

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

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

Dr. Géczy Tamás

Témavezető: Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2013

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

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Géczy Tamás, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan-Neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Dr. Sántha Péter, Ph.D.
Dr. Szentmiklósi József, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2013. március 8.

Az értekezés bírálói:

Dr. Balla András, Ph.D.
Dr. Lontay Beáta, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Dr. Balla András, Ph.D.
Dr. Lontay Beáta, Ph.D.
Dr. Sántha Péter, Ph.D.
Dr. Szentmiklósi József, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2013. március 8.

BEVEZETÉS

A diacil-glicerol (DAG) és a C1 domén

A DAG, másodlagos hírvivőként, központi szerepet játszik számos extracelluláris mediátor (hormon, neurotranszmitter, növekedési faktor) aktivációs szignáljának közvetítésében. Ezen mediátorok a sejtmembrán G-protein-kapcsolt receptoraihoz és tirozin-kináz-receptoraihoz kapcsolódva különböző foszfolipáz C izoenzimeket aktiválnak, amelyek a membránban található PIP₂ lipidmolekulából IP₃-at és DAG-ot hasítanak ki. Az IP₃ útvonal a sejten belüli Ca²⁺ megemelését keresztül egy sor Ca²⁺-érzékeny jelátviteli folyamatot indíthat el, a DAG molekula pedig olyan szignál-proteinek aktiválásában vesz részt, amelyek rendelkeznek a molekula felismerésére szolgáló intramolekuláris receptor C1 doménnel. A rendhagyó szerkezetű domén jelenlétét elsőként protein kináz C (PKC) izoenzimek esetében írták le. Bebizonyosodott, hogy a DAG ligand C1 domén általi megkötése központi szerepet játszik a kináz-aktiváció és a transzlokáció mechanizmusa során. Ezen felül arra is fény derült, hogy a C1 domén számos természetes növényi anyag (forbol-észterek, bryostatinok, indolaktámok) megkötésére képes, amelyek ezáltal permanens enzimaktivációt okozhatnak. A PKC enzimeken kívül azonban számos egyéb proteincsalád rendelkezik DAG/forbol-észter megkötésére alkalmas ún. "típusos" C1 doménnel. Ide tartozik a kináz aktivitással bíró protein kináz D, DAG kináz és MRCK enzimcsalád; a kis GTP-ázok aktivációs/deaktivációs mechanizmusában szerepet játszó RasGRP és chimaerin molekulacsalád; valamint a "scaffold" funkciót ellátó Munc-13 proteinek. Ezen DAG effektor molekulák C1-doménon keresztüli aktivációja meghatározó szerepet játszik olyan alapvető sejt folyamatok jelátvitelében, mint például a sejtproliferáció, a differenciálódás, az apoptózis, az angiogenezis és a

gyógyszer-rezisztencia; ezért az utóbbi években jelentős figyelem hárult ezen jelátviteli rendszerek kutatására.

A PKC izoenzimek felépítése és aktivációs mechanizmusa

A PKC családba tartozó izoenzimek szerkezeti felépítésüket és funkcionális sajátságukat tekintve három fő csoportba sorolhatóak. A „klasszikus” csoportba (cPKC) tartozó α , β és γ izoformák aktivációjukhoz kalciumot és DAG-ot egyaránt igényelnek. A „novel” csoport (nPKC) tagjai (δ , ϵ , η és θ) teljes aktiválásukhoz csupán DAG-t igényelnek, kalciumot nem. Az „atípusos” csoportba (aPKC) tartozó ζ és $\lambda/1$ izoformák aktivációja pedig független mind a kalciumtól, mind pedig a DAG-tól. Az összes izoforma szerkezetére jellemző, hogy két fő egység építi fel a molekulákat: a kináz aktivitással bíró katalitikus egység és az enzimaktiváció szabályozásáért felelős regulatórikus egység. Az enzimaktiváció mechanizmusa során a PLC útvonalon keletkező másodlagos hírvivők a regulatórikus egység C1 és C2 jelölésű doménjaihoz kapcsolódnak, amelyek hatására: *i*) az adott PKC molekula a megfelelő intracelluláris membránstruktúrához transzlokálódik; és *ii*) konformációváltozás következik be. Ennek hatására a regulatórikus egység pszeudoszubsztrát doménje eltávolodik a katalitikus alegység szubsztrátkötő régiójától, ezáltal, felszabadulva az autoinhibíció alól, képessé válik a megfelelő szubsztrátok foszforilálására. A PKC alcsaládok közötti funkcionális különbségek a regulatórikus egység C1 és C2 doménjeinek strukturális eltéréseiből adódnak. A klasszikus izoformák C2 doménje képes kalciumkötésre, C1 doménje pedig DAG kötésre. Az aktivációhoz és a stabil membránasszociációhoz mindkét ligand megkötése szükséges. A novel izoformák C2 doménjének szerkezete nem alkalmas kalciumkötésre, de C1 doménjük nagyobb affinitással köt DAG-ot, mint a klasszikus izoformák C1 doménja; ezért ez a kapcsolat elegendő az enzimaktivációhoz és membránokhoz történő kihorgonyzáshoz. Az atípusos izoformák ugyanakkor nem tartalmaznak C2 domént, valamint C1 doménjük

sem köt DAG-ot; ezért aktivációjukban sem a Ca^{2+} , sem pedig a DAG nem játszik szerepet. Esetükben az enzimaktivitás legfontosabb szabályozói valószínűleg a PDK-1 általi foszforiláció és a különböző fehérje-fehérjekapcsolatok lehetnek.

A PKC rendszer biológiai szerepe

Bár a PKC enzimrendszer csaknem az összes humán sejtfeleségben megtalálható, az egyes sejtípusok jellegzetes és egymástól eltérő izoenzim-mintázattal rendelkeznek. Az enzimes család olyan alapvető sejt folyamatok szabályozásában vesz részt, mint a sejtproliferáció, a differenciálódás, valamint az apoptózis és a sejt migráció; ezért a PKC funkció rendellenességei fontos patogenetikai faktorként szerepelhetnek a tumorigenezis számos pontján. A tumor-promoter forból-észterek jelátviteli útvonalában való részvételük kimutatása után számos egyéb bizonyíték látott napvilágot a PKC rendszer karcinogenezisben betöltött szerepére vonatkozólag. A PKC enzimeknek kezdetben egyértelműen proliferációt serkentő funkciót tulajdonítottak; később azonban kiderült, hogy növekedést gátló, pro-apoptotikus szignálokat is közvetíthetnek. Az egyes izoformák tehát egymással ellentétes módon is befolyásolhatják a sejt sorsokat alapvetően meghatározó jelátviteli útvonalakat, akár ugyanazon sejtípus esetében is. A legmarkánsabb példa erre az nPKC ϵ és az nPKC δ antagonisztikus szerepe. Míg az nPKC ϵ a legtöbb sejtfeleség esetében proliferációs szignálokat közvetít, addig az nPKC δ pro-apoptotikus és antiproliferatív aktivitással bír ugyanezen sejtekben. Ezzel összhangban számos humán tumor esetében találtak emelkedett nPKC ϵ és csökkent nPKC δ expressziót, amelyek gyakran korreláltak a tumor grádusával is. A PKC rendszer biológiájának komplexitását emellett tovább növelik azok a megfigyelések is, melyek szerint egy adott izoforma eltérő sejtípusokban akár ellentétes funkciót is elláthat. Így például a δ izoforma egyes sejtípusokban (pl. emlőtumor) elősegítheti a sejtproliferációt is. A PKC funkciók komplexitásának ténye tehát

felhívja a figyelmet az izoforma-specifikus funkciók pontos feltérképezésének szükségességére különböző sejttípusokban.

A PKC rendszer és a bőr

Az epidermis folyamatos megújulását biztosító proliferáció és a *stratum corneum* létrehozásáért felelős terminális differenciálódás finom egyensúlya alapvető fontosságú a bőr élettani funkciójának ellátásához. Nagyszámú kísérletes adat támasztja alá a PKC enzimszisztéma központi jelentőségét a bőr biológiai folyamatainak szabályozásában. Bebizonyosodott, hogy az enzimszisztéma részt vesz az epidermális keratinocyták érési folyamatait és sejtosztódását irányító jelátviteli mechanizmusokban. Az egyes izoformák specifikus funkciójára irányuló kutatások rávilágítottak, hogy a cPKC α és az nPKC δ izoformák kulcsszerepet játszanak a differenciálódást serkentő, anti-proliferatív szignálok jelátvitelében; az nPKC ϵ izoforma ugyanakkor elősegíti a sejtosztódást. Így az α és δ izoformák csökkent aktivitása, illetve az ϵ izoforma aktivitásának fokozódása (a proliferáció/differenciálódás egyensúlyának felborulásán keresztül) egyaránt elősegítheti különböző bőrtumorok kialakulását, ahogy azt számtalan kísérletes megfigyelés alátámasztja.

A PKC enzimszisztémáról az is bebizonyosodott, hogy tagjai, az epidermális keratinocyták sejtfunkciói mellett, a szőrtüszőt alkotó különböző sejtcsoportok (belső és külső gyökérhüvely, dermális papilla stb.) funkcióját is képesek szabályozni. Kimutatták például, hogy a cPKC α és az nPKC δ aktivitása központi jelentőséggel bír a szőrszálnövekedés és a szőrtüsző életciklusának (az ún. hajciklusnak) szabályozásában. Az α és a δ izoformákon kívül még jónéhány egyéb PKC izoforma (nPKC η , nPKC ϵ , aPKC ι , cPKC γ) expresszióját írták le a szőrtüsző különböző sejtrétegeiben, amelyek szintén fontos regulatorikus funkciókat tölthetnek be.

A faggyúmirigy és sejtjei, a sebocyták

Bár a PKC rendszer központi szerepéről nagyszámú kísérletes adat áll rendelkezésre az epidermist alkotó kartinocyták és a szőrtüszők esetében, a pilosebaceous egységet alkotó másik szervecske, a faggyúmirigy esetében az enzimes család lehetséges funkcionális szerepét mindeztáig nem vizsgálták. A faggyúmirigy a bőr irha rétegében található, holokrin szekrécióra képes, alveolaris mirigy, amely legtöbbször szőrtüszőkhöz kapcsoltn helyezkedik el, (pilosebaceus egység). Fő feladata a változatos összetételű, főként neutrális lipideket tartalmazó faggyú (sebum) termelése. A faggyú a felszínen szétterülve vízhatlan védőréteget képez a bőrön, hozzájárulva ezáltal a bőr víztartalmának konzerválásához. A sebocyták szerepe ugyanakkor nem korlátozódik a bőr passzív barrier funkciójának elősegítésére, hiszen számos endokrin és parakrin mechanizmuson keresztül hozzájárulnak a bőr fiziológiás homeosztázisának fenntartásához. Immunológiai funkciójuk által segítenek továbbá a kórokozók bőrben való elszaporodását megfékezni. A holokrin szekréció során a bazális sejtsor proliferáló sebocytáinak egy része a terminális differenciálódás irányában válik elkötelezetté; citoplazmájában egyre nagyobb mennyiségű lipidet felhalmozva végül elpusztulnak, így a széteső sejtek lipidtartama az acinus kivezetőcsövébe kerül. A sebocyták proliferációját és terminális differenciálódását irányító komplex jelátviteli rendszerek szabályozásában számos (neuro)endokrin és parakrin mediátor vesz részt (pl. androgének, PPAR ligandok, növekedési hormon, inzulin, IGF-1, CRH, α -MSH, cannabinoidok, arachidonsav). Ezen mediátorok receptorait szinte kivétel nélkül sikerült kimutatni sebocytákban; kiemelendő, hogy közülük számos receptor jelátviteli útvonalában felmerülhet a PKC rendszer potenciális szerepe.

A faggyúmirigy sebocytáinak megváltozott proliferációs és differenciációs képessége több bőrbetegség (pl. seborrhoea, acne vulgaris, rosacea, rhinophyma, sebaceous carcinoma) etiológiájában játszik meghatározó szerepet. Incidenciája és prevalenciája alapján kiemelkedik ezen betegségek közül az acne, amelynél a

komplex patogenezis középpontjában a kóros faggyúmirigy-funkció áll. A terminális differenciálódást elősegítő tényezők túlsúlya a sebocyták fokozott zsírtermeléséhez vezet, amely létrehozza a betegség egyik alappillérenek tartott (hyper)seborrhoeás állapotot. A faggyúmirigy sejtjei ugyanakkor részt vesznek a lokális gyulladást kiváltó kóros immunválaszok létrehozásában is, amely a betegség másik alappilléret adja. Különböző gyulladási induktor szignálok hatására a sebocyták számos proinflammatorikus mediátort termelnek (pl. leukotriének, prosztaglandinok, citokinek). Ilyen gyulladási ágens pl. az arachidonsav, amely parakrin faktorként fokozza a sebocyták lipidszintézisét is, ezáltal fontos összekötő kapcsolatot hoz létre a patogenezis két kulcstényezője, a (hyper)seborrhoea és a lokális gyulladás között.

A faggyúmirigy-funkciót vizsgáló kutatásokat nagyban elősegítette a humán faggyúmirigyből származó immortalizált sejtvonalak létrehozása, hiszen a sebocyták primer tenyésztési körülményei korlátozott ideig tarthatóak csak fenn. Ezzel szemben a sejtvonalak (mint pl. a SEB-1, a Seb-E6E7 vagy az általunk használt SZ95) gyakorlatilag korlátlan ideig fenntarthatók, ugyanakkor kiválóan alkalmasak a normál humán sebocyták biológiai folyamatainak modellezésére és a jelátviteli rendszereik molekuláris szintű feltérképezésére.

Az atípusos C1 doménnel rendelkező jelátviteli fehérjék

A DAG/forbol-észter-érzékeny, típusos C1 doménnel rendelkező molekulacsaládok (lásd fenn) mellett jelentős számban írtak le olyan jelátviteli fehérjéket is, amelyek atípusos (azaz ligandkötésre alkalmatlan) C1 doménnel rendelkeznek. Ezek egy részénél (c-Raf, KSR) a ligandkötés hiányát a kötőzseb geometriai felépítésének nagyfokú torzulása magyarázza. Másik részüknél azonban, a szerkezeti vizsgálatok alapján, a C1 domén kötőzsebének struktúrája alkalmasnak tűnik a ligandkötésre. Laboratóriumunk jelenleg hat ilyen fehérje ligandaffinitásának jellegzetességeit vizsgálja (aPKC ζ és λ_1 , RasGRP2, Vav1, 2 és 3). Az aPKC izoformák esetében korábban már sikerült azonosítanunk azokat

a molekuláris determinánsokat, amelyek a hiányzó illetve jelentősen csökkent ligandaffinitásért felelősek. Jelen munkánkban a Vav1 C1 doménjének affinitását meghatározó szerkezeti faktorokat elemeztük. A receptorstruktúra ligandaffinitását meghatározó tényezők pontos feltérképezése nagyban elősegítheti a DAG effektor molekulák enzimaktivitásának C1 doménon keresztüli, szelektív modulálására irányuló törekvéseket. Emellett olyan új molekuláris célpontok azonosítására nyílik lehetőség, amelyek C1 doménjét módosított DAG analógokkal célozhatjuk meg. Végezetül, munkánk által mélyebb betekintést nyerhetünk a DAG komplex jelátviteli rendszerébe is.

A Vav1 molekula biológiája

A Vav1 protein egy guanin nukleotid kicserélő (GNE) aktivitással bíró jelátviteli fehérje, amely főként a Rho/Rac családba tartozó kis GTPázok funkcióját szabályozza. Ezáltal részt vesz többek között a citoszkeleton átrendeződésének, a sejtciklus progressziójának, a génexpresszióknak, az adhézióknak, a migrációknak, valamint a sejtosztódás és sejthalál folyamatainak szabályozásában. A sokoldalú molekula, GNE aktivitásán túl, számos jelátviteli útvonalban szerepelhet adapter modulként, különböző fehérje-fehérje kapcsolatok elősegítése révén. A Vav család másik két tagjától (Vav2 és 3) eltérően, a Vav1 fiziológiai körülmények között kizárólag csontvelői eredetű sejtekben expresszálódik. Enzimaktivitása és adapter funkciója révén részt vesz többek között a T-limfociták érési folyamataiban, valamint az antigének általi aktiválásuk jelátviteli útvonalában. Ezenfelül a kutatások az immunrendszer számos egyéb sejtípusának (B-limfociták, makrofágok, NK sejtek) esetében is rámutattak a Vav1 központi jelentőségére. Mindezekon túl, jónéhány nem-hemopoetikus eredetű solid tumornál is felmerült a Vav1 patogenetikai szerepe. Bár mutáns Vav1 proteint ezidáig egyetlen tumorból sem azonosítottak, a vad típusú Vav1 aberráns expressziója feltehetőleg szerepet játszik olyan

malignomák kialakulásában és progressziójában, mint a neuroblastoma, a pancreas ductális adenocarcinomája és a melanoma malignum.

A Vav1 molekula szerkezete és az enzimaktivitás szabályozása

A Vav1 molekula jelátviteli rendszerekben betöltött sokoldalú szabályozó szerepét szerkezeti doménjeinek változatossága magyarázza. A GNE aktivitásért a DH domén felelős, míg a DH domént körülvevő elemek (CH domén, PH domén, Ac régió, C1 domén) az enzimaktivitást szabályozzák. A Vav enzimek ugyanakkor egyedülállóak a GNE aktivitással rendelkező jelátviteli fehérjék között, mivel közülük csak ők rendelkeznek SH2 és SH3 doménnel. Ezen, a tirozin foszforilációs útvonalak jelátviteli molekuláira jellemző domének segítségével a Vav enzimek számos fehérje-fehérje interakciót serkenthetnek, így fontos molekuláris adapter funkciókat látnak el.

A Vav1 GNE aktivitásának egyik legjobban jellemzett és legfontosabb szabályozója az Ac régióban található Tyr¹⁷⁴ aminosav tirozin kinázok általi foszforilációja, amely olyan intramolekuláris konformációs változásokat indít be, amelynek hatására a molekula DH doménja felszabadul az autoinhibíció alól. Emellett számos egyéb faktor is képes a Vav1 enzimaktivitását befolyásolni. A kísérletek tanúsága szerint a C1 domén is elengedhetetlenül fontos a megfelelő enzimaktivitás fenntartásában. Korábbi (direkt C1 domén és Vav1 szubsztrát interakciót feltételező) modellekkel ellentétben, a legújabb vizsgálatok tanúsága szerint a C1 domén és a DH domén közötti szoros intramolekuláris kötések stabilizálják az enzimaktivitás szempontjából optimális DH domén konformációt, ezáltal elősegítvén a hatékony GDP/GTP cserét a szubsztrát molekulán. A ligandkötés hiánya miatt a Vav1 C1 doménjét az atípusos C1 domének közé sorolták. A legújabb krisztallográfiás elemzések tanúsága szerint ugyanakkor a Vav1 C1 (feltételezett) kötőhelyének térszerkezete gyakorlatilag teljesen analóg a nagy ligandaffinitással rendelkező nPKC δ C1b doménjének kötőhelyével. Ráadásul arra is fény derült, hogy a C1 domén kötőhelye a DH és

C1 domének közötti szoros intramolekuláris kötések közvetlen közelében helyezkedik el. Ezek alapján felvetődik, hogy a megfelelő szerkezetű ligandok (pl. módosított DAG- vagy forbol-észter-analógok) beilleszkedése a kötőhelyre potenciálisan befolyásolhatja az enzimaktivitást, a molekulán belüli struktúrális kapcsolatok megváltoztatása révén. Munkánk során a Vav1 C1 doménjének ligandaffinitását meghatározó szerkezeti determinánsokat vizsgáltuk.

CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink első felében a PKC rendszer szerepét kívántuk feltérképezni, a faggyúmirigyek funkcióját meghatározó jelátviteli folyamatok szabályozásában. A normál humán sebocyták *in vitro* modelljeként immortalizált SZ95 sejtvonalat használtunk, és az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen PKC izoenzimeket expresszálnak a humán SZ95 sebocyták?
2. Farmakológiai módszerekkel kimutatható-e a PKC rendszer funkcionális szerepe az SZ95 sebocyták alapvető sejtfolymatainak (proliferáció, differenciálódás, apoptózis) szabályozásában?
3. Molekuláris biológiai módszerekkel (géncsendesítés) azonosíthatók-e a PKC rendszer izoforma-specifikus szabályozó funkciói?
4. A gyulladáshoz vezető prekursor molekula arachidonsav sejt hatásainak jelátvitelében kimutatható-e a PKC izoenzimek szerepe?

Kísérleteink második felében az atípusos C1 doménnel rendelkező, GEF molekula, a Vav1 DAG/forbol-észterek iránti affinitásának molekuláris determinánsait vizsgáltuk. Radioaktív ligandkötődés, rekombináns géntechnológia és molekulamodellzés felhasználásával az alábbi kérdésekre kerestünk magyarázatot:

1. Az izolált Vav1 C1 képes lehet-e DAG/forbol-észter ligandok kötésére?

2. Molekulamodellek alapján milyen szerkezeti determinánsok állhatnak a Vav1 C1 csökkent/hiányzó ligandérzékenységének hátterében?
3. Irányított mutagenézis felhasználásával beazonosíthatók-e a Vav C1 csökkent/hiányzó ligandaffinitásáért felelős aminosavak?
4. Ezen ismeretek alapján lehetséges-e Vav1 C1-szelektív, szintetikus DAG-analógok kifejlesztése?

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

A humán faggyúmirigyből származó SZ95 sebocytákat Sebomed Basal Medium-ban tenyésztettük, amelyet embrionális borjú szérummal (FBS), 1 mM CaCl_2 -dal, humán rekombináns epidermális növekedési faktorról és antibiotikumokkal egészítettünk ki. A transzlokációs kísérletekhez használt, humán prosztata adenocarcinomából származó LNCaP sejtvonalat FBS-sel és 2 mM L-glutaminnal kiegészített RPMI-1640 médiumban tenyésztettük.

Western blot

A sejtenyészetet lízis pufferben homogenizáltuk, és jégen ultrahangos feltárást végeztünk. A lizátumok proteintartalmának meghatározása után SDS-t és β -merkaptoetanolt tartalmazó mintapufferben összeállítottuk mintáinkat, majd főzéssel denaturáltuk a fehérjéket. Az így elkészített mintákból azonos mennyiségeket felhasználva SDS poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk. Ezután a gélben lévő proteineket nitrocellulóz membránra transzferáltuk, a membrán szabad kötőhelyeit blokkoltuk és a megfelelő PKC izoforma ellen termeltetett elsődleges antitestekkel, illetve citokróm-C ellenes antitesttel inkubáltuk őket. Mosást követően torma-peroxidázzal konjugált másodlagos

antitesttel jelöltük a membránokat, majd ismételt mosások után az immunjeleket kemilumineszcens módszer segítségével tettük láthatóvá, Intelligent Dark Box készülék felhasználásával. A kapott immunjelek denzitometriás analízisét Image Pro Plus szoftverrel végeztük el.

PKC rendszer vizsgálata immuncitokémia és konfokális mikroszkópia segítségével

A PKC izoformák expressziós mintázatát immuncitokémia, a szubcelluláris lokalizációjukban bekövetkező változásokat pedig konfokális mikroszkópia segítségével vizsgáltuk SZ95 sebocytákban. A sejteket 60-70%-os konfluencia eléréséig tenyésztettük, majd a szubcelluláris lokalizációra irányuló vizsgálatokban elvégeztük a megfelelő farmakológiai kezeléseket (az expressziós vizsgálatok előtt farmakológiai kezelés nem történt). Ezután a sejteket fixáltuk, majd permeabilizálást és blokkolást követően a megfelelő PKC izoforma-ellenes elsődleges antitesttel inkubáltuk őket; végül a metszeteket FITC-konjugált másodlagos antitesttel jelöltük. Az expressziós mintázatra irányuló vizsgálatokban fluoreszcens mikroszkóp, a szubcelluláris lokalizáció detektálására irányuló kísérletekben pedig konfokális mikroszkóp segítségével készítettünk felvételeket.

Kvantitatív „real-time” PCR (Q-PCR)

A sejtek teljes RNS tartalmát TRIzol felhasználásával izoláltuk. A teljes RNS 3 µg-jából kiindulva AMV reverz transzkriptáz és oligodT primer segítségével állítottunk elő cDNS-t. A cDNS-ből kvantitatív "real-time" PCR (Q-PCR) segítségével mutattuk ki az egyes PKC izoenzimek specifikus transzkriptjeit TaqMan primerek és próbák alkalmazásával, a TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol-t követve. Az egyes PKC izoenzimek relatív

génexpresszióját a humán gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) transzkriptjének mennyiségére vonatkoztatva adtuk meg.

Az intracelluláris lipidtartalom meghatározása

A sebocyták lipidtartalmának szemikvantitatív vizsgálatához a sejteket üveg fedőlemezen tenyésztettük. A megfelelő kezelések után paraformaldehiddel fixáltuk őket, majd vakuólumaik lipidtartalmát Oil-Red O festékkel tettük láthatóvá; a sejtmagokat pedig Mayer-féle hematoxilinnal festettük meg. Az így megfestett sejteket beágyazó médiummal fedtük, majd fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A lipidtartalom kvantitatív vizsgálatához a sejteket speciális fluorimetriás lemezeken („black-well/cear bottom”), tenyésztettük, majd a megfelelő kezeléseket követően fluoreszcens Nile Red festéket tartalmazó oldatban inkubáltuk őket. A sejtek lipidmolekuláihoz kötődő Nile Red fluoreszcencia intenzitását fluoreszcens microplate reader-rel (FLIPR) detektáltuk. A neutrális lipideket 485 nm-es excitációs és 565 nm-es emissziós hullámhossz mellett detektáltuk, a poláros lipidek esetében 540 nm-es excitációs és 620 nm-es emissziós hullámhosszat alkalmaztunk.

Az élő sejtek számának meghatározása

A sejtszám vizsgálatához kolorimetriás MTT assay-t alkalmaztunk. A 96-lyukú lemezekben tenyésztett sejteket a megfelelő kezelések után MTT oldatban inkubáltuk. A sejtekben keletkező formazán kristályokat izopropanolban oldott sósav segítségével feloldottuk, majd koncentrációjukat kolorimetriás úton határoztuk meg 550 nm-en. A mért abszorbancia az élő sejtek számával korrelál.

Az apoptotikus folyamatok vizsgálata

Az apoptotikus folyamatok egyik korai, szenzitív markere a mitokondriális membránpotenciál csökkenése, amelynek detektálásához MitoProbe™ DiIC₁(5)

Assay Kit-et használtunk. Az SZ95 sejteket speciális fluorimetriás lemezekben tenyésztettük, majd a megfelelő kezelések után fluoreszcens DiI_C₁(5) anyagot tartalmazó oldatban inkubáltuk őket, amely a mitokondriális membránpotenciál nagyságának függvényében akkumulálódik a sejtek mitokondriumaiban. A felhalmozott DiI_C₁(5) fluoreszcencia intenzitását 630 nm-es excitációs és 670 nm-es emissziós hullámhosszon mértük. Az apoptotikus folyamatok indukálódásának jeleként csökkent mitokondriális membránpotenciált mértünk. A pozitív kontrollként használt sejtekben a membránpotenciál csökkenését karbonilcianid-3-klorofenil-hidrazonnal (CCCP-vel) váltottuk ki.

A citotoxicitás/sejtnekrózis vizsgálata

A citotoxicitás vizsgálatát fluoreszcens SYTOX Green festék segítségével határoztuk meg, melynek nagyméretű molekulái az ép sejtmembránon nem permeálnak. A a sejtnekrózis következtében rupturált membránok pórusain keresztül ugyanakkor képesek bejutni a sejtekbe, ahol a duplaszálú DNS-hez kötődnek; ezért a SYTOX Green jelintenzitás növekedése a nekrotikus folyamatok kiváló markere. Az SZ95 sejteket speciális fluorimetriás lemezekben tenyésztettük, majd a megfelelő kezelések után SYTOX Green reagenst tartalmazó oldatban inkubáltuk őket. A sejtekben felhalmozott SYTOX Green fluoreszcencia intenzitását 490 nm-es gerjesztési és 520 nm-es emissziós hullámhossz mellett detektáltuk. Pozitív kontrollként lízis pufferben inkubált sejtpopulációt használtunk.

RNS interferencia (RNSi)

Az SZ95 sebocytákat 40-60%-os konfluencia eléréséig tenyésztettük, majd 40 nM humán cPKC α -, nPKC δ - és aPKC ζ -specifikus, duplaszálú kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal transzfektáltuk, Lipofectamin RNAiMAX transzfekciós reagens felhasználásával. Negatív kontrollként a sejteket Santa

Cruz Control siRNA-A és siRNA-B duplaszálú siRNS-sel transzfektáltuk, amelyek semmilyen ismert mRNS szekvenciával nem mutatnak homológiát (scrambled siRNS). A szelektív géncsendesítés hatékonyságát Western blot segítségével naponta ellenőriztük. A lipidszintézisére, a sejtnövekedésre, valamint az apoptotikus és citotoxikus folyamatok vizsgálatára irányuló további kísérleteinket a legalacsonyabb expressziós szintek mellett végeztük.

GST- és GFP-fúziós C1 domének létrehozása

A rekombináns PKC δ C1b domén glutation-S-transzferázzal (GST-vel) jelölt változatát (PKC δ -C1b-GST) korábbi munkáink során készítettük el. A Vav1 izolált C1 doménjének GST-fúziós konstruktját (Vav1-C1-GST) a következőképpen hoztuk létre. A teljes Vav1 proteint kódoló cDNS szekvenciát templátként használva elvégeztük a C1 domént kódoló szakasz PCR amplifikációját, EcoRI hasítási szekvenciákat építve a keletkezett cDNS fragmentumok mindkét végére. Ezután EcoRI restrikciós endonukléázzal emésztettük a reakció során keletkezett DNS szakaszokat; ezzel párhuzamosan szintén EcoRI-gyel emésztettük a célvektorként funkcionáló pGEX-5X-1 bakteriális expressziós plazmidot, amely tartalmazta a GST kódoló szekvenciát. Ezt követően elvégeztük a két lineáris DNS fragmentum kovalens összekapcsolását (ligáció). A létrehozott rekombináns Vav1-C1-GST konstrukt (és a korábban előállított PKC δ -C1b-GST konstrukt) a GFP-fúziós C1 domének klónozása során templátként volt felhasználható. EcoRI endonukléázzal emésztve ezen PKC δ C1b és a Vav1 C1 szekvenciákat tartalmazó pGEX-5X-1 plazmidokat lehetőségünk nyílt a megfelelő cDNS fragmentumok kivágására. A GFP-t kódoló pEGFP-C2 eukarióta expressziós vektor EcoRI-gyel történő emésztését követően, a kivágott cDNS szakaszokat a linearizált célvektorhoz ligáltuk. A molekuláris klónozással előállított GST és GFP fehérjékkel jelölt PKC δ C1b és Vav1 C1 konstruktok szekvenciáinak helyességét DNS szekvenálás segítségével ellenőriztük.

Irányított mutagenézis (site-directed mutagenesis)

A PKC δ C1b domént, illetve a Vav1 C1 domént kódoló DNS szakaszokon a megfelelő lokalizációkban pontmutációkat hoztunk létre a GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System segítségével. Az így létrehozott pontmutációk mindkét C1 domén esetében a 9-es, a 10-es, a 11-es, a 22-es, a 24-es és 26-os aminosavakat érintették különböző kombinációkban (egyszeres és többszörös mutánsok). A GST-fúziós C1 domén mutánsok megalkotásánál templátként a klónozás segítségével korábban létrehozott PKC δ -C1b-GST és Vav1-C1-GST konstruktok szolgáltak. A GFP-fúziós C1 domén mutánsokat közvetlenül a megfelelő GST-fúziós C1 domén mutánsokból hoztuk létre azáltal, hogy a mutált cDNS szakaszt (PKC δ C1b vagy Vav1 C1) EcoRI-gyel kivágtuk a pGEX-5X-1 plazmidból, majd ligáció segítségével a pEGFP-C2 vektorba illesztettük. A létrehozott C1 domén mutánsok szekvenciáinak helyességét DNS szekvenálás segítségével ellenőriztük.

Vav1-GFP konstruktok létrehozása (vad típus, tripla mutáns, ötszörös mutáns)

A teljes nagyságú Vav1 protein GFP-vel jelölt rekombináns változatát (Vav1-GFP) a pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit segítségével hoztuk létre. A teljes Vav1-et kódoló cDNS szekvenciát templátként használva elsőként elvégeztük a proteint kódoló szekvencia PCR amplifikációját. Az így "felamplifikált" lineáris, tompa végű DNS szakaszt a módszer alapjául szolgáló TOPO reakció felhasználásával közvetlenül (azaz endonuklázal való hasítás nélkül) a pENTR/D-TOPO jelölésű köztes (Entry) vektorba juttattuk. Ezután a Gateway módszer LR rekombinációs reakciójának felhasználásával a Vav1-et kódoló cDNS szakaszt a köztes vektorból egy lépésben a GFP-t kódoló eukarióta expressziós célvektorba (pcDNA-DEST53) juttattuk. A teljes Vav1 fehérje mutáns változatai a C1 domén mutánsok esetében leírt irányított mutagenézishez teljesen hasonló módon, a GeneTailor™ Site-Directed

Mutagenesis System segítségével kerültek megalkotásra. Az így létrehozott Vav1-GFP konstruktok (vad típus és mutánsok) szekvenciáinak helyességét szintén DNS szekvenálás segítségével ellenőriztük.

A GST-fúziós fehérjék expressziója E. coli-ban; fehérjetisztítás

A PKC δ -C1b-GST és a Vav1-C1-GST konstruktokat BL21-AI jelzésű kompetens *E. coli* baktériumokba juttattuk transzformáció segítségével, majd a sejteket 37°C-on növesztettük addig, amíg a baktérium szuszpenzió optikai denzitása elérte a 0,6-0,8-as értéket. A GST-fúziós géntermékek kifejeződését ekkor a szuszpenzióhoz adott izopropil-O-D-tiogalaktopiranozid és L-arabinóz hozzáadásával indukáltuk. Ezután jégen ultrahangos feltárást végeztünk B-PER protein extrakciós reagens felhasználásával. A sejtek által termelt GST-fúziós peptideket B-PER GST Spin Purification Kit segítségével megtisztítottuk, majd a továbbiakban -80 °C-on, 30%-os glicerol oldatban tároltuk.

A GFP-jelölt fehérjék intracelluláris transzlokációja

LNCaP sejteket speciális Ibidi tenyésztőedényeken növesztettünk 48 órán keresztül, majd a megfelelő GFP-jelölt rekombináns konstruktokkal transzfektáltuk őket Lipofectamine és Plus reagensek felhasználásával. A fluoreszcens fúziós proteineket expresszáló sejteket 24 óra elteltével konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A gerjesztés 488 nm-en történt, az emissziót pedig BP 500-530 nm filter segítségével detektáltuk. A rekombináns proteinek kezelés hatására bekövetkező intracelluláris transzlokációját sorozatfelvételek segítségével követtük nyomon; ennek során harminc percen keresztül fél percenként készítettünk felvételeket, 63x-os olaj immerziós objektívet használva. A transzlokáció mértékének kvantitatív megítéléséhez felvételeinket Zeiss AIM szoftver segítségével analizáltuk, a megfelelő algoritmus szerint.

Radioktív ligandkötődés ($[^3\text{H}]\text{PDBu}$ -kötés) vizsgálata

Az egyes C1 domének forbol-észterek iránti affinitását radioaktív ligandkötési vizsgálatok segítségével határoztuk meg. Ennek során a foszfatidil-szerin tartalmú oldatba helyezett receptorhoz (rekombináns C1 domén) növekvő koncentrációjú, tríciummal jelölt $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ -t adtunk, majd a reakcióelegyet $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on 5 percig inkubáltuk. Ezután a receptor-ligand komplexet 35%-os polietilén-glikol oldattal precipitáltuk, majd centrifugálás segítségével az oldattól elválasztottuk. A felülúszóban maradt szabad ligandok és a pelletbe került receptor-kötött ligand molekulák koncentrációját a radioaktivitás nagyságának detektálása révén határozhattuk meg, Tri-Carb 2810TR szcintillációs számláló segítségével. A koncentrációk ismeretében meghatározhattuk az adott ligandkoncentráció mellett létrejövő specifikus ligandkötődést. Több különböző ligandkoncentráció mellett meghatározott specifikus ligandkötődés ismeretében kiszámolhattuk az adott receptor-ligand párosra jellemző disszociációs konstans (K_d) értékét, amely megadta a receptor ligand iránti affinitásának nagyságát. A radioaktívan nem jelzett ligandok (DAG-laktonok) receptorral szembeni affinitását ezen módszer egy módosított változatának segítségével vizsgáltuk, amely az azonos kötőhelyért történő kompetíció elvén alapult (a radioaktív $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ affinitásához mérve a jelöletlen molekula kötődésének erősségét). Az ezzel a módszerrel meghatározott "inhibitorikus" disszociációs konstans (K_i érték) megadta a receptormolekulának (C1 domén) a jelöletlen ligand (DAG lakton) iránti affinitását.

EREDMÉNYEK

A PKC rendszer farmakológiai modulációja megváltoztatja a humán SZ95 sebocyták lipidtermelését, ugyanakkor nem befolyásolja életképességüket

Immuncitokémia, Western blot és Q-PCR segítségével az alábbi öt PKC izoforma kifejeződését sikerült kimutatnunk SZ95 sebocytákban: cPKC α ; nPKC δ , ϵ , és η ; valamint aPKC ζ . (Az enzimesalád többi tagja sem mRNS, sem pedig protein szinten nem volt detektálható.) A Q-PCR tanúsága szerint az öt izoforma közül az α , δ és ζ izoenzimek expressziós szintje magas volt, az ϵ és η izoformák viszont alacsony expressziót mutattak. Ezután megvizsgáltuk a PKC rendszer aktivációjának hatását a sebocyták terminális differenciálódását jelző sejt folyamatokban (zsírtermelés, apoptózis). A Nile-Red-jelölést követő fluorimetriás analízis tanúsága szerint a PKC aktivátor PMA dózisfüggő módon növelte az SZ95 sejtek neutrális lipidtartalmát. A PKC inhibitorokkal (GF109203X, Gö6976 és Rottlerin) történő szimultán kezelések alapján több PKC izoforma lehetséges aktivációja is felmerült a PMA celluláris hatásának közvetítésében, hiszen mindhárom gátlószer képes volt (részlegesen) visszaszorítani a PMA által kiváltott lipidtermelés-növekedést. Önmagában alkalmazva ugyanakkor egyik inhibitor sem változtatta meg a sejt kultúrák lipidtartalmát, amely alapján arra következtethettünk, hogy az endogén PKC aktivitás nem befolyásolja a sejt kultúrák bazális lipidszintézisét. Emellett az is kiderült, hogy a PKC rendszer farmakológiai befolyásolása nem befolyásolta a sejtek életképességét és nem okoz sejthalált (apoptózist vagy nekrozist).

A PMA lipidszintézist fokozó hatása a cPKC α és az nPKC δ aktiválásán keresztül valósul meg SZ95 sebocytákban

A farmakológiai módszerekkel végzett kísérleteink után a továbbiakban különböző sejt- és molekuláris biológiai megközelítéseket alkalmazva kívántunk

pontosabb képet alkotni a sebocyták legkifejezettebb expressziót mutató PKC izoformáinak (α , δ és ζ) izoenzim-specifikus szerepéről. Az izoforma-aktiváció bizonyítékeként elsőként a forbol-észter kezelés hatására bekövetkező transzlokációs és down-regulációs folyamatokat vizsgáltuk immunfluoreszcens jelölést követő konfokális mikroszkópia, illetve Western blot segítségével. Ezen kísérletek alapján nyilvánvalóvá vált, hogy PMA hatására az α és a δ izoformák aktiválódnak, hiszen: *i*) a ligand (10 nM PMA) alkalmazása után 1 órával az α és δ izoformák intracelluláris redisztribúcióját (sejtmembránba, magmembránba, illetve egyéb intracelluláris membránstruktúrákba történő áthelyeződés) figyelhettük meg; és *ii*) a hosszútávú kezelés hatására (a második naptól) mindkét izoforma expressziója drámaian lecsökkent a down-reguláció következtében. A ζ izoforma esetében ugyanakkor nem tapasztaltunk sem transzlokációt, sem pedig down-regulációt, vagyis ezen izoforma (ahogy várható volt) nem aktiválódott PMA hatására. Ezt követően RNS interferencia segítségével vizsgáltuk az izoformák részvételét a PMA lipidszintézist fokozó hatásának jelátviteli útvonalában. Az izoforma-specifikus siRNS-ek hatékony és szelektív expresszió-csökkentésének bizonyítása után elvégeztük az α -, δ - és ζ -specifikus siRNS-sel transzfektált sejtpopulációk lipidszintézisének vizsgálatát (Nile-Red-jelölés) bazális körülmények között, illetve forbol-észterrel való kezelés után. Megállapítottuk, hogy a PMA által aktivált két izoforma, az α és a δ , részt vesz a forbol-észter lipidszintézist fokozó celluláris hatásának szignáltranszdukciós útvonalában, hiszen mind az α , mind pedig a δ izoforma expressziójának szelektív gátlása képes volt részlegesen kivédeni a PMA lipidszintézis-fokozó hatását. A két izoforma kifejeződésének visszaszorítása ugyanakkor nem volt hatással a sebocyták bazális lipidszintézisére, továbbá nem változtatta meg a sejtek életképességét és nem okozott sem apoptótikus, sem pedig sem a nekrotikus sejthalált. Ezen felül fontos megfigyelésünk volt az is, hogy az aPKC ζ endogén aktivitása olyan jelátviteli útvonalakban játszhat kulcsszerepet, melyek gátolják a sebocyták lipidtermelését, valamint kivédik a

terminális differenciálódás következtében beinduló apoptotikus folyamatokat. Az aPKC ζ expresszió szelektív gátlása ugyanis (az α és a δ izoenzimeknél észleltekkkel szöges ellentétben) jelentősen fokozta a sejtek lipidtermelését, valamint az apoptotikus folyamatok fokozódásához és az életképesség csökkenéséhez vezetett.

Az arachidonsav (AA) sejthatása az nPKC δ aktiválásán keresztül valósul meg

Korábbi kísérleteinkhez hasonlóan kimutattuk, hogy a sebocyták differenciálódási programját befolyásolni képes számos endokrin és parakrin ágens közül a gyulladáshoz vezető lipidmediátorok prekursora, az AA (a PMA-hoz hasonlóan, de attól jelentősebb mértékben) fokozza a sebocyták lipidtermelését. Farmakológiai vizsgálataink alapján bebizonyosodott, hogy ezen izoformák közül a δ szerepet játszhat az AA lipidszintézis-fokozó hatásának jelátvitelében, hiszen a δ -specifikus inhibitor Rottlerin (hasonlóan a klasszikus és a novel izoformák gátlására egyaránt képes GF109203X-hez) részlegesen kivédte az AA által indukált lipidtermelés-fokozódást. A klasszikus izoformák inhibitorának, a Gö6976 anyagnak a „hatástalansága” alapján ugyanakkor a cPKC α közvetítő szerepe az AA ezen sejthatásában nem tűnt valószínűnek. A lipidszintézis fokozásán túl az AA-ról az is ismert volt, hogy (a PMA-tól eltérően) képes apoptózist indukálni sebocytákban. A mitokondriális membránpotenciál csökkenésének (mint apoptózis markernek) vizsgálata rámutatott, hogy a δ izoforma az AA ezen sejthatásában is szerepet játszhat, mivel a fent említett két inhibitor (Rottlerin, GF109203X) az AA által indukált apoptotikus folyamatokat is hatásosan csökkentette.

Az egyes PKC izoformák specifikus effektor szerepének pontosabb feltérképezéséhez (a PMA esetében megismert gondolatmenet analógiájára) az AA esetében is elvégeztük a fent említett sejt- és molekuláris biológia megközelítéseket alkalmazó kísérleteket. A rövidtávú AA kezelést követő konfokális mikroszkópia, valamint a hosszútávú kezelést követő Western blot

segítségével bebizonyosodott, hogy kizárólag a δ izoforma esetében tapasztalható az enzimaktivációra utaló tranziens, intracelluláris transzlokáció, valamint az expressziós szintet csökkentő down-reguláció (az α és ζ esetében az AA kezelés nem okozott sem transzlokációt, sem down-regulációt). Ezek alapján tehát úgy tűnt, hogy az AA szelektíven aktiválja a δ izoformát. Ezt erősítették meg RNS interferencia kísérleteink is. Az α , δ és ζ izoformákra specifikus siRNS-sel transzfektált sejtpopulációk lipidtartalmának és apoptotikus folyamatainak vizsgálata alapján ugyanis nyilvánvalóvá vált, hogy az AA által kiváltott nPKC δ enzimaktiváció részt vesz a gyulladásos prekursor molekula mindkét fontos sejthatásának (a sebocyták lipidszintézisének fokozása és az apoptózis kiváltása) jelátviteli mechanizmusában, hiszen a δ izoforma expressziójának szelektív gátlása mellett szignifikáns mértékben csökkent mind az AA által kiváltott lipidtermelés, mind pedig a mediátor által indukált apoptózis mértéke. A cPKC α szelektív „gécscsendesítése” ugyanakkor nem befolyásolta ezeket a folyamatokat, az aPKC ζ csökkent expressziója pedig, a fentieknek megfelelően, már önmagában is jelentős bazális lipidszintézis-fokozódással, illetve kifejezett apoptózissal járt.

A Vav1 C1 doménje a megfelelő geometriájú ligandkötőhely birtokában sem köt forbol-észtert

A röntgenkristallográfiás vizsgálatok a PKC δ C1b doménjának és a Vav1 molekula C1 doménjának meglehetősen nagy szerkezeti homológiájáról számolnak be. Ezek alapján felmerült a kérdés, hogy vajon alkalmas lehet-e a Vav1 C1 kötőhelye a DAG/forbol-észter megkötésére (az ismert nagy ligandaffinitással bíró DAG-effektor proteinhez hasonlóan)? Molekulamodellzés segítségével rávilágítottunk, hogy a Vav1 C1 esetében a forbol-észter ligandok egyik jellegzetes képviselőjének, a forbol-13-acetátnak a ligandkötőhelyre történő optimális beilleszkedése után olyan receptor-ligand komplexet kapnánk, melynek molekulaszervezete (a komplexen belül kialakuló

intra-és intermolekuláris hidrogénkötések mintázatának hasonlósága következtében) szinte teljesen identikus a PKC δ C1b esetében észlelt struktúrával. Ezek alapján feltételezhető, hogy a Vav1 képes lehet DAG/forbol-észter ligandok megkötésére. A geometriai felépítés nyilvánvaló homológiája és a molekulamodelljeinkben tapasztalt ligandkötési sajátságok nagyfokú hasonlósága ellenére, a Vav1 affinitását vizsgáló korábbi kísérletek nem találtak a Vav1 ligandkötésére utaló közvetlen bizonyítékokat. A teljes nagyságú Vav1 molekula ligandaffinitását vizsgáló kísérletekhez hasonlóan, jelen vizsgálatunkban a Vav1 izolált C1 doménjánál sem észleltünk ligandkötést. A bakteriális expressziós rendszer segítségével létrehozott, tisztított Vav1 C1 proteinflagmentum (Vav1-C1-GST) nem mutatott *in vitro* affinitást a radioaktív forbol-észter ligand ([3 H]PDBu) iránt. Másrészt, GFP-jelölt fehérjeként, eukarióta sejtekben (LNCaP) kifejeztetve, az izolált Vav1 C1 (Vav1-C1-GFP) esetében nem detektáltunk intracelluláris transzlokációt forbol-észter (PMA) kezelés hatására (ellentétben a kontrollként alkalmazott izolált PKC δ C1b domén esetében tapasztaltakkal). Ezek alapján megállapíthattuk, hogy a ligandszenzitivitás hiányát okozó molekuláris determinánsok a Vav1 C1 doménján belül találhatóak, és az affinitás hiánya nem a környező domének esetleges struktúrális gátlásának (a kötőhely esetleges „leárnyékolásának”) következtében jön létre.

A Vav1 C1 csökkent affinitásáért felelős molekuláris faktorok feltérképezése összehasonlító szekvenenciaanalízis és PKC δ C1b mutánsok segítségével

A Vav1 C1 doménjének csökkent/hiányzó ligandaffinitásáért felelős molekuláris komponensek részletes feltérképezéséhez elsőként egy átfogó szekvenenciaanalízist végeztünk, amelynek során összehasonlítottuk a Vav1 atípusos (forbol-észtert nem kötő) C1 doménjét az irodalomban eddig leírt összes típusos (forbol-észter-szenzitív) jelátviteli molekula C1 doménjával. Elemzésünk során hat olyan nem-szokványos aminosavat (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹,

Arg²² Thr²⁴ és Tyr²⁶) azonosítottunk a ligandkötőhely közelében, amelyek jelenléte kizárólag a Vav1 C1 doménjére jellemző. Ezek az aminosavak a ligandkötőhely alapvető geometriai felépítésének megváltoztatása nélkül lehetnek képesek csökkenteni a Vav1 C1 ligandaffinitását; feltételezhető, hogy akadályozzák a receptor-ligand komplexnek a membrán lipidkettősrétegéhez történő stabil asszocióját, amely gátolja a ligandkötés szempontjából alapvető fontosságú hármas struktúra (receptor-ligand-membránlipid) létrejöttét és stabilizálódását. Ezen gátló hatás magyarázataként az említett hat aminosav közül öt (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Arg²² Thr²⁴) esetében a ligandkötőhely hidrofóbicitásának csökkentése merülhet fel a membránba illeszkedő "csúcsi" régió területén; a hatodik aminosav (Tyr²⁶) jelenléte pedig gyengítheti a ligandkötőhely "középső részén" elhelyezkedő, nagyrészt pozitívan töltött aminosavakból (Arg²⁶, Lys²⁶, His²⁶) álló régió ionos kötésekkel alapuló kapcsolatát a membrán negatívan töltött foszfolipid molekuláival; a korábbi molekulaszervezeti vizsgálatok alapján ez szintén fontos membránasszociáció-stabilizáló hatással bírhat. A hipotézisünk vizsgálatához első megközelítésben a rekombináns PKC δ C1b domént használtuk fel. Irányított mutagenézis segítségével Vav1 C1-szerű aminosavakra cseréltük a fent említett kulcspozíciókban eredetileg megtalálható molekulákat, majd a különböző egyszeres és többszörös mutánsok ligandaffinitását radioaktív ligandkötés (tisztított GST-fúziós C1 mutánsok), valamint intracelluláris transzlokációs vizsgálatok (GFP-jelölt C1 mutánsok; konfokális mikroszkópia) segítségével analizáltuk. Az egyszeres mutánsokkal (M9E, S10E, P11T, W22R, L24T, és K26Y) elvégzett kísérletek alapján megállapíthattuk, hogy a fent említett hat aminosav közül öt molekula (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Thr²⁴ és Tyr²⁶) jelenléte affinitáscsökkenést okozott a PKC δ C1b doménjánál (a Arg²² jelenléte nem váltott ki semmiféle változást), bár a ligandszenzitivitásban észlelt redukció mind az öt esetben szerény mértékű volt (5-10-szeres affinitáscsökkenés a vad típushoz képest, radioaktív ligandkötés-vizsgálat során). Megjegyzendő, hogy

egyik aminosav jelenléte sem okozott olyan struktúrális torzulást, amely a PKC δ C1b drasztikus affinitáscsökkenéséhez vezetett volna. Az öt Vav1-szerű mutáció különböző kombinációi ugyanakkor már jelentős affinitás-csökkenéshez vezettek. A ligandkötőhely N-terminális peptidhurkában létrehozott dupla- és tripla mutációk (M9E/S10E és M9E/S10E/P11T), valamint a C-terminális peptidhurokban létrehozott dupla mutációk (L24T/K26Y) ugyanis két-három nagyságrenddel (250-1000-szeres redukció) csökkentették a C1b domén [³H]PDBu iránti affinitását a ligandkötődés-vizsgálatok során.

A többszörös mutációval rendelkező PKC δ C1b konstruktok ligandaffinitását (LNCaP sejtekben kifejezett, GFP-jelölt változataik segítségével) transzlokációs vizsgálatokban is elemeztük. Ezen kísérletek alátámasztották a radioaktív assay-k fent említett eredményeit, hiszen a vad típussal összehasonlítva az előbb felsorolt dupla- és tripla mutánsok jelentősen csökkent transzlokációt mutattak forbol-észter kezelés hatására (kevésbé kifejezett, jelentősen lassabb kinetikájú, részleges transzlokációs válasz; kisebb ligandkoncentrációknál teljes válaszképtelenség). Mindezekon túl, az öt Vav1 C1-szerű mutáció együttes jelenléte (M9E/S10E/P11T/L24T/K26Y) olyan drasztikusan lecsökkentette a PKC δ C1b forbol-észter-affinitását, hogy sem radioaktív ligandkötődés, sem pedig transzlokációs vizsgálatok segítségével nem tudtunk forbol-észter-kötést detektálni. Ezek alapján tehát elmondható, hogy bár az öt fent említett, Vav1-specifikus aminosav közül önmagában egyik sem okoz jelentős struktúrális torzulást és kifejezett affinitáscsökkenést, együttes jelenlétük azonban már elegendő ahhoz, hogy (feltételezhetően a kötőhely csúcsi régiójában az effektív membránasszociáció folyamatával interferálva) a Vav1 molekula forbol-észterek iránti teljes válaszképtelenségét kiváltsa.

A PKC δ -C1b-szerű mutációk birtokában a Vav1 C1 forbol-észtert köt

Felmerült továbbá, hogy amennyiben a Vav1-C1-szerű aminosavak jelenléte drasztikusan lecsökkenti a nagy affinitású forbol-receptor, PKC δ C1b

ligandaffinitását, vajon, ennek analógiájára, a PKC δ C1b-szerű mutációk hatására képes lesz-e a Vav1 C1 nagy affinitással kötni forbol-észter ligandokat? A kérdés megválaszolásához a fent említett öt kulcspozícióban (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Thr²⁴ és Tyr²⁶) PKC δ -C1b-szerű mutációkat hoztunk létre a Vav1 C1 doménjében, majd az izolált C1 domént radioaktív ligandkötési (tisztított GST-fúziós Vav1 C1 mutánsok), illetve transzlokációs vizsgálatoknak (GFP-jelölt Vav1 C1 mutánsok; konfokális mikroszkópia) vetettük alá. Azt tapasztaltuk, hogy a korábban ligandszenzitivitást nem mutató Vav1 C1 az öt PKC δ -C1b-szerű aminosav birtokában nagy forbol-észter-affinitásra tett szert, hiszen *i*) a radioaktív assay tanúsága szerint az ötszörös Vav1 C1 mutáns (Vav1 C1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) disszociációs konstansa csaknem megegyezett a vad típusú PKC δ C1b disszociációs konstansával; valamint *ii*) a PMA hatására bekövetkező intracelluláris transzlokáció kinetikája is nagyon hasonlóan adódott (gyors, teljes transzlokációs válasz már alacsony ligandkoncentrációk mellett is). Ezek alapján tehát bebizonyosodott az a korábbi feltevésünk, hogy a Vav1 C1 ligandkötőzsebének geometriája tulajdonképpen alkalmasnak tűnik a ligandkötésre. Az általunk identifikált öt aminosav nem változtatja meg jelentősen a kötőhely háromdimenziós szerkezetét, ugyanakkor, nagy valószínűséggel, akadályozza a ligandkötőhely csúcsi részének a membránhoz történő kapcsolódását; így megycngíti a ligandaffinitás szempontjából fontos molekuláris interakciókat, amelyek a ligand–C1 domén–membrán hármas komplexének stabilizásáért felelősek.

További fontos megfigyelésünk volt az is, hogy ezen öt aminosav jelenléte a teljes nagyságú Vav1 molekulát is képessé teszi forbol-észter kötésre, hiszen az öt mutáció birtokában a teljes nagyságú Vav1 (Vav1 E9M/E10S/T11P/T24L/Y26K) is mutat intracelluláris transzlokációt PMA kezelés hatására (ellentétben a teljes nagyságú Vav1 vad típusú változatával). A C1 doménben elhelyezkedő kötőhely tehát hozzáférhető a megfelelő ligandok számára, és nincsen elzárva a Vav1 molekula egyéb doménjei által. Annak a

kérdésnek az eldöntéséhez, hogy vajon az általunk identifikált öt nem-szokványos aminosav közül valójában mindegyik közel azonos mértékben járul-e hozzá a ligandaffinitás csökkentéséhez (ahogy azt a PKC δ C1b mutánsokkal kapott eredményeink sugallták), a következőkben négyszeres Vav1 C1 mutánsok (-E9M, -E10S, -T11P -T24L -Y26K; a negatív előjel az ötszörös mutánshoz képest hiányzó mutációra utal) segítségével vizsgáltuk az egyes aminosavak egyedi hatását. (Ebben a kísérletben a különböző négyszeres mutánsok megfeleltethetők voltak a PKC δ C1b doménnal végzett kísérletek egyszeres mutánsainak, hiszen az ideális aminosavösszetételhez képest mindkét esetben egy aminosavval kevesebbet tartalmaztak.) Ellentétben a PKC δ C1b egyszeres mutánsaival kapott eredményekkel, a négyszeres Vav1 C1 mutánsokkal elvégzett vizsgálatok rámutattak, hogy a Glu⁹ és a Thr¹¹ aminosavak nagyobb mértékben befolyásolják a Vav C1 ligandaffinitását. Megállapítottuk ugyanis, hogy ha ezen pozíciókban Vav1-szerű aminosav található, akkor az adott négyszeres mutáns ligandaffinitása kifejezettebb mértékben csökken (mind a radioaktív ligandassay, mind pedig a transzlokációs vizsgálatok tanúsága szerint), mint a másik három Vav1-szerű aminosavat (Glu¹⁰, Thr²⁴ és Tyr²⁶) tartalmazó négyszeres Vav1 C1 mutánsé.

A „molekuláris lipofilicitás” korrelációja a forbol-észter szenzitivitással

A következőkben molekuláris modellek segítségével vizsgáltuk azon hipotézisünk helyességét, amely szerint az öt kulcspozícióban lévő aminosav (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Thr²⁴ és Tyr²⁶) ligandszenzitivitást csökkentő hatása abban nyilvánul meg, hogy együttesen jelentősen gátolják a kötőhely csúcsi részének a membránhoz történő stabil asszociációját, a két struktúra között kialakuló intermolekuláris kötések akadályozása révén. Mivel ezen kapcsolatok közül a hidrofób kölcsönhatások adják az egyik legfontosabb tényezőt, ezért az általunk létrehozott modellekben a kötőhely csúcsi részének lipofilicitását vizsgáltuk a különböző C1 domén mutánsok (PKC δ C1b és Vav1 C1) esetében. A szoftver

által alkalmazott egységes algoritmus segítségével megvizsgáltuk az összes létrehozott C1 domén mutánst, valamint a ligandkötőhelyek felszíni lipofilicitásának kvantitatív jellemzésére bevezettük a "molekuláris lipofilicitási potenciál" (MLP) mennyiségét. Bár az összefüggés nem minden esetben adódott lineárisnak, eredményeink alapján bebizonyosodott, hogy az MLP értékek egyértelmű összefüggést mutattak a molekulák ligandszenzitivitásával. A spektrum egyik végén azok a C1 domén kötőhelyek álltak, amelyek magas felszíni lipofilicitással rendelkeztek (pl. vad típusú PKC δ C1b, ötszörös Vav1 C1 mutáns), így nagy ligandszenzitivitást mutattak. A spektrum másik oldalán az alacsony MLP értékkel bíró molekulák álltak (pl. vad típusú Vav1 C1, ötszörös PKC δ C1b mutáns), amelyek esetében egyáltalán nem lehetett ligandkötést detektálni. A két véglet közötti széles tartományban átmeneti felszíni lipofilicitást, és ebből következően (változó mértékben) gyengült, de még kimutatható ligandaffinitást mutató C1 mutánsok álltak. Az eredmények alapján az is kiderült, hogy az említett öt Vav1-specifikus aminosav közül önmagában egyik sem okoz drasztikus lipofilicitás-változást; együttes jelenlétük ugyanakkor már jelentős mértékben lecsökkenti az adott C1 domén ligandkötőhelyének lipofilicitását, így a forbol-észter szenzitivitás szempontjából lényeges hidrofób kölcsönhatások erősségét és (ezen keresztül) a ligand-receptor komplex lipidkettősrétegbe való beágyazódásának lehetőségét.

A Vav1 C1 doménjének egyedi felépítésű kötőhelyét „célzó” DAG-származékok kifejllesztésének kezdeti lépései

A Vav1 molekula C1 doménját és a környező doméneket (DH, PH domén) együttesen ábrázoló struktúrális molekulamodelljeink alapján azt a következtetést vonhattuk le, hogy mivel a ligandkötőhelyet alkotó C-terminális peptidhurok nagyon közel helyezkedik el a DH domén $\alpha 6$ hélixéhez, megfelelő nagyságú ligandmolekula bekötődése esetén a két domén közötti szoros intramolekuláris kapcsolatok zavart szenvedhetnek. Mivel ezen interakciók

alapvető szerepet játszanak az enzimaktivitás szempontjából optimális DH domén-konformáció fenntartásában, ezért felmerül, hogy a kötőhelyre beilleszkedni képes ligand gátolhatná a Vav1 enzimaktivitását. Következő kísérletünkben arra kerestük a választ, hogy vajon lehetséges-e a Vav1 C1 doménjának különleges struktúrájú ligandkötőhelyét célzó, specifikus ligandok létrehozása, így szelektív enziminhibitorok kifejlesztése? Mivel a fenti eredmények alapján nyilvánvaló, hogy a 9-es és a 10-es pozíciókban helyet foglaló Glu molekulák jelentős mértékben hozzájárulnak a Vav1 C1 ligandaffinitásnak csökkentéséhez, ezért első megközelítésben olyan szintetikus DAG származékokat (DAG-laktonokat) teszteltünk, amelyek oldalláncaikon pozitív töltéseket hordoznak. Feltételezésünk szerint ezen pozitív töltések képesek lehetnek a Glu oldalláncok negatív töltéseinek „semlegesítésére”, így a kötőhely csúcsi részének lipofilicitását megnövelve a receptor-ligand komplex membránhoz történő kapcsolódása könnyebbé válna. Ezen kísérletek során olyan DAG-laktonokat vizsgáltunk, amelyek pozitívan töltött guanidínium (**6c** jelű vegyület) vagy piridínium (**8a-f** jelű vegyületek) oldalláncokkal rendelkeztek. Kompetitív ligandkötési kísérletek segítségével meghatároztuk a vegyületek relatív szelektivitását a Vav1 C1 speciális struktúrájú ligandkötőhelyéhez hasonló kötőzsebbel rendelkező két PKC δ C1b mutánsnal szemben (M9E/S10E és M9E/S10E/P11T). (A módszer ligandkompetíción alapuló természete miatt a vad típusú Vav1-et közvetlenül nem állt módunkban vizsgálni). A kísérlet során két olyan vegyületet sikerült azonosítanunk (**6c** és **8f** jelzésű DAG-laktonok), amelyeknél az affinitáscsökkenés a vad típusú PKC δ C1b felől a tripla mutáns (M9E/S10E/P11T) felé haladva jóval elmaradt a prototípusos forbol-észter [³H]PDBu esetében tapasztalttól. (A vad típusú PKC δ C1b doménjával szemben mért ligandaffinitáshoz viszonyítva a **6c** jelű vegyület 12-és 17-szeres, a **8f** jelű vegyület pedig 5-és 5,5-szörös affinitáscsökkenést mutatott a dupla és a tripla mutánsnal szemben; ezzel szemben a [³H]PDBu esetében 261-szeres, illetve 968-szoros csökkenéseket mértünk). Ez alapján

tehát elmondható, hogy a két vegyületnek a Vav1-specifikus aminosavakat tartalmazó C1-domén-struktúrával szembeni relatív affinitása jelentősen meghaladja a [³H]PDBu esetében tapasztalt mértéket. Molekulamodelljeink alapján az is jól látható volt, hogy a Vav1 C1 10-es pozíciójában helyet foglaló Glu molekula könnyen kialakíthat ionos kötéseket, mind a **8f** jelű DAG-lakton piridínium csoportjában helyet foglaló, mind pedig a **6c** jelzésű vegyület guadínium csoportjában elhelyezkedő, pozitívan töltött nitrogén molekulával. Ezek alapján tehát elmondható, hogy a megfelelő oldalláncokkal rendelkező DAG-lakton vegyületek képesek lehetnek ionos kötéseket kialakítani a C1 domén ligandkötőhelyén található, töltéssel rendelkező aminosav oldalláncokkal. Bár az általunk szintetizált és tesztelt DAG-laktonok a szelektív Vav1 C1 vegyületek kifejlesztésének csupán kezdeti erőfeszítéseit reprezentálják, úgy tűnik, hogy a 9-es és 10-es pozíciókban helyet foglaló, Vav1-specifikus Glu molekulák negatív töltéseivel kialakított elektrosztatikus interakciók kiaknázása a molekulatervezés fontos stratégiai elemét képezheti a jövőben.

DISZKUSSZIÓ

A másodlagos hírvivő DAG molekula jelátviteli útvonalának egyik legfontosabb effektora a PKC család. Az enzimes családba tartozó izoformák változatos módon képesek befolyásolni a különböző sejtfeleségek jelátviteli mechanizmusait, hiszen az egyes izoenzimek gyakran ellentétes módon befolyásolják a sejtek olyan alapvető folyamatait, mint a proliferáció, a differenciálódás és az apoptózis. Az izoforma-specifikus funkciók pontos feltérképezése ezért megkérdőjelezhetetlen fontossággal bír. Nagyszámú irodalmi adat bizonyítja a PKC rendszer központi szerepét a bőr biológiai funkcióinak szabályozásában is. A bőr keratinocytáit vizsgáló korábbi tanulmányok (köztük saját vizsgálataink is) kiemelik az egyes izoformák

funkcionális antagonizmusának jelentőségét a sejtek túlélését és differenciálódási programját meghatározó jelátviteli útvonalak szabályozásában (az α és a δ izoformák főként a terminális differenciálódást és az apoptotikus folyamatokat segítik elő, míg az ϵ és a β izoformák leginkább proliferációs szignálokat közvetítenek). Ezen kutatásokat tovább folytatva, jelen munkánk során a bőr egy újabb sejtfeleségében, a faggyúmirigy sebocytáiban sikerült részletesen jellemeznünk a PKC rendszer izoformáinak funkcionális szerepét, rámutatva az izoforma-antagonizmus fontosságára ezen sejtípus esetén is. A sebocyták jellegzetes izoenzimeként (magas expressziót mutató α , δ és ζ , illetve az alacsony szintű ϵ és η) több módszerrel (Western blot, PCR) történő azonosítása után, sikerült rávilágítanunk az α - és a δ -aktiváció fontosságára a terminális differenciálódást elősegítő folyamatokban, valamint az a ζ izoforma jelentőségére a sejtek életképességét elősegítő folyamatokban. Elsőként kimutattuk, hogy a PKC rendszer forbol-észterrel történő aktivációja fokozza a sebocyták lipidtermelését. Ezután farmakológiai módszerek, valamint különböző sejt- és molekuláris biológiai technikák segítségével rávilágítottunk, hogy a forbol-észter stimuláció celluláris hatásának jelátvitelében az α és a δ izoformák vesznek részt. Mivel a lipidszintézis fokozódása a holokrin szekréció során bekövetkező terminális differenciálódás egyik kulcsfontosságú tényezője, ezért megfigyeléseink összhangban vannak azon korábbi tanulmányokkal, amelyek a bőr különböző sejtfeleségeinek esetében kiemelik az α és a δ izoformák központi jelentőségét a differenciálódást elősegítő mechanizmusokban.

Bár kísérleteink alapján az α és a δ izoforma endogén aktivitásánem játszik meghatározó szerepet sem a differenciálódást, sem pedig a sejtproliferációt befolyásoló jelátviteli útvonalakban (hiszen az endogén aktivitás gátlása farmakológiai módszerek, illetve RNS interferencia segítségével nem változtatta meg sem a sejtek lipidszintézisét, sem az élő sejtszámot), ezen PKC izoformák funkcionális szerepe felmerülhet számos endokrin és parakrin mediátor jelátviteli útvonalában. Az androgének, a PPAR ligandok és egyes

(neuro)endokrin mediátorok (CRH, ACTH, GH, inzulin) mellett jónéhány parakrin ágenstől (IGF, FGF) is bebizonyosodott, hogy, a PMA-hoz hasonlóan, képesek fokozni a sebocyták lipidszintézisét. A lipidmediátorok közül az endocannabinoidokról korábban már bebizonyítottuk, hogy a sebocyták által expresszált specifikus cannabinoid receptor CB2 aktiválásán keresztül képesek befolyásolni a sebocyták lipidszintézisét és apoptotikus folyamatait. Kémiai szerkezetét tekintve az endocannabinoidokkal rokon vegyület (az ugyancsak parakrin lipidmediátor) arachidonsav (AA), amelyről több munkacsoport kísérletei is kimutatták, hogy képes fokozni a PKC enzimek aktivitását mind sejtmentes rendszerekben, mind pedig intakt sejtek esetében (valószínűleg közvetlenül a PKC molekulák C1 doménjához kötődve). A foszfolipáz A₂ aktivációjának hatására a membrán foszfolipidjeiből felszabaduló gyulladáso prekursor AA-ról emelett számos tanulmány bizonyította, hogy képes a sebocyták lipidszintézisének fokozására, a sejt differenciálódás elősegítésére és az apoptotikus folyamatok indukálására. Az AA-ról az is kiderült, hogy sebocytákban is képes különböző, ciklooxygenáz és a lipoxigenáz útvonalon termelődő eikozanoid mediátor (LTB₄, PGE₂) és pro-inflammatórikus citokin (IL-6, IL-8) termelését kiváltani. Ezek alapján érthető, hogy az AA (és származékai) által beindított jelátviteli útvonalak központi jelentőséggel bírnak az olyan megváltozott sebocyta-funkciókkal összefüggésbe hozható kórállapotokban (pl. seborrhea, acne, stb.), amelyekben patogenetikai faktorként a megnövekedett lipidszintézis, a fokozott sejt-turnover, valamint a sebocyták által termelt gyulladáso mediátorok megemelkedett szintje egyaránt közrejátszik. Kísérleteink alapján bebizonyosodott, hogy a három legmarkánsabb expressziót mutató izoforma közül a δ izoenzim kulcsfontosságú szerepet játszik sebocytákban az AA celluláris jelátviteli útvonalában. Ugyanis, szemben a másik két izoformával, kizárólag a δ izoforma esetében találtunk bizonyítékot az AA által történő enzimaktivációra (transzlokáció és down-reguláció), illetve kizárólag ezen izoforma expressziójának csökkentése (RNS

interferencia) volt képes (részlegesen) kivédeni az AA által indukált lipidszintézis-fokozódást és az apoptózist. Az α és a δ izoformák funkcionális szerepének tisztázásán túl vizsgálataink fényt derítettek a ζ izoenzim szerepére is, amely a másik két izoformával ellentétben feltételezhetően gátolja a sejtek lipidszintézisét és apoptótikus folyamatait, ezáltal elősegítheti a sejtek túlélését és a (fiziológiás) sejtproliferációt; ennek fontos szerepe lehet a holokrin szekréció során folyamatosan pusztuló sejttömeg utánpótlásában. Munkánk eredményeként, az izoforma-specifikus jelátviteli szerepek részletes megismerése által, egy újabb sejtjelzés esetében válhat lehetővé a terápiás szempontból lényeges sejtfunkciók PKC rendszeren keresztüli farmakológiai befolyásolása.

A megváltozott sebocytá sejtfunkcióknak (faggyúmirigy-hyperplasia, sebumtúltermelés, hyperproliferáció) számos bőrbetegség (seborrhoea, acne, rosacea, rhynophyma, sebaceous carcinoma) etiológiájában van központi jelentősége. Ezen kórképek közül messze a leggyakoribb a komplex patogenezisű *acne*, amelynél a legújabb kutatások a faggyúmirigy fokozott sebumtermelését és a gyulladáshoz vezető folyamatok egyensúlyának megbomlását emelik ki központi patogenetikai tényezőként (a sebocyták a gyulladáshoz vezető folyamatok szempontjából is jelentősek, hiszen számos gyulladáshoz vezető mediátor termelésével járulnak hozzá a kóros inflammatorikus reakciók kialakulásához és fenntartásához). A korábbi kutatások alapján nyilvánvalóvá vált, hogy az AA központi patogenetikai szerepet játszik a sebocyták megnövekedett lipidszintézisében és a gyulladáshoz vezető mediátorok felszabadításának kiváltásában. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy az nPKC δ szerepet játszik ezen kulcsfontosságú mediátor jelátviteli útvonalában, míg az cPKC α részt vehet egyéb lipidszintézis fokozó jelátviteli útvonalakban. Ezzel ellentétben az aPKC ζ hatékonyan fékezheti a terminális differenciálódás irányába mutató folyamatokat. Az „acne-ellenes” terápia szempontjából tehát felmerülhet a δ - (ill. α) aktivitás szelektív gátlásának hasznossága, hiszen ezáltal visszaszorítható

a fokozott sebumtermelést. Az antagonisztikus funkcióval rendelkező aPKC ζ aktivitásának fokozásával (pl. ζ agonisták segítségével) ugyanakkor szintén lehetséges ugyanezen terápiás eredmény elérésére. Ezzel ellentétben, a sebocytákból kiinduló tumoros túlbujánzások esetében az aPKC ζ aktivitás gátlása és/vagy a cPKC δ/α funkció aktiválása lehet célravezető, hiszen mindkét megközelítés alkalmas lehet a terminális differenciálódás irányába terelni a fokozott proliferációs aktivitást mutató sejtpopulációt, visszaszorítva ezáltal tumoros növekedésüket.

A PKC funkció befolyásolására irányuló stratégiák közül az alábbiak a legismertebbek: *i*) a katalitikus domén gátlása kináz inhibitorokkal (pl. staurosporin); *ii*) az enzimaktivitás modulálása a C1 doménon keresztül (pl. forbol-észterek); és *iii*) a PKC expresszió gátlása antisense oligonukleotidokkal (pl. aprinocarsen). Az első és a harmadik módszerrel tehát az enzimaktivitás csökkenését érhetjük el, míg a második megközelítés aktiválja az enzimfunkciót. A PKC rendszer izoforma-antagonizmusának ismeretében azonban nyilvánvaló, hogy a két látszólag ellentétes irányzat tulajdonképpen azonos célkitűzéseket is szolgálhat a megfelelő izoformák módosításán keresztül (pl. a proliferációt serkentő izoformák gátlása ekvivalens lehet a proapoptotikus izoenzimek aktiválásával). A PKC izoenzimek aktivitásának C1 doménon keresztüli szelektív befolyásolását jelentősen megnehezíti az egyéb C1 doménnal rendelkező szignál-proteinek jelenléte. Bár kezdetben kizárólag a PKC család tagjainak tulajdonítottak DAG-effektor funkciót, az utóbbi évek kutatásai alapján hat másik molekulacsalád tagjairól (pl. RasGRP, PKD, DAG kináz) bizonyosodott be, hogy rendelkeznek DAG/forbol-szenzitív, típusos C1 doménnal. Az egyes izoformákhoz specifikusan kapcsolódó, szelektív C1 ligandok kifejlesztése ezért nagy kihívás elé állítja a kutatókat; a ligandszenzitív C1 doménnal rendelkező proteinek számának növekedése ugyanakkor olyan új potenciális célmolekulákra irányítja rá a figyelmet, amelyek (a PKC-hoz

hasonlóan) központi jelentőségű sejtfunciókat (sejtproliferáció, differenciálódás, apoptózis ingerületátvitel) szabályoznak.

A szelektív C1 ligandok kifejlesztésére irányuló kutatások alapvetően két megközelítés mentén haladnak. Az egyik megközelítés a ligandok affinitását és szelektivitását meghatározó struktúrális determinánsokat (pl. oldalláncok nagysága, elhelyezkedése, kémiai szerkezete, stb.) vizsgálja. Ehhez értékes segítséget nyújtanak azok a könnyen előállítható, nagy affinitású, szintetikus DAG származékok (DAG laktonok), amelyek esetében az alapgyűrűhöz kapcsolódó oldalláncok kombinálása (és ezáltal a különböző kémia szerkezetű funkciós csoportok ligandaffinitásra gyakorolt hatásának vizsgálata) könnyen kivitelezhető. A másik megközelítés a nagyfokban konzerválódott C1 domének affinitását meghatározó molekuláris determinánsok részletes feltérképezésére irányul. Ezirányú kutatásaink fókuszában az utóbbi években az atípusos (DAG-ra/forbol-észterre nem szenzitív) C1 doménnel rendelkező jelátviteli fehérjék azon alcsoportja áll, amelyeknél a ligandkötőhely geometriája nem mutat egyértelmű struktúrális torzulást (ellentétben pl. a c-raf atípusos C1 doménjével), ezért látszólag alkalmasak lehetnek ligandkötésre (pl. aPKC ζ és ι ; RasGRP2; Vav 1, 2, 3). A ligandaffinitás csökkenéséért felelős faktorok pontos ismerete nagyban elősegítheti a szelektív C1-ligandok kifejlesztésén fáradozó vegyészek munkáját. Ezen ismeretek birtokában ugyanis lehetőség nyílt a szintetikus C1-ligandok kémiai struktúrájának célzott módosítására, így *i*) nagyfokban homológ C1-szerkezetek közötti kis szerkezeti eltérések kiaknázására; és *ii*) a konvencionális ligandokra érzéketlen atípusos C1 domének kötőhelyének befolyásolására új DAG/forbol-észter származékokkal.

Kutatássorozatunk keretein belül, jelen munkánkban a guanin kicserélő aktivitással bíró Vav molekulacsalád 1-es izoformájának ligandaffinitását karakterizáltuk. Kísérleteink alapján sikerült rávilágítanunk a ligandkötés hiányának hátterében álló molekuláris mechanizmusokra. A ligandkötőhely felső harmadában négy olyan aminosavat (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Thr²⁴)

azonosítottunk, amelyek a csúcsi felszín hidrofóbicitásának csökkentésén keresztül gátolják a receptor-ligand komplex membránhoz történő kötődését. Ezenfelül egy olyan aminosavat is azonosítottunk (Tyr²⁶), amelynek jelenléte (a kötőhely középső harmadában) gyengíti a C1 domén és a membrán foszfolipid molekulái között kialakuló ionos kötések, így szintén akadályozza a stabil membránasszociációt. Mivel a C1 domén tulajdonképpen a lipiddkettősréteggel együttesen alkotja a ligand stabil kötésére alkalmas, nagy affinitású receptorstruktúrát, ezért könnyen belátható, hogy a C1 domén–ligand–membrán hármas komplex kialakulását gátló bármely szerkezeti tényező jelenléte lecsökkenti a domén ligandaffinitását. A Vav1 molekulához hasonlóan, a Vav család másik két tagjának (Vav2 és 3) és a RasGRP család 2-es izoformájának esetében is sikerült részben azonosítani azokat az aminosavakat, amelyek a ligandaffinitás drasztikus csökkenéséért felelősek. Bár ezen fehérjék esetében az affinitáscsökkentő hatás pontos mechanizmusának megértése még további vizsgálatokat igényel, az eddigi eredmények alapján úgy tűnik, hogy ezen molekulák (a Vav1, az aPKC ζ és az aPKC ι enzimekkel együtt) egy új alcsaládba sorolandók. Ezen család tagjai ugyanis elkülönülnek a többi, atípusos C1-gyel rendelkező molekulától (c-Raf, KSR) abban a tekintetben, hogy ligandkötőhelyük nem mutat durva struktúrális torzulást, és a megfelelő körülmények között alkalmas lehet módosított DAG/forbol ligandok befogadására. Ezen alcsalád (egyre szaporodó) tagjainak további vizsgálata számos értékes információt nyújthat a ligand-receptor interakciókat meghatározó tényezőkről, így jelentősen hozzájárulhat C1 doménnel rendelkező jelátviteli molekulák farmakológiai befolyásolásának eredményességéhez. Atípusos, de kompatibilis szerkezetű C1 doménjeik birtokában emellett bővítik azon molekuláris célpontok csoportját, amelyek enzimátikus funkcióját a C1 doménhez kapcsolódó, DAG/forbol-észter származékok segítségével farmakológiailag befolyásolhatjuk. Az utóbbi megállapítás különösen abban az

esetben merül fel, amennyiben bebizonyosodik, hogy ezen fehérjék C1 doménje fontos szerepet játszik az enzimfunkció szabályozásában.

Korábbi tanulmányok alapján nyilvánvaló volt, hogy a Vav1 C1 doménje meghatározó jelentőségű az enzimaktivitás tekintetében. A legújabb röntgenkrisztallográfiás vizsgálatok arra is rámutattak, hogy az enzimaktivásért felelős DH domén és a C1 domén között kialakuló szoros intramolekuláris kapcsolatok alapvető fontosságúak az enzimaktivitás szempontjából optimális DH domén konformáció stabilizálásában. Mivel ezen intramolekuláris kötések kialakításában számos olyan aminosav (Leu²⁰, Arg²², Phe²⁵) vesz részt, amely a ligandkötőhely közvetlen közelében foglal helyet, belátható, hogy az említett aminosavak közreműködésével létrejött DH-C1 kapcsolatok könnyen felbomolhatnak a megfelelő ligand megkötésének hatására fellépő esetleges C1 konformációváltozás következtében. Emiatt a DH domén optimális konformációját stabilizáló kapcsolatok zavart szenvedhetnek, ami végső soron az enzimaktivitás csökkenéséhez vezethet. (A forbol-acetát ligand megkötését szimuláló molekulamodellünk szerint például a bekötődés csak abban az esetben lenne lehetséges, amennyiben a DH domén megfelelő peptidszakaszai eredeti pozíciójukból elmozdulnának, vagyis megváltozna a domén konformációja). Mindezek alapján tehát úgy tűnik, hogy amennyiben sikerülne a Vav1 C1 doménjához stabilan kötődő ligandokat kifejleszteni, úgy joggal várhatnánk azt, hogy ezek a ligandok a DH-C1 kötések megzavarása révén lecsökkentik az enzimaktivitást, így a Vav1 enzim inhibitoraként funkcionáljanak.

Ezirányú törekvéseink első lépéseként olyan szintetikus DAG analóg vegyületeket teszteltünk, amelyeknél a DAG laktin alapvázhoz pozitívan töltött funkciós csoportokat kapcsolunk. Elképzelésünk szerint a pozitív oldalláncok hatékonyan semlegesíthetik a Vav1 C1 doménjának 9-es és 10-es pozícióiban helyet foglaló Glu molekulák negatív töltéseit, így elősegíthetik a receptor-ligand komplex beágyazódását a hidrofób membránba. A kísérletek során két olyan DAG laktont (**6c** és **8f**) sikerült azonosítanunk, amelyek a prototípusos

forbol-észter PDBU-val összehasonlítva jelentősen emelkedett relatív szelektivitást mutattak a Vav1-szerű aminosavakat tartalmazó C1 domén struktúrával szemben (amelyet jelen esetben a PKC δ C1b dupla és tripla mutánsai képviseltek). Molekuláris modelleink tanúsága szerint ezek a DAG származékok valóban képesek lehetnek ionos kötések kialakítására a Vav1 C1 doménjában található negatívan töltött Glu aminosavakkal, melynek eredményeképpen hatékonyan semlegesíthetik azok negatív töltéseit, elősegítve a membránasszociációt. Fontos azonban hangsúlyoznunk, hogy ezen vegyületek egyelőre csupán a kezdeti lépését jelentik a szelektív Vav1 C1 ligandumok kifejlését célzó farmakológiai vizsgálatoknak.

Az irodalmi adatok alapján nyilvánvaló, hogy a Vav1 funkció farmakológiai modulálása számos területen járhat jelentős terápiás haszonnal. A molekula egyik legfontosabb funkciója a T-sejtek érésének és aktivációjának szabályozása. Ezenfelül a Vav1 részt vesz a B-sejt-funkciók szabályozásában, a Natural Killer sejtek citotoxikus funkciójának jelátvitelében és a makrofágok migrációjának és fagocitotikus aktivitásának regulációjában. Ezek alapján joggal merülhet fel a Vav1-funkciót gátló farmakonok potenciális szerepe az immunszuppresszív terápiában, amely a transzplantációs medicina egyik alappillére. Emellett a Vav1-et összefüggésbe hozták bizonyos humán tumorok patogenezisével is. A Vav1 aberráns expressziója számos malignus folyamatban volt kimutatható (pl. melanoma, pancreas carcinoma); ezen tények alapján szerepe lehet a tumorigenezisben és a tumorprogresszióban. A citoskeletális struktúra átépülésének befolyásolásán keresztül (a Rho/Rac1 fehérjék aktiválása által) pedig hozzájárulhat a neoplasztikusan transzformált sejtek invazivitásának és metasztatikus potenciáljának fokozásához. Ezek alapján tehát feltételezhető, hogy a Vav1 fontos célpontja lehet a daganatellenes próbálkozásoknak is. A legújabb kutatások alapján a Vav1 és a Vav3 izoformák szerepe emellett a trombocita-funkciók szabályozásában is előtérbe került. Számos trombocita-aktivációt indukáló mediátorról (pl. trombin, trombopoetin, kollagén, stb.)

mutatták ki, hogy jelátviteli útvonalában a Vav1/Vav3 aktiváció fontos szereppel bír. A legfrisebb kutatások pedig összefüggést találtak vérlemezkékben a Vav1/Vav3 működés és a hiperlipidémia hatására fennálló protrombotikus állapot között. A hiperlipidémiás állapotokban a vérben keringő oxidált LDL molekulák képesek a CD36 receptorhoz kötődve aktiválni a trombocitákat, mely jelátviteli útvonal egyik fontos tényezőjeként azonosították a Vav1/Vav3 aktivációt. Mivel a hiperlipidémia és a következményes atherosclerosis központi jelentőségű a kardiovaszkuláris kórképek patogenezisében, ezért ezen kórállapotokban a protrombotikus faktorok ellensúlyozása alapvető terápiás jelentőséggel bírhat, és elősegítheti a medicina küzdelmét a fejlett világ legnagyobb mortalitással és morbiditással járó betegségei, a szív- és érrendszeri kórképek, ellen.

ÖSSZEFOGLALÁS

A Disszertáció első részében az egyik legfontosabb diacil-glicerol (DAG) effektor család, a protein kináz C (PKC) tagjainak izoforma-specifikus szerepét elemeztük a faggyúmirigy biológiai folyamatainak szabályozásában. A PKC rendszer forbol-észter (PMA) általi aktivációja fokozta a humán sebocyták lipidszintézisét, amely a sejtek terminális differenciálódásának indikátora. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a sebocytákban expresszálandó öt PKC izoforma (cPKC α , nPKC δ , ϵ , η és aPKC ζ) közül a PMA hatásának közvetítésében az α és δ vesz részt. További fontos megfigyelésünk volt, hogy az nPKC δ részt vesz a gyulladáshoz vezető prekursor arachidonsav lipidszintézist fokozó és apoptózist indukáló celluláris hatásainak jelátvitelében is. Az aPKC ζ -ről pedig bebizonyosodott, hogy konstitutív enzimaktivitásával visszaszorítja a terminális differenciálódás (lipidfelhalmozás) és az apoptózis sejtfolymatait. A Disszertáció második részében a Vav1 molekula ligandkötési sajátosságait elemeztük. A DAG-felismerésért felelős C1 domén a Vav1-ben is megtalálható, és központi szereppel bír a guanin nukleotid cserelő aktivitás szabályozásában. A forbol-észter-kötés hiánya miatt ugyanakkor az atípusos C1 domének közé sorolják, habár a domén ligandkötőhelyének geometriai felépítése homológ a PKC enzimek típusos (nagy forbol-affinitású) C1 doménjével. Irányított mutagenézis segítségével sikerült azonosítanunk öt aminosavat (Glu⁹, Glu¹⁰, Thr¹¹, Thr²⁴ és Tyr²⁶) a kötőzseb peremén, amelyek kumulatív módon csökkentik a ligandaffinitást. Molekulamodelljeink emellett rámutattak, hogy ezen inkompatibilis aminosavak lecsökkentik a kötőhely csúcsának hidrofóbicitását, miáltal a kötőhely membránasszociációja zavart szenved és gátlódik a ligand-C1-domén-membrán hármas komplexének kialakulása. Végezetül olyan DAG-analóg molekulák (DAG-laktonok) kifejlesztését kezdtük el, amelyek a Vav1 C1-specifikus aminosavak megcélzásán keresztül szelektíven befolyásolhatják az enzimátikus funkciót.

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

Jelölt: Géczy Tamás

Neptun kód: F1YUJW

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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



További Közlemények

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



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

Összesített impakt faktor: 38.701

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

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

Debrecen, 2013.02.07.

