

ÖSSZEFOGLALÁS

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

SUMMARY

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

TÁRGYSZAVAK

Protein kináz C

Vav

C1 domén

Diacil-glicerol

Forbol-észter

Guanin nukleotid kicserélő faktor

Faggyúmirigy

Sebocyta

Lipidszintézis

Bőr

Keywords:

Protein kinase C

Vav

C1 domain

Diacylglycerol

Phorbol ester

Guanine nucleotide exchange factor

Sebaceous gland

Sebocyte

Lipid synthesis

Skin