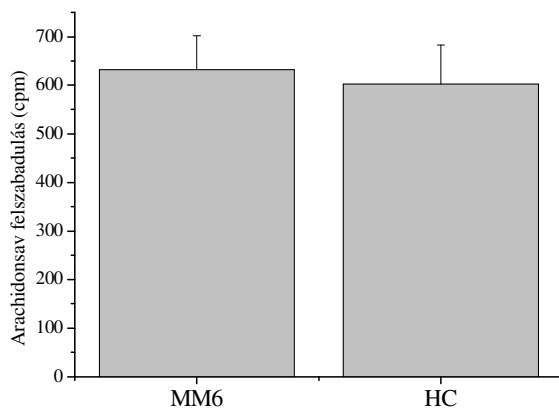
monocitákhoz hasonlóan) mind protein (18/A. ábra), mind mRNS szinten (18/B. ábra) szelektíven csak a nPKCε „up-regulációját” okozza.



18. ábra. Hidrokortizon kezelés hatása a MonoMac-6 sejtek PKC expressziójára

A MonoMac-6 sejteket üres médiummal, illetve 10 μM hidrokortizonnal 2 napon keresztül kezeltük, majd (A) proteáz inhibitor tartalmazó lízis pufferben feltártuk és Western blotot végeztünk. Elsődleges antitestként poliklonális (nyúl) anti-PKC antitesteket, majd peroxidáz konjugált nyúl ellenes, kecskében termeltetett másodlagos antitestet (IgG) használtunk. Az immunreaktív sávokat erősített kemilumineszcens (ECL) Western blot detektáló kittel vizualizáltuk. Az ábra számos meghatározás közül mutat be egy reprezentatívát. (B) A sejtekből a hidrokortizon kezelést követően teljes RNS-t izoláltunk és reverz transzkripciót végeztünk random primerek segítségével. Az elkészített cDNS preparátumokból triplikált formában PKC specifikus Taqman primerek és próbák felhasználásával Q-PCR amplifikációt végeztünk. Az így kapott abszolút értékeket a glicerín-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), mint endogén kontroll értékeire normáltuk, majd ezen normalizált eredményeket a kezeletlen %-ban tüntettük fel. A panelen látható adatok három független kísérlet eredményeit mutatják átlag ± SEM formájában.

Következő lépésként megvizsgáltuk a MonoMac-6 sejtek AA termelését a kortikoszteroid kezelést (és ennek megfelelően az nPKCε „up-regulációját”) követően.



19. ábra. Hidrokortizon kezelés hatása a MonoMac-6 sejtek AA termelésére

A MonoMac-6 sejteket két napig vivőanyaggal, illetve 10 μM hidrokortizonnal (HC) kezeltük, majd 10⁵/ml denzitásban [³H]AA jelenlétében 12-lyukú tenyésztőedényekben 20 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. majd meghatároztuk a sejtek AA termelését. Az ábrán látható eredmények átlag ± SEM formában vannak feltüntetve.

A **19. ábrán** látható adatok szerint a hidrokortizon kezelést követően a sejtek AA felszabadulása semmiben nem különbözött a kezeletlen sejtekéhez viszonyítva, ami további bizonyítékul szolgált azon feltevésünkre, miszerint az nPKC ϵ nem játszik szerepet a monocitoid sejtek AA termelésének szabályozásában.

MEGBESZÉLÉS

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

Kísérleteink első részében összehasonlítottuk az SLE-s betegek T-limfocitái PKC rendszerének kifejeződési mintázatát egészséges kontrollok T-sejtjeivel, illetve más poliszisztémás autoimmun betegségben szenvedők hasonló sejtpopulációival. Megállapítottuk, hogy az irodalomban korábban leírt csökkent általános PKC aktivitás hátterében [Tada és mtsai, 1991] sejt- és izoformaspecifikus változások állnak, amelyeket számos tényező, köztük a betegek kortikoszteroid kezelése, befolyásol. Kimutattuk, hogy a szteroid terápiában nem részesülő SLE-s betegek limfocitáiban a legtöbb PKC izoforma expressziója drámaian csökkent, míg a cPKC α kifejeződése nem változott (**3. ábra és 1. táblázat**). Munkánk másik jelentős felfedezése az volt, hogy azon betegcsoportban, akik szisztémás kortikoszteroid kezelésben részesültek, a legtöbb – de nem az összes – izoforma expressziós szintje javult (azaz a kontroll szinthez közelített). Fontos hangsúlyozni, hogy mindezen változások kizárólag az SLE-s betegek T-sejtjeiben voltak kimutathatóak (az MCTD-s és SS-s betegek esetében a kontrollal megegyező eredményeket találtunk).

Összességében ezen limfocitákban nyert adataink a következő megfontolásokat vetik fel: (1) ismerve a PKC rendszer központi szerepét a T-sejtek jelátviteli folyamataiban [Tada és mtsai, 1991; Szamel és mtsai, 1998; Bi és mtsai, 2001; Long és mtsai, 2001] jelen felfedezésünk részlegesen magyarázhatja az SLE-ben látott komplex abnormalitásokat; (2) mivel ezen változások kizárólag SLE-ben voltak láthatóak, a PKC izoformaprofil poliszisztémás autoimmun betegségekben történő meghatározása (a számos immunológiai és biokémiai paraméter mellett) további differenciáldiagnosztikai segítséget nyújthat, illetve rávilágíthat a betegségek eltérő patomechanizmusára; végezetül (3) a szteroid kezelés hatása

megmutatja, hogy a PKC izoformák megváltozott expressziója SLE-ben feltehetőleg egy tranziens állapotnak felel meg.

A T-sejtek szignáltranszdukciós változásai közül SLE-ben központi szereppel bír a TCR ζ -láncának csökkent expressziója, hiszen a TCR aktiváció (és az ennek következtében kialakuló jelátviteli kaszkád) vezet az autoreaktív T-sejtek kialakulásához és végeredményben a patológiás autoantitestek termeléséhez [Liou és mtsai 1998; Enyedy és mtsai 2001; De Silva-Udawatta és mtsai, 2004]. Ahogy a bevezetésben részletesen említettük, a szuppresszió hátterében felmerült az Elf-1 transzkripciós faktor [Rellahan és mtsai, 1998, Leiden és mtsai, 1992, Gottschalk és mtsai, 1993] szerepe. Nevezetesen, vagy hiányzott az aktív Elf-1, vagy annak kötődése a ζ -lánc promóteréhez volt hibás, aminek hátterében a molekula foszforilált állapotának megváltozása állt. Az is ismert emellett, hogy a nPKC θ fokozza az Elf-1 foszforilációját és így a molekula transzlokációját a magba, elősegítve ezzel a 98 kDa Elf-1 kapcsolódását a TCR ζ -lánc promóteréhez [Tsokos és mtsai, 2003]. Azon eredményünk, miszerint a nPKC θ expressziója jelentősen csökkent SLE-ben és ezt a kortikoszteroid kezelés sem javítja, megerősítheti a nPKC θ központi szerepét az SLE-s T-sejtek csökkent szintű TCR ζ -láncának kifejeződésében, a megváltozott jelátviteli kaszkádban, valamint a patológiás autoantitestek termelésében. Ugyanakkor ezen adatok felhívják a figyelmet a betegség terápiájában leggyakrabban alkalmazott kortikoszteroid kezelés limitáltságára is.

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

Hasonlóan a T-sejtekhez, az SLE-s betegek monocitáiban is megvizsgáltuk a PKC izoenzimek expressziós mintázatát. Elsőként mutattuk ki, hogy SLE-ben izoformaspecifikus PKC defektusok vannak jelen, nevezetesen drámaian csökkent a nPKC δ és ϵ , valamint minimálisan csökkent az aPKC ζ expressziója (**4. ábra és 2. táblázat**), amely egyik oka lehet

az SLE-ben látott megváltozott monocita funkcióknak. Jelen kísérleteink megerősítették azon irodalmi adatokat, miszerint a kortikoszteroid kezelés megváltoztathatja a PKC rendszer sejtfunciókra gyakorolt hatásait. Kimutatták például, hogy a dexametazon szelektíven növeli a cPKC γ és nPKC ϵ expresszióját, valamint aktivitását patkány agyban [Dwivedi és mtsai, 1999]. Ehhez hasonlóan mind a kortizol, mind a dexametazon szelektíven és különböző mértékben fokozta a vaszkulátúrában a cPKC α , β és a nPKC ϵ expresszióját, ugyanakkor nem változtatta a nPKC δ és az aPKC ζ szintjét [Maddali és mtsai, 2005], a kortikoszteroid pedig csökkentette a cPKC α expresszióját a bőrben [Birt és mtsai, 2001]. Jelen munkánkban protein szinten Western blot technikával kimutattuk, hogy az *in vivo* kortikoszteroid kezelésben részesülő SLE-s betegek monocitáiban – ellentétben a nem kezelt esetekkel – az nPKC δ és ϵ expressziója (csaknem teljes mértékben) normalizálódik. Hasonló eredményt kaptunk mRNS szintű vizsgálataink elvégzésekor, amikor szintén azt tapasztaltuk, hogy az *in vivo* szteroid kezelés során kizárólag az eredetileg is jelentősen csökkent nPKC δ és ϵ mRNS szintje „up-regulálódik”, míg a többi izoformáé változatlan marad (**5/B. ábra**). Ezen túlmenően érdekes volt megfigyelnünk, hogy egészséges önkéntesek monocitáiban az *in vitro* szteroid terápia más hatást eredményezett (**5/A. ábra**); itt ugyanis a hidrokortizon hatására kizárólag az nPKC ϵ mRNS expresszió fokozódását találtuk. Ezen adatok feltételezik a szteroid hatásmechanizmusának különbözőségét az egészséges és beteg emberek monocitáiban.

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

Kísérleteink második részében részletesen megvizsgáltuk egy monocita modellként alkalmazott sejtvonal, a MonoMac-6 sejtek PKC rendszerének szerepét számos sejtfolyamat szabályozásában. Többféle molekuláris biológiai és biokémiai módszert igénybe véve kimutattuk, hogy ezen sejtek, hasonlóan a normál humán monocitákhoz, funkcionálisan

működő PKC izoformákkal rendelkeznek, nevezetesen expresszálják a klasszikus cPKC α és β -t, a novel nPKC δ és ϵ -t, valamint az atípusos aPKC ζ -t (**7. és 8. ábra**). Kísérleteink során elsőként mutattuk ki, hogy a nPKC δ (ami legnagyobb mértékben van jelen a MonoMac-6 sejtekben, **8. ábra**) pozitív módon befolyásolja a sejtek proliferációját és AA termelését. Ezen megállapításunkat a következő bizonyítékokkal támasztjuk alá: (1) a kétnapos PMA kezelést követően az izoforma jelentős mértékben „down-regulálódott” - azaz alacsonyabb szinten expresszálódott - párhuzamban a forbol-észter sejtek növekedési ütemét gátló hatásával (**7. és 9. ábra**); (2) az nPKC δ specifikus, farmakológiai inhibíciója gátolta a sejtproliferációt (**11. ábra**); (3) az izoenzim szelektív inhibitora csökkentette a PMA indukált AA felszabadulást (**10. ábra**); (4) az izoformát siRNS technológiával „kiütve” a proliferáció szignifikáns mértékben csökkent (**17. ábra**). Mindemellett fontos megjegyezni, hogy az nPKC δ inhibitor Rottlerin nem befolyásolta a sejtek bazális AA termelését (**12. ábra**), ami arra utal, hogy - ellentétben a proliferáció szabályozásában betöltött szerepével - az izoforma endogén, bazális (meglehetősen magas) expressziója és aktivitása legnagyobb valószínűség szerint nem vesz részt a sejtek bazális AA termelésében. Ezzel ellentétben azt tapasztaltuk, hogy az nPKC δ rekombináns overexpressziója (tovább emelve az izoforma aktivitását) szignifikánsan növelte a sejtek bazális AA termelését (**14. ábra és 3. táblázat**), azt sugallva ezzel, hogy az izoenzim, az exogén aktivációt követően, már szerepet játszhat számos olyan ágens aktiválásában, ami serkenti az AA produkciót.

Meglepően hasonló következtetéseket sikerült levonnunk a másik magasan expresszálódó izoforma, a cPKC β MonoMac-6 sejtek funkcióiban betöltött szerepének vizsgálatakor. Nevezetesen, az izoenzim kifejeződési szintje szintén csökkent a PMA proliferációt gátló hatásával párhuzamban (**7. és 9. ábra**), azonfelül az endogén aktivitás farmakológiai inhibíciója (**11. ábra**), illetve az izoforma siRNS vezérelt „eltüntetése” (**17. ábra**) egyaránt szignifikánsan gátolta a sejtek növekedési ütemét. Ezen adataink jó

összhangban vannak azon korábbi tanulmányok eredményeivel, amelyek leírták, hogy a humán mieloid THP-1 sejtvonal antiszensz-PKC β vektorral történő transzfekciója gátolta, [Dieter és Schwende, 2000], ezen túlmenően a K562 eritroleukémia sejtekben ugyanezen izoenzim rekombináns overexpressziója fokozta a proliferációt [Murray és mtsai, 1993].

Az AA termelést vizsgálva bebizonyosodott, hogy a cPKC β overexpressziója szintén a bazális AA termelés fokozódásához vezetett (**14. ábra és 3. táblázat**), mialatt a cPKC β Gö6976 anyaggal történő gátlása kivédte a PMA AA termelést serkentő hatását (**10. ábra**). Jól korrelálnak mindezekkel azon irodalmi leírások, amelyek igazolják, hogy az egér RAW 264.7 makrofágokban a cPKC β mediálja a PMA AA termelést fokozó hatását [Lin és mtsai, 1998]. Ezen túlmenően, szintén hasonlóan az nPKC δ -hoz, a cPKC β endogén aktivitásának csökkentése sem befolyásolta a bazális AA termelést (**12. ábra**).

Végezetül szintén fontos megjegyezni, hogy a cPKC β és az nPKC δ overexpresszorokban megnövekedett AA felszabadulás teljes mértékben megszüntethető volt (hasonlóan a kontroll sejtekéhez) az iPLA₂ és DAG lipáz inhibitorok alkalmazásakor (**15. ábra**). Mindezen adataink arra utalnak, hogy a MonoMac-6 sejtekben a cPKC β és nPKC δ izoformák AA termelést fokozó hatásukat a kalcium-független PLA₂ enzimek, mint a PKC izoenzimek potenciális „downstream” célpontjainak, aktiválásán keresztül fejtik ki.

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

A cPKC α -val kapott adataink azt sugallták, hogy ez az izoforma (amely nagyon alacsony expressziós szinttel bír, **8. ábra**) minor és (legnagyobb valószínűséggel) ellentétes szerepet játszik a MonoMac-6 sejtvonal folyamatainak szabályozásában, ha összehasonlítjuk a cPKC β és a nPKC δ izoenzimek funkcióival. Az egyetlen szignifikáns változás, amit az izoenzim vizsgálatokor megfigyeltünk az volt, hogy a cPKC α overexpressziója sikeresen

megakadályozta a PMA AA termelést fokozó hatását (**14. ábra és 3. táblázat**). Érdekes módon az izoforma tranziens transzfekcióját követően sem változott meg a sejtek bazális AA termelése (**14. ábra és 3. táblázat**), ami arra utal, hogy az izoenzim nem játszik szerepet ezen sejtfolyamat szabályozásában. Ha figyelembe vesszük továbbá, hogy az alacsony kifejeződési szinttel rendelkező (**8. ábra**) cPKC α siRNS vezérelt „kiütése” kismértékben növelte a sejtek növekedési ütemét, megállapíthatjuk, hogy az izoenzim negatív szabályozó szereppel bírhat a MonoMac-6 sejtek proliferációjának szabályozásában. Ezt a hipotézist több dokumentum is alátámasztja az irodalomban. Nevezetesen (1) antiszensz-cPKC α vektorral történő transzfekció növelte a humán mieloid THP-1 sejtek proliferációját [Dieter és Schwende, 2000]; (2) a cPKC α overexpressziója gátolta a K562 humán eritroleukémia sejtek növekedési ütemét [Murray és mtsai, 1993]; (3) a 32D egér mieloid progenitor sejtvonalban a cPKC α résztvett a TPA indukált mieloid differenciációban [Mischak és mtsai, 1993]. Végezetül a cPKC α alacsony endogén expressziós szintje, valamint relatíve kis, de nem elhanyagolható, negatív funkciója a proliferáció szabályozásában megmagyarázza a cPKC inhibitor Gö6976 anyaggal kapott „meglepő” adatunkat (**11/A. ábra**). Feltételezésünk szerint a klasszikus (esetünkben cPKC α és β) izoformákat gátló Gö6976 hatását leginkább a sejtosztódást fokozó cPKC β gátlásán keresztül fejtheti ki, amelynek expressziós szintje több mint 7-szer meghaladja a cPKC α -ét (**8. ábra**), s ezzel összességében proliferációt gátló effektust eredményez.

Véleményünk szerint a nPKC ϵ és aPKC ζ nem vesz részt az előbb említett sejtfolyamatok szabályozásában. Először is ezen izoenzimek tranziens overexpressziója nem változtatta meg a sejtek bazális, vagy PMA indukált AA termelését (**14. ábra és 3. táblázat**). Ezen túlmenően a kétnapos PMA kezelés nem befolyásolta az aPKC ζ kifejeződési szintjét (**7. ábra**). Érdekes módon az nPKC ϵ szintje úgy tűnt, hogy megduplázódott a PMA adását követően (**7. ábra**), mindazonáltal fontos megjegyezni, hogy ennek az izoformának az

expressziója messze a legalacsonyabb (kevesebb, mint 1/20-a) a cPKC β -hoz viszonyítva, (**8. ábra**). Összességében ez arra engedtetett következtetni, hogy a protein szint ily mértékű változása elhanyagolható szereppel bír, különösen, ha összevetjük azt a PMA cPKC β és nPKC δ expressziójára kifejtett hatásával.

Legjobb tudomásunk szerint ez az első leírása az irodalomban annak, hogy a jelen lévő izoformák közül a különböző PKC izoenzimek specifikusan, eltérően és (leginkább) ellentétesen szabályozzák a monocitoid MonoMac-6 sejtvonal proliferációját és az AA termelését.

Kísérleteink klinikai jelentőségei, eredményeink potenciális hasznosítása

A disszertációban eddig bemutatott MonoMac-6 sejtekből és SLE-s, valamint egészséges egyének monocitáiból kapott adataink (reményeink szerint) a klinikai gyakorlatban is relevanciával bírhatnak. Korábban munkacsoportunk kimutatta, hogy szteroid kezelésben nem részesülő „frissen diagnosztizált” SLE-s betegek monocitái csökkent AA termeléssel rendelkeznek [Sipka és mtsai, 2001]. Jelen kísérleteinkben megállapítottuk, hogy ugyanezen sejtpopulációban az nPKC δ és ϵ expressziója meglehetősen alacsony (**4. ábra és 2. táblázat**). Hozzátevé ehhez, hogy mind a betegek klinikailag hatásos *in vivo*, mind az izolált monociták *in vitro* kortikoszteroid kezelése normalizálta a sejtek AA termelése mellett mindkét izoforma expressziós szintjét (mRNS és protein szinten egyaránt **4. ábra, 2. táblázat és 5/B. ábra**) arra enged következtetni, hogy az SLE-s betegek monocitáinak megváltozott AA termelésének hátterében a patológiás szintű nPKC δ és/vagy ϵ állhat. Ezen túlmenően korábbi eredményeink szintén azt sugallják, hogy a monociták AA termelésének normalizálódása az SLE-s betegek szteroid kezelésekor az iPLA₂ útvonal „reaktíválódásának” köszönhető [Sipka és mtsai, 2001]. Mindezen adatokat kiegészítve a disszertációban bemutatott eredményekkel, miszerint: (1) egészséges egyének monocitáiban

és a MonoMac-6 sejtekben a szteroid kezelés szelektíven csak az nPKC ϵ „up regulációját” eredményezte (5/A., 18/A. és B. ábra), mialatt a sejtek AA termelése nem változott (6. és 19. ábra); (2) a MonoMac-6 sejtekben az nPKC δ overexpressziója növelte meg jelentősen az AA termelést, míg az nPKC ϵ nem befolyásolta azt (14. ábra és 3. táblázat); (3) az nPKC δ overexpressziója által bekövetkezett AA termelés fokozódás kivédhető volt az iPLA₂ inhibitor alkalmazásával (15. ábra); egy érdekes hipotézisre hívja fel a figyelmet. Nevezetesen az SLE-s betegek monocitáinak csökkent AA termelésének hátterében az nPKC δ mennyiségi és funkcionális defektje áll, ami előre vetíti, hogy az izoforma sejt-specifikus szelektív aktivációja jó terápiás lehetőség lehet az SLE-hez kapcsolt monocitafunkció zavarok megoldására.

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

Fontos mindemellett hangsúlyozni, hogy ezen változtatásoknak egyelőre csak teoretikus értékei vannak. Fel kell hívni a figyelmet arra, hogy a PKC izoformák eltérő sejt- és szövetspecifitású expressziós- és funkcionális profillal rendelkeznek. Ennek megfelelően alapvető jelentőségű, hogy az izoformák aktiválása, vagy szupressziója csak a megfelelő célsejtben jöjjön létre. Nem kívánatos hatást válthat ki egy olyan izoforma aktivitásának fokozása, amely egy másik sejt-típusban például a proliferáció serkentésében játszik szerepet, s

így akár malignus tumorok létrejöttét eredményezi. További nehézségeket okozhat, hogy - az nPKC δ -t példaként véve – egy izoforma ugyanazon sejtben több funkciót is szabályoz, és az aktiválás során nemcsak az AA termelés, hanem a proliferáció is növekszik. Ennek jótékony (monocitopéniát ellensúlyozó), avagy káros (leukémiát eredményező) hatásainak feltérképezése azonban további intenzív kísérletes munkát igényelnek.

ÖSSZEFOGLALÁS

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

Kulcsszavak: protein kináz C, szisztémás lupus erythematosus, monocita, limfocita, arachidonsav, proliferáció, MonoMac-6 sejtvonal.

IRODALOMJEGYZÉK

- Akiba S., Ohno S., Chiba M., Kume K., Hayama M., Sato T. (2002): Protein kinase Calpha-dependent increase in Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in membranes and arachidonic acid liberation in zymosan-stimulated macrophage-like P388D1 cells. *Biochem Pharmacol.* 63(11), 1969-77.
- Alcocer-Varela J., and Alarcon-Segovia D. (1982): Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 69:1388.
- Amasaki Y., Kobayashi S., Takeda T., Ogura N., Jodo S., Nakabayashi T., Tsutsumi A., Fujisaku A., Koike T. (1995): Up-regulated expression of Fas antigen (CD 95) by peripheral naive and memory T cell subsets in patients with SLE: A possible mechanism for lymphopenia. *Clin Exp Immunol* 99:245-50.
- Auphan N., DiDonato D.A., Rosette C., Helmberg A., and Karin M. (1995): Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* 270:286.
- Balsinde J., Winstead M.V., Dennis E.A. (2002): Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* 531:2-6.
- Becker K.P. and Hannun Y.A. (2005): Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:1448-1461.
- Bi K., Tanaka Y., Coudronniere N., Sugie K., Hong S., van Stipdonk M.J., Altman A. (2001): Antigen-induced translocation of PKC- θ to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat Immunol* 2:556–63.

- Birt D.F., Duysen E., Wang W., Yaktine A. (2001): Corticosterone supplementation reduced selective protein kinase C isoform expression in the epidermis of adrenalectomized mice. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10(6):679-85.
- Boczán J., Boros S., Mechler F., Kovács L., Bíró T. (2000): Differential expressions of protein kinase C isozymes during proliferation and differentiation of human skeletal muscle cells in vitro. *Acta Neuropathol.* 99:96-104.
- Boczán J., Bíró T., Czifra G., Lázár J., Papp H., Bárdos H., Ádány R., Mechler F., Kovács L. (2001): Phorbol ester treatment inhibits proliferation and differentiation of cultured human skeletal muscle satellite cells by differentially acting on protein kinase C isoforms. *Acta Neuropathol.* 102:55-62.
- Bombardier C., Gladman D.D., Urowitz M.B., Caron D., Chang C.H. (1992): Derivation of the SLEDAI, a disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum.* 35:630-640.
- Boyum A. (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *J Clin Invest* 97 Suppl:77-108.
- Budman D.R., Steinberg A.D. (1977): Hematologic aspects of systemic lupus erythematosus: Current concepts. *Ann Intern Med* 86:220-9.
- Castrillo A., Pennington D.J., Otto F., Parker P.J., Owen M.J., Bosca L. (2001): Protein kinase C ϵ is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *J Exp Med* 194:1231-42.
- Clements J.L., Boerth N.J., Lee J.R., Koretzky G.A. (1999): Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu. Rev. Immunol.* 17:89.

- Coudronniere N., Villalba M., Englund N., Altman A. (2000): NF- κ B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C. PNAS 97:3394–9.
- Czifra G., Tóth I.B., Marincsák R., Juhász I., Kovács I., Ács P., Kovács L., Blumberg P.M., and Bíró T. (2006): Insulin-like growth factor-I-coupled mitogenic signaling in primary cultured human skeletal muscle cells and in C2C12 myoblasts. A central role of protein kinase C δ . Cell. Signal. 18(9):1461-72.
- Davies S.P., Reddy H., Caivano M., Cohen P. (2000): Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochem J 351:95-105.
- De Silva-Udawatta M., Kumar S.R., Greidinger E.L., Hoffman R.W. (2004): Cloned human TCR from patients with autoimmune disease can respond to two structurally distinct autoantigens. J Immunol. 172(6):3940-7.
- Decker L.V. (2003): Protein Kinase C. Oxford Press, New York.
- Delphin S., Stavnezer J. (1995): Characterization of an interleukin 4 (IL-4) responsive region in the immunoglobulin heavy chain germline epsilon promoter: regulation by NF-IL-4, a C/EBP family member and NF- κ B/p50. J. Exp. Med. 181-92.
- Dieter P., Schwende H. (2000): Protein kinase C-alpha and -beta play antagonistic roles in the differentiation process of THP-1 cells. Cell Signal. 12(5):297-302.
- Dwivedi Y., Pandey G.N. (1999): Administration of dexamethasone up-regulates protein kinase C activity and the expression of gamma and epsilon protein kinase C isozymes in the rat brain. J Neurochem. 72(1):380-7.
- Dynal A.S. (1996): Dynal technical handbook. 2nd ed. Oslo: Norway print; 34-48.
- Enyedy E.J., Nambiar M.P., Liossis S.N., Dennis G., Kammer G.M., Tsokos G.C. (2001): Fc epsilon receptor type I gamma chain replaces the deficient T cell receptor

- zeta chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 44:1114.
- Fujii Y., Fujii K., Tanaka Y. (2006): Attempt to correct abnormal signal transduction in T lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients. *Autoimmun Rev.* 5(2):143-4.
 - Gallagher R., Collins S., Trujillo J., McCredie K., Ahearn M., Tsai S., Metzgar R., Aulakh G., Ting R., Ruscetti F., Gallo R. (1979): Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54, 713–733.
 - Gomez J., de Aragon A.M., Bonay P., Pitton C., Garcia A., Silva A., Fresno M., Alvarez F., Rebollo A. (1995): Physical association and functional relationship between protein kinase C zeta and the actin cytoskeleton. *Eur J Immunol* 25:2673–8.
 - Goodnight J.A., Mischak H., Mushinski J.F. (1994): Selective involvement of protein kinase C isozymes in differentiation and neoplastic transformation. *Adv Cancer Res* 64:159–209.
 - Gottschalk L.R., Giannola D.M., Emerson S.G. (1993): Molecular regulation of the human IL-3 gene: inducible T cell-restricted expression requires intact AP-1 and Elf-1 nuclear protein binding sites. *J. Exp. Med.* 178:1681.
 - Gschwendt M., Müller H.J., Kialbassa K., Zang R., Kittstein W., Rincke G., Marks F. (1994): Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 199:93-98.
 - Guidarelli A., Cerioni L., Tommasini I., Brune B., Cantoni O. (2005): A downstream role for protein kinase Calpha in the cytosolic phospholipase A2-dependent protective signalling mediated by peroxynitrite in U937 cells. *Biochem Pharmacol* 69:1275-1286.

- Gutcher I., Webb P.R., Anderson N.G. (2003): The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:1061-1070.
- Herrera-Velit P., Knutson K.L., Reiner N.E. (1997): Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of protein kinase C ζ in bacterial lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem* 272:16445–52.
- Horwitz D.A., Stohl W., Gray J.D. (1997): T lymphocytes, natural killer cells, cytokines, and immune regulation. In Dubois' *Lupus Erythematosus*, 5th Ed. D. J. Wallace and B. H. Hahn, eds. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 155.
- Jaken S. (1996): Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8:118-173.
- Jordan M.S., Singer A.L., Koretzky G.A. (2003): Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat. Immunol.* 4:110.
- Juang Y.T., Tenbrock K., Nambiar M.P., Gourley M.F., Tsokos G.C. (2002): Defective production of functional 98-kDa form of Elf-1 is responsible for the decreased expression of TCR zeta-chain in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 169(10):6048-55.
- Kammer G.M., Khan I.U., Kammer J.A., Olorenshaw I., Mathis D. (1996): Deficient type I protein kinase A isozyme activity in systemic lupus erythematosus T lymphocytes: II. Abnormal isozyme kinetics. *J. Immunol.* 157:2690.
- Kane L.P., Lin J., Weiss A. (2000): Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 12:242.
- Karimi K., Lennartz M.R. (1995): Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis. *J Immunol* 155:5786-5794.

- Kasibhatla S., Genestier L., Green D.R. (1999): Regulation of Fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kB. *J. Biol. Chem.* 274:987.
- Kayali A.G., Austin D.A., Webster N.J. (2002): Rottlerin inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes by uncoupling mitochondrial oxidative phosphorylation. *Endocrinology* 143:3884-3896.
- Keeling D.M., Isenberg D.A. (1993): Haematological manifestations of SLE. *Blood Rev* 7:199.
- Kontny E., Ziokowska M., Ryzewska A., Maslinski W. (1999): Protein kinase C-dependent pathway is critical for the production of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6). *Cytokine* 11:839-48.
- Krishnan S., Farber D.L., Tsokos G.C. (2003): T cell rewiring in differentiation and disease. *J Immunol.* 171(7):3325-31.
- Kyttaris V.C., Krishnan S., Tsokos G.C. (2006): Systems biology in systemic lupus erythematosus: integrating genes, biology and immune function. *Autoimmunity.* 39(8):705-9.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laurence J., Wong J.E., Nachman R. (1992): The Cellular hematology of systemic lupus erythematosus. In: *Systemic Lupus Erythematosus*, 2d ed, Lahita, RG (Ed), Churchill Livingstone, New York.
- Lázár J., Szabó T., Kovács L., Blumberg P.M., Bíró T. (2003): Distinct features of recombinant vanilloid receptor-1 expressed in various expression systems. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:2228-2240.

- Leiden J.M., Wang C.Y., Petryniak B., Markovitz D.M., Nabel G.J., Thompson C.B. (1992): A novel Ets-related transcription factor, Elf-1, binds to human immunodeficiency virus type 2 regulatory elements that are required for inducible trans activation in T cells. *J. Virol.* 66:5890.
- Lennartz M.R., Brown E.J. (1991): Arachidonic acid is essential for IgG Fc receptor-mediated phagocytosis by human monocytes. *J. Immunol.* 147, 621–626.
- Lennartz M.R., Lefkowitz J.B., Bromley F.A., Brown, E.J. (1993): Immunoglobulin G-mediated phagocytosis activates a calcium-independent, phosphatidylethanolamine-specific phospholipase. *J. Leukoc. Biol.* 54, 389–398.
- Li Q., Subbulakshmi V., Oldfield C.M., Aamir R., Weyman C.M., Wolfman A., Cathcart M.K. (2007): PKC α regulates phosphorylation and enzymatic activity of cPLA2 in vitro and in activated human monocytes. *Cell Signal.* 19(2):359-66.
- Lin W.W., Chen B.C. (1998): Distinct PKC isoforms mediate the activation of cPLA2 and adenylyl cyclase by phorbol ester in RAW264.7 macrophages. *Br J Pharmacol* 125:1601-1609.
- Lin W.W., Chen B.C. (1999): Induction of cyclo-oxygenase-2 expression by methyl arachidonyl uorophosphonate in murine J774 macrophages: roles of protein kinase C, ERKs and p38 MAPK. *British Journal of Pharmacology* 126:1419-1425.
- Linker-Israeli M., Bakke A.C., Kitridou R.C., Gendler S., Gillis S., Horwitz D.A. (1983): Defective production of interleukin 1 and 2 in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *J. Immunol.* 130:2651.
- Liossis S.N., Sfrikakis P.P., Tsokos G.C. (1998): Immune cell signaling aberrations in human lupus. *Immunol. Res.* 18:27.
- Liossis S.N., Ding X.Z., Dennis G.J., Tsokos G.C. (1998): Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with

- systemic lupus erythematosus: deficient expression of the T cell receptor zeta chain. *J. Clin. Invest.* 101:1448.
- Long A., Kelleher D., Lynch S., Volkov Y. (2001): Cutting edge: protein kinase C β expression is critical for export of IL-2 from T cells. *J Immunol* 167:636–40.
 - Maddali K.K., Korzick D.H., Turk J.R., Bowles D.K. (2005): Isoform-specific modulation of coronary artery PKC by glucocorticoids. *Vascul Pharmacol.* 42(4):153-62.
 - Martiny-Baron G., Kazanietz M.G., Mischak H., Blumberg P.M., Kochs G., Hug H., Marme D., Schachtele C. (1993): Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *J Biol Chem* 268:9194-9197.
 - Mischak H., Pierce J.H., Goodnight J., Kazanietz M.G., Blumberg P.M., Mushinski J.F. (1993): Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C- α and - δ and not by protein kinase C- β II, - ϵ , - ζ , and - η . *J Biol Chem* 268:20110-20115.
 - Mischak H., Goodnight J.A., Kolch W., Martiny-Baron G.M., Schachtele C., Kazanietz M.G. (1993): Overexpression of protein kinase C- δ and - ϵ in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.* 268:6090-6096.
 - Murray N.R., Baumgardner G.P., Burns D.J., Fields A.P. (1993): Protein kinase C isotypes in human erythroleukaemia (K562) cell proliferation and differentiation. Evidence that beta II protein kinase C is required for proliferation. *J Biol Chem* 268, 15847-15853.
 - Musso M., Ghiorzo P., Fiorentini P., Giuffrida R., Ciotti P., Garre C., Ravazzolo R., Bianchi-Scarra G. (1996): An upstream positive regulatory element in human GM-

- CSF promoter is recognized by NF- κ B/Rel family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223:64.
- Nishizuka Y. (1988): The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature* 334:661-665.
 - Nishizuka Y. (1992): Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614.
 - Nossent J.C., Swaak A.J. (1991): Prevalence and significance of haematological abnormalities in patients with SLE. *Q J Med* 80:605.
 - Ohno H., Fukuhara S., Doi S., Yamasowa M., Arita Y., Sasada M., Ohno Y., Akasaka K., Uchino H. (1986): Establishment of a novel acute monoblastic leukemia cell line (YK-M2) having a near-triploid karyotype. *Cancer Res.* 46, 6400–6405.
 - Ohta M., Furukawa Y., Ide C., Akiyama N., Utakon T., Miura Y., Saito M. (1986): Establishment and characterization of four human monocytoid leukemia cell lines (JCSK-I, -S, -M and -K) with capabilities of monocytemacrophage lineage differentiation and constitutive production of interleukin-1. *Cancer Res.* 46, 3067–3074.
 - Papp H., Czifra G., Bodó E., Lázár J., Kovács I., Aleksza M., Juhász I., Ács P., Sipka S., Kovács L., Blumberg P.M., Bíró T. (2004): Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* 61:1095-1105.
 - Rellahan B.L., Jensen J.P., Howcroft T.K., Singer D.S., Bonvini E., Weissman A.M. (1998): Elf-1 regulates basal expression from the T cell antigen receptor zeta-chain gene promoter. *J. Immunol.* 160:2794.

- Shannon M. F., Himes S.R., Coles L.S. (1995): GM-CSF and IL-2 share common control mechanisms in response to costimulatory signals in T cells. *J. Leukocyte Biol.* 57:767.
- Shoenfeld Y., Ehrenfeld M. (1996): Hematologic manifestations. In: *The Clinical Management of Systemic Lupus Erythematosus*, 2d ed, Schur, PH (Ed), Lippincott, Philadelphia.
- Sipka S., Szántó S., Szűcs K., Kovács I., Kiss E., Antal-Szalmás P., Lakos G., Aleksza M., Illés Á., Gergely P., Szegedi G. (2001): Decreased arachidonic acid release in peripheral blood monocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 28(9), 2012-7.
- Smith W.L., DeWitt D.L., Garavito R.M. (2000): Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69:145-182.
- Soltoff S.P. (2001): Rottlerin is a mitochondrial uncoupler that decreases cellular ATP levels and indirectly blocks protein kinase C β tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 276:37986-37992.
- Sundstrom C.K., Nilsson K. (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17,565–577.
- Szamel M., Appel A., Schwinzer R., Resch K. (1998): Different protein kinase C isoenzymes regulate IL-2 receptor expression or IL-2 synthesis in human lymphocytes stimulated via the TCR. *J Immunol* 160:2207–14.
- Tada Y., Nagasawa K., Yamauchi Y., Tsukamoto H., Niho Y. (1991): A defect in the protein kinase C system in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 60:220.
- Tapia J.A., Jensen R.T., Garcia-Marin L.J. (2006): Rottlerin inhibits stimulated enzymatic secretion and several intracellular signaling transduction pathways in

- pancreatic acinar cells by a non-PKC-delta-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1763:25-38.
- Tsokos G.C., Nambiar M.P., Juang Y.T. (2003): Activation of the Ets transcription factor Elf-1 requires phosphorylation and glycosylation: defective expression of activated Elf-1 is involved in the decreased TCR zeta chain gene expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 987:240-5.
 - Tsuchiya M., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno K., Tada K. (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 171–176.
 - Vallador A.F., Xaus J., Comalada M., Soler C., Celada A. (2000): Protein kinase C ϵ is required for the induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol* 164:29–37.
 - Voulgarelis M., Kokori S.I., Ioannidis J.P., Tzioufas A.G., Kyriaki D., Moutsopoulos H.M. (2000): Anaemia in systemic lupus erythematosus: aetiological profile and the role of erythropoietin. *Ann Rheum Dis* 59:217.
 - Wang C.Y., Bassuk A.G., Boise L.H., Thompson C.B., Bravo R., Leiden J.M. (1994): Activation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter in T cells requires cooperative binding of Elf-1 and AP-1 transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 14:1153.
 - Way K.J., Chou E., King G.L. (2000): Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol. Sci.* 21:181-187.
 - Wong H.K., Kammer G.M., Dennis G., Tsokos G.C.(1999): Abnormal NF-kappa B activity in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus is associated with decreased p65-RelA protein expression. *J Immunol.* 163(3):1682-9.

- Zeigler-Heitbrock H.W.L., Schraut W., Wendelgab P., Strobel M., Sternsdorf T., Weber C., Aepfelbacher M., Ehlers M., Schutt C., Haas J.G. (1994): Distinct patterns of differentiation induced in the monocytic cell line Mono Mac 6. *J. Leukoc. Biol.* 55, 73–80.
- Zeigler-Heitbrock H.W.L., Thiel E., Futterer A., Herzog V., Wirtz A. (1988): Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer* 41, 456–461.
- Zheleznyak A., Brown E. (1992): Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* 267, 12042–12048.
- Zheng L., Zomerdijk T.P., Aarnoudse C., van Furth R., Nibbering P.H. (1995): Role of protein kinase C isoenzymes in Fc gamma receptor-mediated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes. *J Immunol* 155:776–84.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani az Élettani Intézet és a III. számú Belgyógyászati Klinika és Regionális Immunológiai Laboratórium valamennyi munkatársának, akik munkájukkal, figyelmességükkel és odaadásukkal segítették tevékenységemet.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, **Dr. Kovács Lászlónak**, az MTA Sejtélettani Kutatócsoport vezetőjének és **Dr. Bíró Tamásnak** segítségükért, tanácsaikért, hasznos útmutatásukért, valamint **Dr. Csernoch Lászlónak** a lehetőségért, amelyet a Ph.D. tézisek alapjául szolgáló tudományos kutatások befejezéséhez biztosított. Köszönettel tartozom emellett **Dr. Sipka Sándornak**, **Dr. Szegedi Gyulának** és **Dr. Zeher Margitnak**, valamint a III. számú Belgyógyászati Klinika valamennyi dolgozójának, hogy a klinikai munkám mellett is lehetővé tették, hogy bejezehessem a Ph.D. munkámat.

Köszönetet mondok továbbá korábbi és jelenlegi közvetlen munkatársaimnak, **Dr. Lázár Józsefnek**, **Dr. Papp Helgának**, **Dr. Czifra Gabriellának**, **Dr. Bodó Enikőnek**, **Tóth István Balázsnak**, **Dr. Aleksza Magdolnának**, **Vargáné Kiss Ibolyának**, és **Kovács Ildikónak** határtalan türelmükért, megbízhatóságukért és a mindennapok során nyújtott segítségükért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a hazai és külföldi kollaborációs partnerek segítségét, együttműködését.

KÖZLEMÉNYEK

A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke

In extenso tudományos közlemények:

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

Idézhető kivonatok:

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

Előadások, poszterek:

1. **Z. Griger, T. Bíró, E. Kiss, S. Baráth, M. Zeher, G. Szegedi, S. Sipka** (2006): Corticosteroid dependent PKC abnormalities both at mRNA and protein level in the mononuclear cells of patients with SLE. *International Congress of Immunogenomics and Immunomics 2006.* oct. 8-12, Budapest, (P 2-24, absztraktkötet 360. o.) poszter.
2. **Griger Z, Bíró T, Kiss E, Baráth S, Zeher M, Szegedi G, Sipka S.** (2006): Corticosteroid dependent PKC isoform abnormalities both at mRNA and protein level in the mononuclear cells of patient with SLE. *1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, 16th European Congress of Immunology, 2006.* sept. 6-9, Paris, (PC-1712, absztraktkötet, 162.o.) poszter.
3. **Sipka S, Griger Z, Bíró T, Aleksza M, Kiss E, Kovács I, Baráth S, Bodolay E, Zeher M, Szegedi G.** (2006): The central role of PKC delta in the impaired production of arachidonic acid in the monocytes of SLE patients. *1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology, 16th European Congress of Immunology, 2006.* sept. 6-9, Paris, (PC-1713, absztraktkötet, 162.o.) poszter.
4. **Zoltán Griger, Sándor Sipka, Tamás Bíró, Magdolna Aleksza, Emese Kiss, Edit Bodolay, Margit Zeher and Gyula Szegedi** (2005): The role of PKC delta in the impaired production of arachidonic acid in the monocytes of SLE patients. *MIT, 2005.* okt. 19-22, Sopron, előadás.
5. **Griger Zoltán, Bíró Tamás, Sipka Sándor** (2005): A protein Kináz C rendszer vizsgálata a MonoMac-6 sejtek folyamatainak szabályozásában. *Tavaszi Szél, 2005.* máj. 5-8. Debrecen (Absztraktkötet, 128-31. o.) előadás.
6. **Sándor Sipka, Zoltán Griger, Tamás Bíró, Helga Papp, Magdolna Aleksza, Emese Kiss, Margit Zeher, Edit Bodolay, and Gyula Szegedi** (2004): The examination of the protein kinase C system in the mononuclear cells of patients with systemic lupus

- erythematosus and in a model cell line. International Congress of Immunogenomics and Immunomics 2004 oct. 3-7., Budapest, P 12-14, poszter.
7. **Griger Z, Biro T, Papp H, Aleksza M, Kiss E, Zeher M, Bodolay E, Szegedi G, Sipka S** (2004): Effect of corticosteroid treatment on the protein kinase C system in monocytes of patients with systemic lupus erythematosus and in model cell lines. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS, Montreal, Canada, 2004. jul. 18-23. (előadás és poszter).
 8. **Griger Zoltán, Aleksza Magdolna, Kiss Emese, Sipka Sándor, Bíró Tamás** (2004): A kortikoszteroid kezelés hatása a protein kináz C izoenzimekre szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegek mononukleáris sejtjeiben, valamint modell sejtvonalakban MÉT LXVIII. vándorgyűlése 2004, jún. 7-9. Debrecen (Absztraktkötet 155. o.) poszter
 9. **Griger Zoltán, Papp Helga, Aleksza Magdolna, Sipka Sándor, Bíró Tamás** (2003) A protein kináz C rendszer vizsgálata szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegek mononukleáris sejtjeiben, valamint modell sejtvonalon MÉT LXVII. vándorgyűlése 2003, jún. 2-4. Pécs (Absztraktkötet 72. o.) poszter

A tézisekben fel nem használt tudományos munkák jegyzéke

In extenso tudományos közlemények:

1. **Bodo E, Biro T, Telek A, Czifra G, Griger Z, Toth BI, Mescalchin A, Ito T, Bettermann A, Kovacs L, Paus R.**(2005): A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. Am J Pathol. 166(4):985-98. **IF: 5.796**
2. **Szántó A, Weisz R, Krenács L, Csiki Z, Griger Z, Zeher M.** (2006): Korai fázisban felismert Takayasu-arteritis. LAM 16(8-9):762-7.

Idézhető kivonatok:

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

Előadások és poszterek

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

5. *Dajnoki Angéla, Nyeste Katalin, Bodó Enikő, Griger Zoltán, Tóth I. Balázs, Bíró Tamás* (2004): A vanilloid receptor-1 (VR1) funkcionális vizsgálata humán szőrtüszőeredetű külső gyökérhüvely keratinocytákban, MÉT LXVIII vándorgyűlés 2004, jún. 7-9. Debrecen (Absztraktkötet 152. o.), poszter.
6. *Nyeste Katalin, Dajnoki Angéla, Griger Zoltán, Tóth I. Balázs, Czifra Gabriella, Varga Attila, Kovács Judit, Kovács Ilona, Bíró Tamás* (2004): A vanilloid receptor-1 (VR1) kifejeződésének vizsgálata benignus prostata hyperplasiában és prostata carcinomában, MÉT LXVIII vándorgyűlés 2004, jún. 7-9. Debrecen (Absztraktkötet 159. o.), poszter.

A közlemények összesített impakt faktora: 12,865.