

# ZÁRÓJELENTÉS – OTKA 49231

## „Az intracelluláris jelátvitel szerepe a proliferáció és differenciálódás szabályozásában”

Kísérleteinkben az egyik központi intracelluláris jelátviteli molekulacsalád, a protein kináz C (PKC) rendszer izoenzimjeinek a sejtnövekedés, valamint a kapcsolódó biológiai folyamatok szabályozásában betöltött szerepét vizsgáltuk.

### 1. A PKC izoenzimek szerepe harántcsíkolt izomsejtek *in vitro* és *in vivo* növekedésének szabályozásában

A jelen kísérleteket megelőző munkánk során C2C12 egér myoblast sejtvonalban számos PKC izoforma rekombináns stabil overexpresszióját valósítottuk meg. Ezen sejtek folyamatait vizsgálva kimutattuk, hogy a különféle PKC izoenzimek overexpressziója eltérő módon változtatta meg a sejtek *in vitro* proliferációját és differenciálódását, valamint az *in vivo* tumorgenezis folyamatát. Megállapítottuk, hogy a „kalcium-függő” cPKC $\alpha$  és  $\beta$  izoenzimek overexpressziója jelentősen lecsökkentette a C2C12 myoblastok *in vitro* proliferációját, valamint növelte a differenciálódási marker dezmin expresszióját. Bebizonyosodott továbbá, hogy ezen izoformákat overexpresszáló sejtek immunhiányos (SCID) egerekben a kontroll sejtek által kiváltott daganatokhoz képest nagyon hasonló szövettani jelegzetességekkel bíró, jóindulatú, ugyanakkor kisebb méretű tumorokat indukáltak.

Ezzel ellentétben a nPKC $\delta$  overexpressziója drámaian fokozta a sejtek *in vitro* proliferációját, valamint lecsökkentette a dezmin expresszióját. RNS-interferencia (siRNA) technika alkalmazásával kimutattuk emellett, hogy a nPKC $\delta$  siRNA-mediált down-regulációja teljes mértékben felfüggesztette a sejtek proliferációját. Fontos eredménynek adódott továbbá, hogy az ezen izoformát kifejező sejtek extrém nagy méretű, gyakran kifeléyesedő és vérző, valamint (számos esetben) a kísérleti állat jelentős súlyvesztését és halálát eredményező tumorok kifejlődését eredményezték. Szövettanilag ezen daganatok igen magas sejtosztódási rátával, a rhabdoid differenciálódás teljes hiányával, valamint infiltratív (azaz malignus) növekedési tulajdonságokkal voltak jellemezhetőek, mely a kísérleti állat subcutan szöveteinek

feldarabolódásához és roncsolódásához vezetett. Mindezek alapján a nPKC $\delta$  overexpresszor C2C12 myoblastok által indukált tumorok malignus rhabdomyosarcomáknak voltak diagnosztizálhatók. Érdekes megfigyelésünk volt végezetül, hogy a C2C12 sejtekben endogén módon ki nem fejeződő nPKC $\epsilon$  overexpressziója nem volt hatással a vizsgált folyamatokra.

Mindezen adataink azt sugallták, hogy a cPKC $\alpha$  és  $\beta$  izoformák a sejtek proliferációjának (kismértékű) gátlásában vehetnek részt, míg a nPKC $\delta$  központi szerepet játszhat a C2C12 vázizomsejtek *in vitro* és *in vivo* proliferációjának, valamint malignus transzformációjának serkentésében és kialakításában. Mindezen hipotézist tovább vizsgálva humán malignus rhabdomyosarcomából származó mintákon (valamint egészséges szöveten) elemeztük a PKC izoformák gén- (kvantitatív „real-time” Q-PCR) és fehérje (Western blot) szintű kifejeződését. Megállapítottuk, hogy a nPKC $\delta$  expressziója a legtöbb mintában szignifikánsan nőtt, míg a cPKC $\alpha$  szintje jelentősen csökkent. Ezen adatok jó egyezést mutattak a C2C12 sejteken mért fenti eredményekkel.

Végezetül vizsgáltuk a nPKC $\delta$  overexpresszor C2C12 sejtek által a SCID egerekben indukált tumorok farmakológiai érzékenységét is. Kimutattuk, hogy a nPKC $\delta$  szelektív gátlószere, a Rottlerin, valamint a nPKC $\delta$  szelektív down-regulációját kiváltó (így az enzim aktivitását jelentősen csökkentő) Bryostatín-1 jelentősen és dózis-függően lecsökkentette az agresszív tumorok növekedését és méretét.

## **2. A PKC izoenzimek szerepe harántcsíkolt izomsejtek transzmembrán szignalizációjának szabályozásában**

Párhuzamos kísérleteinkben primer humán vázizomsejteken és C2C12 myoblastokon vizsgáltuk a PKC izoenzimek szerepét a transzmembrán szignalizáció szabályozásában. Megállapítottuk, hogy a „hiperproliferatív” nPKC $\delta$  izoforma meghatározó szereppel bír bizonyos sejtfelszíni receptorokhoz kapcsolt celluláris válaszok kifejlődésében is. Humán vázizomsejteken kimutattuk ugyanis, hogy az inzulin-szerű növekedési faktor-I (IGF-I) fokozta a sejtek proliferációját és differenciálódását, mely hatás kizárólag a nPKC $\delta$  specifikus aktivitásához volt rendelhető. C2C12 myoblastokon megállapítottuk emellett, hogy az IGF-I mitogén (azaz sejtproliferációt, fúziót és differenciálódást fokozó) hatásának kifejlődéséhez a

nPKC $\delta$  izoforma, valamint a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) rendszer nPKC $\delta$ -függő aktiválódása szükséges.

C2C12 sejtekben emellett vizsgáltuk a PKC izoenzimek szerepét a purinoreceptor-mediált szignalizációban is. Megállapítottuk, hogy a megnövekedett differenciálódással jellemezhető cPKC $\alpha$  overexpresszor sejtekben (a kontroll sejtekhez viszonyítva) igen jelentősen fokozódott az extracelluláris ATP hatására kialakuló intracelluláris kalciumkoncentráció-emelkedés. Kimutattuk ugyanakkor azt is, hogy ezen változás mind mértékét, mind kinetikai paramétereit tekintve különbözött a tenyésztés-indukálta differenciálódási folyamat sokán mért kalciumjelek értékeitől. Megállapítottuk emellett, hogy a cPKC $\alpha$  overexpresszió jelentősen megváltoztatta a sejtek purinoreceptor mintázatát, mely ismételtén különbözött a tenyésztés során kialakuló differenciálódáskor mértéktől. Mindezen adataink a cPKC $\alpha$  differenciálódási állapot-függő szerepét valószínűsítették a purinerg jelátvitel szabályozásában.

### **3. A PKC izoenzimek szerepe a humán bőr függelékeiből származó sejtek biológiai folyamatainak szabályozásában**

Kísérleteink során először humán bőr függelékeiből származó sejtenyészeten jellemeztük a PKC rendszer tagjait. Humán izolált szőrtüsző-eredetű primer külső gyökérhüvely (ORS) keratinocytákon Western blot, immuncitokémia, valamint Q-PCR technikák alkalmazásával megállapítottuk, hogy a sejtek kifejezik a cPKC $\alpha$  és  $\beta$ ; a nPKC $\delta$ ,  $\epsilon$  és  $\eta$ ; valamint az „atípusos” aPKC $\zeta$  izoformákat. Egyik módszer alkalmazásával sem sikerült ugyanakkor a nPKC $\theta$ ; az aPKC $\mu$ ; valamint a PKC $\mu$  jelenlétét igazolnunk.

Hasonló megközelítést alkalmazva humán SZ95 sebocyta sejtvonalon (mely a humán faggyúmirigyből származó primer sebocyták egyik legkiválóbb modelljének tekinthető) kimutattuk, hogy a sejtekben a cPKC $\alpha$  és  $\beta$ ; az nPKC $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  és  $\eta$ ; az aPKC $\zeta$ ; valamint a PKC $\mu$  fejeződik ki. Kvantitatív denzitometriás Western blot analízissel, valamint Q-PCR technikával megállapítottuk továbbá, hogy a sejtek tenyésztésével párhuzamosan (azaz a proliferáció és differenciálódás előrehaladtával) a különféle izoenzimek szintje jelentős mértékben, de egymástól eltérő módon változik: azaz a cPKC $\alpha$  szintje kis mértékben (kb. 20%) és

egyenletesen, míg a cPKC $\beta$ , nPKC $\epsilon$ ,  $\theta$  és  $\eta$  szintje kevésbé egyenletesen, de jelentősebb mértékben emelkedett (rendre kb. 40%, 60%, 80%, 40%); a nPKC $\delta$  expressziós szintje nem mutatott változást; az aPKC $\zeta$  szintje jelentősen csökkent (40%).

A PKC enzimek funkcionális szerepét tisztázandó az SZ95 sejteket farmakológiai vizsgálatoknak vetettük alá, az általános PKC aktivátor PMA (forbol-12-mirisztát-13-acetát), az általános PKC inhibitor GF109203X, a cPKC izoforma gátlószer Gö6976, valamint a nPKC $\delta$  gátlószere, a Rottlerin jelenlétében. Megállapítottuk, hogy a PMA fokozta a sejtek differenciálódásának markereként értelmezhető lipidszintézist, míg a PKC gátlószerek önmagukban nem befolyásolták azt. Kimutattuk ugyanakkor, hogy a Rottlerin és a GF109203X szignifikánsan csökkentette a SZ95 sebocytákban a lipidszintézist jelentősen fokozó arachidonsav (AA) hatását, míg a Gö6976 semmilyen hatással nem volt a folyamatra.

Ezen eredményeink alapján feltételezhető volt, hogy a PKC rendszer endogén aktivitása nem vesz részt a sebocyták lipidtermelésének szabályozásában. Úgy tűnt ugyanakkor, hogy egyes PKC izoenzimek (pl. nPKC $\delta$ ) funkcionális szereppel bírhatnak az AA lipidszintézist fokozó celluláris hatásának kifejlődésében. Ezen utóbbi hipotézis tovább elemezve siRNA technikával kimutattuk, hogy a cPKC $\alpha$  és  $\beta$ , valamint a nPKC $\epsilon$  siRNA-mediált „lecsendesítése” nem volt hatással sem a sejtek bazális, sem az AA-indukált lipidtermelésére. Megállapítottuk ugyanakkor, hogy (jó összhangban a fenti farmakológiai kísérletek eredményeivel) nPKC $\delta$ -specifikus siRNA próba alkalmazása jelentős mértékben kivédte az AA zsírszintézist fokozó hatását (ugyanakkor nem befolyásolta a bazális lipidtermelést), mely tovább erősített ezen izoforma meghatározó szerepét a fenti folyamatban.

Vizsgálni kívántuk emellett a PKC rendszer esetleges szerepét az SZ95 sejtek *in vivo* növekedésének szabályozásában is. Ezen kísérletek során először kontroll SZ95 sebocyták intradermális injektálásával kíséreltünk meg daganatokat létrehozni SCID egerekben. Érdekes módon a sejtek csak minimális (1-5 mm), teljes mértékben aspecifikus hisztológiai paraméterekkel jellemezhető „teriméket” hoztak létre; így a tumorgenezis vizsgálatára (ez esetben) sajnálatos módon nem nyílt módunk.

#### **4. A PKC izoenzimek szerepe a humán epidermális keratinocyták sejt felszíni markereinek, valamint transzmembrán szignalizációjának szabályozásában**

A PKC rendszer izoformáinak vizsgálatát tovább folytattuk humán epidermális keratinocytákon is, ezúttal a különféle sejt felszíni molekulák kifejeződésének szabályozását elemezve. Kimutattuk, hogy proliferáló humán epidermális HaCaT keratinocytákban jelentős mértékben expresszálódnak a basalis és spinosus réteg markerei, a P-cadherin (P-cad, adherens junctio-specifikus cadherin) és a desmoglein-3 (dsg-3, desmosomális cadherin), míg a differenciálódó sejtekben a desmoglein-1 (dsg-1) kifejeződése dominált.

Ezt követően olyan módosított HaCaT sejteket vizsgáltunk, melyekben vagy rekombináns PKC izoformákat termeltettünk, vagy siRNA-mediált PKC izoforma-specifikus „csendesítést” hajtottunk végre. A fentiekkel jó összhangban az nPKC $\delta$ -t overexpresszáló (fokozott differenciálódással jellemzett) sejtekben jelentősen megemelkedett a dsg-1 szintje, míg a P-cad és dsg-3 expressziója lecsökkent. Ehhez hasonló adhéziós molekula mintázatot tapasztaltunk a cPKC $\alpha$ -t kifejező, ugyancsak differenciálódó sejtekben, de itt nem változott meg a dsg-1 szintje. Hiperproliferatív PKC-overexpresszor sejteket vizsgálva kimutattuk, hogy míg a nPKC $\epsilon$ -t kifejező sejtekben a dsg-1 szintje csökkent, a dsg-3 szintje nőtt, de a P-cad kifejeződése nem változott; addig az ugyancsak gyorsabb növekedési rátát mutató cPKC $\beta$  overexpresszorokban csak a P-cad emelkedett expresszióját tudtuk tetten érni. Mindezen eredményeinket (értelemszerűen „fordított előjellel”) teljes mértékben alátámasztották siRNA kísérleteink is. Megállapítható tehát, hogy a különféle sejt felszíni adhéziós molekulák kifejeződésének szabályozásában – a differenciáltsági állapot egyértelmű hatásán túl – egyes PKC izoformák specifikus, ugyanakkor egymással ellentétes szereppel bírhatnak.

Különféle cPKC izoformákat overexpresszáló HaCaT keratinocytákon elemeztük emellett a purinerg szignalizáció és az intracelluláris kalciumkoncentráció ( $[Ca^{2+}]_i$ ) szabályozásának kapcsolatát is. Megállapítottuk, hogy a cPKC $\alpha$ -t kifejező (alacsony proliferációs rátával és magas differenciáltsági fokkal jellemzett) sejtek nagyobb  $[Ca^{2+}]_i$  növekménnyel válaszoltak ATP adagolásra (habár a sejtek nyugalmi  $[Ca^{2+}]_i$ -ja változatlan maradt). Ezzel ellentétben, a cPKC $\beta$  overexpresszor (hiperproliferatív és alacsony differenciáltságú) keratinocytákban megemelkedett a nyugalmi  $[Ca^{2+}]_i$ , de a

sejtek ATP-érzékenysége sokkal kisebb volt. Bebizonyosodott továbbá, hogy ezen kétféle sejtek eltérő purinoreceptor mintázattal rendelkeznek. Azaz, a cPKC $\beta$ -t kifejező sejtekben (a kontroll és cPKC $\alpha$ -t overexpresszáló keratinocytákban mértékhez képes) lecsökkent P2X1 és megemelkedett P2Y1 receptor kifejeződése, míg cPKC $\alpha$ -HaCaT sejtekben szignifikáns mértékben fokozódott a P2X7 szintje (a P2X2 és P2Y2 kifejeződése nem változott egyik sejttypusban sem). Mindezen adatok arra utalnak, hogy a proliferációs és differenciáltsági állapot megváltozása együtt jár az  $[Ca^{2+}]_i$  szabályozásának módosulásával. Eredményeink emellett azt is sugallják, hogy a PKC izoformák eltérő szereppel bírhatnak a foszfatidil-inozitol jelátviteli útvonal modulációjában.

Vizsgáltuk emellett a PKC izoformák kifejeződésében bekövetkező esetleges módosulásokat különféle humán epidermis-eredetű bőrdaganatokban. Basalsejtes carcinomát (basalioma) vizsgálva megállapítottuk, hogy a cPKC $\alpha$  és a nPKC $\delta$  kifejeződése (mely izoformák overexpressziója humán epidermalis HaCaT keratinocytákban az *in vitro* és *in vivo* növekedés lelassulását, valamint differenciáltabb fenotípus kialakulását eredményezte) jelentősen lecsökkent a kontroll minták értékeihez képes (érdekes módon a többi kifejeződő PKC izoforma szintje nem változott). Laphám carcinomában ugyanakkor eltérő PKC mintázatot tapasztaltunk: a nPKC $\delta$  és a nPKC $\eta$  szintje jelentősen lecsökkent, míg a nPKC $\epsilon$  (melynek overexpressziója HaCaT keratinocytákban jelentősen fokozta a sejtek *in vitro* és *in vivo* növekedési rátáját) és aPKC $\zeta$  kifejeződése drámaian fokozódott a tumoros mintákban.

## **5. A PKC izoenzimek szerepe humán monocytoid sejtekben**

Megvizsgáltuk továbbá a PKC izoformák szerepét humán monocytoid MonoMac-6 sejtek proliferációjának és AA-termelésének szabályozásában. PKC inhibitorok, valamint molekuláris biológiai technikák (rekombináns overexpresszió, siRNA) alkalmazásával kimutattuk, hogy az igen jelentős mértékben kifejeződő cPKC $\beta$  és nPKC $\delta$  izoformák fokozzák a sejtek AA-termelését és proliferációját. Megállapítottuk emellett, hogy az enzimek fenti hatásait a kalcium-független foszfolipáz-A2 és a diacil-glicerol lipáz enzimek mediálthatják. Bebizonyosodott továbbá, hogy a többi kifejeződő PKC izoforma közül a cPKC $\alpha$  kismértékben gátolja, míg a nPKC $\epsilon$  és aPKC $\zeta$  nem befolyásolja a fenti sejtválaszokat.

## **6. Különbéle „PKC targetmolekulák” vizsgálata a humán bőr függelékeiből származó sejteken**

Laboratóriumunkban számos olyan jelátviteli molekula működését tanulmányozzuk (pl. purinerg és cannabinoid receptorok, tranziens receptor potenciál csatornák), melyek funkciójának szabályozásában a PKC izoenzimek központi szereppel bírnak. Ezen „PKC targetmolekulák” vizsgálata során SZ95 sebocytákon az irodalomban elsőként mutattuk ki a tranziens receptor potenciál vanilloid-1 (TRPV1, azaz a „kapszaicin-receptor”) jelenlétét. Megállapítottuk, hogy a TRPV1 TRPV1 aktiválása kapszaicinnal dózis-függő és specifikus módon gátolta a sejtek bazális és AA indukálta lipidtermelését, lecsökkentette számos, a lipidtermelést fokozó gén expresszióját, valamint bifázisos módon megváltoztatta a sejtek proliferációját. siRNA technikát alkalmazva kimutattuk továbbá, hogy a kapszaicin a „TRPV1-csendesített” SZ95 sebocytákon teljes mértékben hatástalan volt (azaz nem befolyásolta sem a lipidtermelést, sem a proliferációt, sem a gének kifejeződését). Érdekes volt ugyanakkor megfigyelnünk, hogy a „TRPV1-csendesített” SZ95 sebocyták bazális lipidtermelése (hasonlóan a TRPV1 antagonistá I-RTX-kezelt sejtekhez) szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll sebocytáké. Úgy tűnt tehát, hogy a TRPV1-kapcsolt szignalizáció mintegy konstitutíven aktív endogén mechanizmus vesz részt a faggyúmirigy lipidtermelésének negatív szabályozásában.

Ezen mechanizmus endogén aktivátorai után kutatva SZ95 sebocytákon vizsgáltuk az AA-származék „endovanilloid” TRPV1 agonista anandamid (AEA) hatását is. Meglepetésre azt tapasztaltuk, hogy az AEA (az „exovanilloid” kapszaicin hatásával ellentétben) jelentősen fokozta a sejtek zsírtermelését, mely nem volt kivédhető TRPV1 antagonistákkal. Mivel az AEA egyben az endocannabinoidok egyik képviselője is, ezt követően megvizsgáltuk az endocannabinoid rendszer tagjainak jelenlétét a sejtekben. Kimutattuk, hogy a sebocyták jelentős mennyiségben termelnek endocannabinoidokat, valamint, hogy a cannabinoid receptorok (CB) közül főként a CB2-t expresszálják (a CB1-et ugyanakkor alig). Kombinált farmakológiai és molekuláris biológiai kísérleteinkben (szintetikus agonisták, antagonisták, siRNA technika) megállapítottuk továbbá, hogy az AEA zsírtermelést fokozó hatását a CB2 receptor közvetíti, számos intracelluláris jelátviteli mechanizmus (pl. a MAPK útvonal, nPKC $\delta$ , PPAR és RAR magreceptorok) aktiválódásán keresztül. Eredményeink alapján úgy tűnik tehát, hogy a humán faggyúmirigy sejtjeiben egymással

ellentétesen működő TRPV1/vanilloid (a zsírtermelést gátló) és CB2/cannabinoid (a faggyútermelést fokozó) rendszerek jelentéte valószínűsíthető.

További kísérletinkben humán szőrtüsző szervkultúrában is vizsgáltuk az endovanilloid/endocannabinoid AEA hatását. Kimutattuk, hogy az AEA – hasonlóan a kapszaicin korábban leírt TRPV1-mediált hatásához – dózis-függő módon meggátolta a szőrszál növekedését és a szőrtüsző mátrix keratinocyták proliferációját, valamint apoptózist és regressziós átalakulást (katagén) indukált. Leírtuk azt is, hogy ezen hatás (részben meglepő módon) nem a TRPV1 aktivációját keresztül, hanem a szőrtüsző epitheliális sejtrétegeiben kifejeződő cannabinoid receptor-1 (CB1) aktiválódásaként valósult meg. Ezzel jó összhangban megállapítottuk továbbá, hogy az exogén cannabinoid vegyület  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol teljes mértékben „utánozta” az AEA celluláris hatásait. Végezetül bebizonyosodott az is, hogy a TRPV1- és CB1-mediált mechanizmusok egymástól függetlenül és additív módon vesznek részt a szőrtüsző növekedési folyamatainak negatív szabályozásában.

Végezetül TRPV1 kifejeződését vizsgáltuk egér bőrben. Az irodalomban elsőként mutattuk ki, hogy a receptor kifejeződik a bőr epidermális keratinocytáiban, valamint a szőrtüsző epitheliális kompartmentjeiben. Bebizonyosodott ugyanakkor az is, hogy a hajciklus során jelentős módosulások tapasztalhatók a TRPV1 expresszió intenzitásában: a legerősebb TRPV1-specifikus immunreaktivitást a regressziós (katagén) és nyugvó (telogén) szakaszokban mértük. TRPV1-knockout állatok vizsgálata során megállapítottuk azt is, hogy jelentős késés regisztrálható ezen állatok hajciklusának idejében (a vad típusú állatok paramétereire viszonyítva), mely eredmény a receptor katagén regressziót serkentő voltára utal (hasonlóan a laboratóriumunk által korábban közölt humán adatokhoz).

## **7. Konklúzió**

Kísérletes eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a különféle PKC izoformák specifikus, egymással gyakran ellentétes, ugyanakkor az adott sejt típusától igen jelentős mértékben függő módon képesek a proliferáció, differenciálódás, a mediátortermelés, valamint receptor-mediált jelátvitel folyamatainak szabályozására.