

# **A protein kináz D aktiváció szerepe az oxidatív stresszel kiváltott neuronális sejtpusztulás során**

Diplomamunka

Biológus Mesterszak

Idegtudomány és Humánbiológia szakirány

Készítette:

**Liliom Hanna Laura**

Témavezető:

Dr. Schlett Katalin, docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,  
Élettani és Neurobiológiai Tanszék



Budapest, 2013

## TARTALOMJEGYZÉK

NYILATKOZAT .....	1
TARTALOMJEGYZÉK .....	2
ÖSSZEFOGLALÓ .....	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	4
BEVEZETÉS .....	5
CÉLKITŰZÉS .....	7
ANYAG ÉS MÓDSZER .....	8
Sejtkultúrák .....	8
Kezelések .....	8
A tenyészetek életképességének meghatározása MTT-módszerrel.....	8
Mintafelvétel és Western Blot .....	9
A Western Blot eredmények denzitometrálnása.....	9
NFκB riporter-esszé.....	10
Statisztikai analízis .....	10
EREDMÉNYEK .....	11
A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kezelés idegsejttenyészetekben dóziszfüggő sejtpusztulást okoz .....	11
A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kezelés a PKD aktiválódását okozza .....	11
A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kezeléssel kiváltott sejtpusztulás mértékét a PKDI-1 csökkenti, míg a Gö 6976 inhibitor nem változtatja.....	13
A H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kezeléssel kiváltott PKD aktiváció mértéke inhibitor jelenlétében csökken.....	15
Az NFκB aktivitás változása a PKDI-1 gátlószer jelenlétében .....	16
AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA .....	17
DISZKUSSZIÓ .....	18
Oxidatív stressz hatására az idegsejtekben a PKD 910. szerinje gyorsan foszforilálódik.....	18
A PKD 910. szerinjének foszforilálódása mennyire jelzi a PKD aktivációját? .....	20
A PKD aktiválódása vagy hatásának gátlása fejt-e ki protektív hatást? Ellentmondásos irodalmi adatok.....	21
A PKDI-1 gátlószer a sejtek életképességére nincs hatással, de oxidatív stressz estén protektív hatást fejt ki.....	22
A PKD fehérje mennyisége 60 perces H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kezelést követően lecsökken: szelektív degradáció vagy kaspáz-mediálta aktiváció? .....	24
A további kísérletek iránya.....	24
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	26
IRODALOMJEGYZÉK .....	27

## ÖSSZEFOGLALÓ

A protein kináz D (PKD) az agyban nagy mennyiségben termelődő szerin/treonin kináz, amely számos más sejtélettani hatás mellett a sejteket érő stresszhatások következtében aktiválódó jelátviteli folyamatokat is befolyásolhatja. Nem idegi sejteken végzett vizsgálatok szerint az oxidatív stressz esetén a mitokondriumokból származó oxigén szabadgyökök a PKD által irányított kaskádrendszert aktiválják. Az idegsejtekben azonban az oxidatív stressz és a PKD aktiváció közötti összefüggésről még kevés adat áll rendelkezésre.

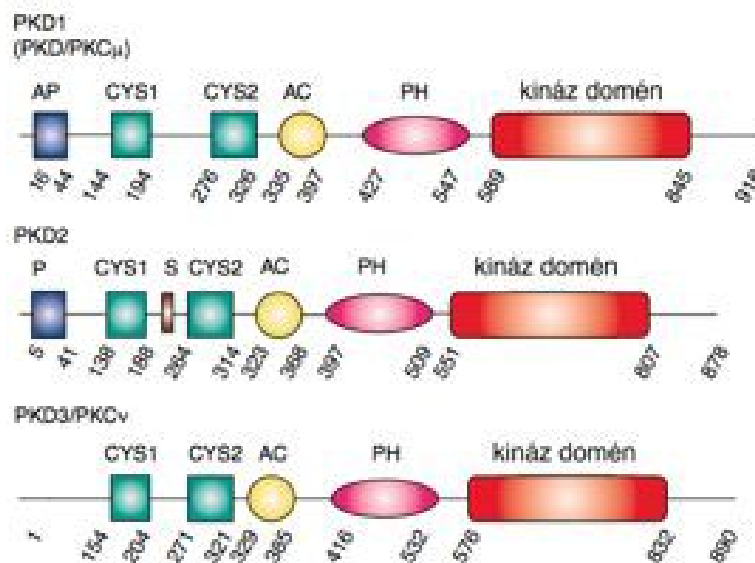
Munkám során az oxidatív stressz-okozta hatásokat modelleztem egér embrionális kortikális idegsejttenyészeteken. A PKD autofoszforylációs szintjének vizsgálatával kimutattam, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kiváltott oxidatív stressz hatására a PKD az idegsejtekben gyorsan aktiválódik. Életképességi tesztek felhasználásával megmutattam, hogy a PKD-ra szelektív gátlószerek a 24 órás oxidatív stresszt követő sejtpusztulás mértékét szignifikánsan csökkentik, vagyis a PKD aktivációja a vizsgált rendszerben neurotoxikus hatást közvetít. A PKD által irányított hatások mechanizmusának felderítését az NFκB transzkripciós faktor aktivitását jelző riporter-esszé alkalmazásával kezdtem meg."

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMPAR	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazolpropionsav receptor
DAG	diacil-glicerin
DIV	a kiültetést követő napok száma (days in vitro)
DMSO	dimetil-szulfoxid
FCS	fötális borjú szérum (fetal calf serum)
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz
Gö 6976	12-[2-cianoetil]-6,7,12,13-tetrahidro-13-metil-5-oxo-5 <i>H</i> -indolo-[2,3- <i>a</i> ]- pirrolo-[3,4- <i>c</i> ]-karbazol
JNK	c-Jun N-terminális kináz
KCN	kálium-cianid
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólium bromid
NF $\kappa$ B	nukleáris faktor $\kappa$ B
NMDAR	<i>N</i> -metil <i>D</i> -aszpartát receptor
PDBu	forbol-12,13-dibutirát
PIP <sub>2</sub>	foszfatidil-inozitol 4,5-difoszfát
PKC	protein kináz C
PKD	protein kináz D
PKDI-1	protein kináz D inhibitor-1
PLC	foszfolipáz C
TNF $\alpha$	tumor nekrozis faktor- $\alpha$

## BEVEZETÉS

A protein kináz D (PKD) enzimek ún. alternatív diacil glicerin (DAG) receptorok, amelyek a szerin/treonin kinázok csoportján belül önálló családot alkotnak. Emlősökben a családba három izoforma (PKD1, PKD2 és PKD3) tartozik, amelyek nagyfokú szerkezeti hasonlóságot mutatnak egymással. A fehérjék N-terminálisán lévő regulációs doméneken belül megtalálható két ciszteinben gazdag Zn<sup>2+</sup>-ujj domén (C<sub>1</sub> és C<sub>2</sub>) és egy pleckstrin homológia domén (PH), míg a katalitikus domén a C-terminálison helyezkedik el (1. ábra). Bár ez a szerkezet a protein kináz C családra is jellemző, a PKD család tagjai eltérő szubsztrát-specifitással rendelkeznek [7; 28]. Egérben mindhárom PKD izoforma kifejeződik és hasonló expressziós mintázatot mutat [5; 12]. A hasonlóságok mellett az egyes izoformák domén-felépítése közti különbségek viszont arra utalnak, hogy a három izoforma funkciója nem teljesen redundáns [16]. Az eddig publikált tudományos munkák túlnyomó része és dolgozatom is a PKD1 izoformával foglalkozik (jelölése a továbbiakban PKD).



1. ábra. A három protein kináz D izoforma domén szerkezete (Van Lint és mtsai, 2002 nyomán).

A PKD aktiválásának több különböző módja ismert. Legjelentősebb ezek közül a foszfolipáz C (PLC) - DAG dependens útvonal. A számos különféle külső stimulust fogadni képes G-fehérje kapcsolt receptorok, illetve tirozin kináz receptorok aktiválják a PLC-t, amely PIP<sub>2</sub>-ből diacil-glicerint hasít. A DAG közvetlenül és közvetve fejt ki hatását a PKD-ra. Egyrészt a PKD a C doménjén keresztül képes a DAG-hoz kötődni, amely különböző membrán-kompartmentumokhoz való transzlokációját eredményezi. Másrészt a DAG a PKC

izoformák aktiválására képes, amelyek a PKD-t foszforilálva annak teljes aktivációját okozzák [14; 29]. Emellett a PKD aktivitását az Abl/src kináz általi tirozin-foszforiláció, a kaszpáz-mediált hasítás, illetve Golgi-asszociáció esetén a G $\beta$ -PKC $\eta$  mediált útvonal is szabályozza [27].

A PKD-n keresztüli szabályozás erősen függ a fehérje sejten belüli lokalizációjától. A nyugalomban citoszólikus fehérje aktivációja első lépéseként a DAG-kötésen keresztül a plazmamembránhoz vagy endomembránokhoz rögzül, majd teljes aktivációja esetén a membránról leválva a sejtalkotók – pl. a sejtmag és a citoszol – közötti közlekedésre képes. Ez a nagyfokú mozgékonyág lehetővé teszi, hogy az enzim különféle jelátviteli útvonalakat térben és időben is összekössön [11; 27; 29].

A PKD részvételét sejtípustól függően már igen sokféle folyamatban kimutatták: a PKD aktivitás a transz-Golgi hálózatban a vezikula lefűződés irányítását, a sejtproliferációt, az apoptózist vagy bizonyos plazmamembrán fehérjék működésének szabályozását, a T- és a B-sejt vagy a növekedési faktor jelátvitelt, illetve a sejtmitotitást és a tumor metasztázist is befolyásolja [27; 29]. A PKD idegsejtekben betöltött szerepéről még keveset tudunk, bár a PKD jelenléte már korai embrionális kortól fogva kimutatható a központi idegrendszerben [5; 12]. Szerepét az idegsejtek dendritfa arborizációjának szabályozásában, a Golgi apparátus integritásának fenntartásában, illetve a neuronális polarizáció kialakulásában már bizonyították [4; 31].

A PKD számos olyan szignáltranszdukciós útvonalban játszik szerepet, amely a sejtpusztulás szabályozásával szoros kapcsolatban áll. Nem idegi sejtekben kimutatták, hogy a PKD káros oxigén szabadgyökök hatására aktiválódik és az NF $\kappa$ B-útvonal aktiválásán keresztül részt vesz az oxidatív stresszre adott protektív sejtválaszban [24]. A PKD képes a pro-apoptotikus JNK útvonal gátlására [29], a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-indukálta oxidatív stressz hatására a szintén pro-apoptotikus p38 MAPK foszforiláció csökkentésére, illetve a sejt túlélés NF $\kappa$ B aktiváción keresztüli elősegítésére is [18].

Az oxidatív stressz fontos jelenség a stroke esetében. A stroke, azaz a szélütés akkor következik be, ha az agyszövet vérellátása vérrög miatti érelzáródás, vagy egy vérér megrepedése miatt sérül, így az érintett területen ischaemia (vagyis oxigénhiányos állapot) lép fel. Az agyi ischaemia alatt, illetve az oxigénhiányos állapot megszűnését követően számos, az idegsejtek pusztulását eredményező folyamat játszódik le. Az oxidatív károsodás a sejteket a véráramlás visszaállása (az ún. reperfüzió) következtében éri - a hatás az ischaemiás stroke által okozott sejtpusztulás egyik fontos tényezője [30]. A PKD az idegrendszerben igen nagy

mennyiségben expresszáldik, de az oxidatív stresszre adott sejtválaszban betöltött szerepéről idegsejtekben még keveset tudunk.

## **CÉLKITŰZÉS**

Munkám során az idegsejttenyészetekben  $H_2O_2$  kezelést alkalmaztam, amely reaktív oxigén szabadgyökök felszabadulása révén okoz a sejtek számára oxidatív stresszt [24]. Kísérleteimmel annak felderítésére törekedtem, hogy az egér primér kortikális idegsejttenyészetekben kiváltott oxidatív stressz során a PKD vajon aktiválódik-e, és aktivációja a sejtpusztulás mértékére van-e hatással. A PKD-függő folyamatok igazolását követően azt is fel szeretném deríteni, hogy ezek a hatások milyen jelátviteli útvonalakon keresztül zajlanak.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### *Sejtkultúrák*

A kortikális tenyészeteket 14-16 napos egér (CD1) embriókból állítottam elő a laboratóriumunkban általánosan alkalmazott protokoll [4; 25] kissé módosított változata szerint. A sejteket poli-L-lizinnel bevont tenyésztő lemezekbe ültettem ki. A sejtűrűség a 96-lyukú lemezekben  $1 \times 10^5$ - $8 \times 10^4$  db sejt/lyuk, a 24-lyukú lemezekben  $5 \times 10^5$  db sejt/lyuk, a 6-lyukú lemezekben  $1,5$ - $1 \times 10^6$  db sejt/lyuk volt. A sejtek a kiültetést követő 1. napig (DIV1) 5% FCS-t (Invitrogen) tartalmazó Neurobasal-B27 (Invitrogen) mediumban inkubálódtak, ekkor a tápot FCS-t nem tartalmazó Neurobasal-B27 mediumra cseréltem. Mind az FCS tartalmú, mind pedig az FCS-mentes Neurobasal-B27 medium tartalmazott 0,5 mM GlutaMax-ot (Invitrogen), illetve 40  $\mu$ g/ml Gentamicin (Sanofi-Aventis) antibiotikumot és 2,5  $\mu$ g/ml Amphotericin B (Sigma) gombaellenes szert is. A gliális osztódás leállítására a sejteket még aznap, vagy másnap (DIV1-2) 10  $\mu$ M citozin arabinofuranoziddal (CAR; Sigma) kezeltem. A CAR kezelést követően, a harmadik, illetve az ötödik napon FCS-mentes Neurobasal-B27 táppal teljes tápcserét végeztem a sejteken.<sup>1</sup>

### *Kezelések*

Az oxidatív stressz kiváltására alkalmazott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t (Sigma; 30 v/w%), illetve a gátlószereket Neurobasal mediumban hígítva adtam a sejtekhez. A *PKDI-1* (Vichem Kft), illetve a Gö 6976 (Calbiochem) gátlószerek törzsoldata 5 mM volt DMSO-ban (Sigma) oldva. A gátlószereket véghígításban 1  $\mu$ M koncentrációban alkalmaztam, két órás előkezeléssel. A gátlószeres kezelések kontrolljaként 0,02 % végkoncentrációban DMSO-t adtam a sejtekhez. A PDBu (Sigma) törzsoldata 2 mM volt DMSO-ban oldva. A kezelések során az anyagot 1  $\mu$ M véghígításban adtam a sejtekhez.

### *A tenyészetek életképességének meghatározása MTT-módszerrel*

Az életképességi teszteket 96-lyukú lemezre kiültetett, DIV8 korú tenyészeteken, a kezelések megkezdése után 24 órával végeztem. Az egyes lyukakat 200  $\mu$ g/ml végkoncentrációjú MTT-vel (Sigma) inkubáltam, majd, miután mikroszkóp alatt megfigyeltem a reakció telítésbe menetelét jelző kék formazán kristályok keletkezését, a reakciót 40-45 perc múlva savas izopropil-alkohollal leállítottam. A keletkezett formazán

.....

<sup>1</sup>Ezen tenyésztési körülmények között a tenyészetek neurtartalma min. 95 %, amit immuncitokémiai festésekkel, illetve az alacsony GFAP tartalommal is alá tudunk támasztani (nincs bemutatva).



kristályok feloldását követően az egyes lyukak optikai denzitását 570 nm (mérési) és 620 nm (referencia) hullámhosszon, fotométerrel (Multiskan EX) határoztam meg.

#### *Mintafelvétel és Western Blot*

A kísérleteket 6-lyukú lemezre kiültetett, DIV8 korú tenyészeteken végeztem. A kísérletek végén a hideg PBS-sel mosott sejtekre proteáz és foszfatáz inhibitort tartalmazó lízis puffert mértem [ld. 4]. A felszedett minták fehérje-tartalmát Bradford-esszé segítségével állapítottam meg. A fehérjemintákat SDS-PAGE technikával, 10%-os poli-akril-amid gélen megfutattam, majd PVDF membránra blottoltam át. A foszforilált PKD kimutatására a-pS910 PKD (poliklonális nyúl IgG, 1:2000; [7]), az össz-PKD1 kimutatására a-PKD (poliklonális, nyúl, 1:2000, Santa Cruz; detekció: 115 kDa), a neuronspecifikus III $\beta$ -tubulin kimutatására a-III $\beta$ -tubulin (monoklonális, egér, 1:5000, Exbio; detekció: ~55 kDa), a GAPDH kimutatására a-GAPDH (poliklonális, nyúl, 1:6000, Sigma; detekció: ~37 kDa) ellenanyagot használtam. A fehérjék kimutatására torna peroxidázzal jelölt anti-egér, illetve anti-nyúl (Jackson, 1:20000) másodlagos ellenanyagokat használtam. A detekció ECL rendszer (Luminata Crescendo vagy Immobilon rendszer; Millipore) segítségével történt. Az adatok kiértékelésénél az egyes csíkok intenzitását az ImageQuantTL programot használva, denzitometrálassal értékeltem ki.

#### *A Western Blot eredmények denzitometrálsa*

A denzitometráls során az egyes Western blot-ok végeredményeként kapott előhívott filmek 300 dpi-ben beszkenelt képeivel dolgoztam. Az egyes mintákban a fehérjedetekció segítségével megjelenített, specifikus csíkokat a program segítségével a háttértől elkülönítettem, illetve körülhatároltam. Az adott csík kiterjedését és pixel-intenzitását figyelembe véve a program kiszámol egy intenzitásértéket. Ezek a mennyiségek az egyes Western blot-ok között nem összehasonlíthatóak, mivel a csíkok vastagsága, illetve feketesége az előhívás számos paraméterétől függő, relatív érték. Éppen ezért a kiértékelés során mindig relatív értékekkel dolgoztam, ahol a denzitometrált értékeket az ugyanazon blot-on detektált, kontroll minták specifikus csíkjaian meghatározott intenzitásértékekhez viszonyítottam. Az így kapott %-os változásokat a különböző blot-ok között már össze tudtam átlagolni (ld. részletesen a dolgozat EREDMÉNYEK részében).

A PKD 910. szerinjének foszforiláltsági szintjének meghatározásakor az egyes mintákban detektált pS910 intenzitásértéket az össz-PKD mennyiséget detektáló a-PKD szinthez viszonyítottam, majd ezt az arányértéket elosztottam az ugyanabban a mintában detektált GAPDH szinthez tartozó intenzitásértékkel. A GAPDH szintre való normálás segítségével a felvitt fehérjemennyiséggel arányos értékeket kaptam. Az adott mintára így

kiszámított értékeket vonatkoztattam az ugyanazon blot-ra felvitt, kontroll mintákban ugyanígy meghatározott arányértékekhez.

A teljes PKD szint adott kísérleten belüli változásának meghatározásához az egyes mintákban detektált össz-PKD mennyiséghez tartozó intenzitásértéket osztottam el az ugyanazon mintában detektált, neuronspecifikus tubulin szintet jelző intenzitásértékkel, majd az így kapott értékeket a kontroll mintában detektált intenzitásértékekből kiszámolt értékhez viszonyítottam.

#### *NFκB riporter-esszé*

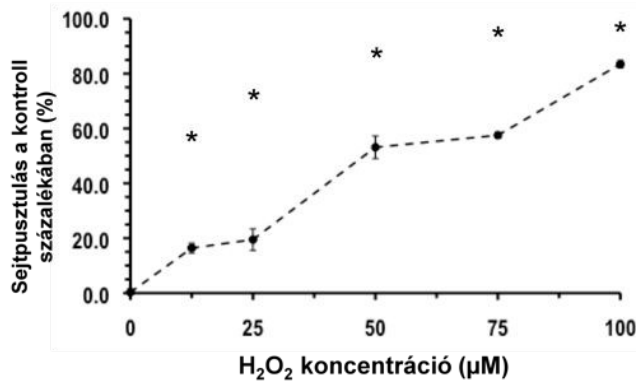
A 24-es lemezre kiültetett sejteket DIV8-on lyukanként 0,8 μg *pRL-TK-luc* és 0,8 μg *NFκB-luci* plazmival, 3,2 μl Lipofectamine 2000 reagens (Invitrogen) segítségével és a gyártó utasításai alapján kotranszfektáltam. Az előbbi konstrukció egy folyamatosan transzkriptálódó *Renilla* luciferázt kódol és a transzfekciós hatékonyság kontrolljaként szolgált, míg az utóbbi az NFκB promóterről meghajtott *Firefly* luciferáz enzimet kódolja, amely csak akkor íródik át, ha a promóteréhez NFκB kötődik. A kezeléseket 24 órával a transzfekció után kezdtem meg. A kísérletek elindítása után 6 órával jégre rakott lemezek lyukaihoz 5x hígított *Passive Lysis Buffer*-t (Promega) adtam. Minimum 15 perc jégen történő rázatás után a mintákat felpipettáztam. Méréskor először a minták *Firefly* luciferáz aktivitását, azután a minta *Renilla* luciferáz aktivitását mértem meg az adott enzim specifikus szubsztrátjainak hozzáadása után luminométer (Fluoroskan FL) segítségével. A luciferáz enzim szubsztrátokat A. Hausser munkacsoportjának (Stuttgarteri Egyetem, Sejtbiológiai és Immunológiai Intézet) protokollja alapján készítettem el. Az adatok kiértékelése során a *Firefly* lumineszcencia/*Renilla* lumineszcencia arányt hasonlítottam össze, majd a kontroll értékének százalékában adtam meg.

#### *Statisztikai analízis*

A statisztikai elemzésnek (GraphPad Prism) alávetett Western Blot és életképességi teszt eredményeim minimum három független kísérlet adataiból, 96-lyukú lemezek esetében kezelésenként 5-8 párhuzamos mérésből származnak. Az NFκB riporter-esszék eredményei minimum 5 független kísérlet adataiból származnak, kezelésenként 3-4 párhuzamos mérésből. Az eltérés szignifikanciájának megállapítására normál eloszlású adatsorok esetében párosítatlan t-tesztet, nem normál eloszlású adatsorok esetében pedig Mann-Whitney tesztet alkalmaztam ( $p < 0,05$ ). Az adatok normál eloszlásának ellenőrzésére Kolmogorov-Smirnov próbát használtam.

## EREDMÉNYEK

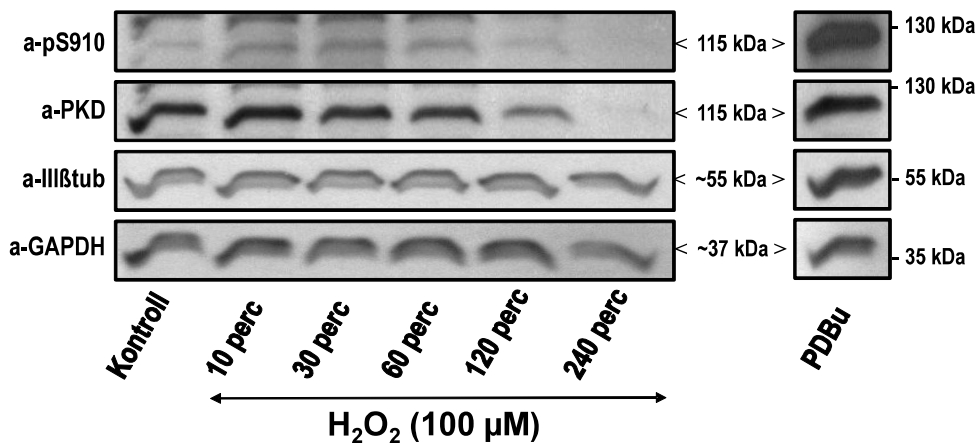
*A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés idegsejttenyészetekben dóziszfüggő sejtpusztulást okoz*



**2. ábra.** A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatása a sejtpusztulásra. Hat független kísérletből származó adatsor, kezelésként 5-8 párhuzamos adattal. A megadott átlagértékek kiszámítása a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal nem kezelt, kontroll értékek százalékában megadott – a túlélő sejtek arányát jelző – értékek 100 %-ból való kivonásával történt. Hibasávok: SEM. \*: p<0,05.

Az oxidatív stressz modellezésére alkalmazott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés esetén a 24 órás, folyamatos kezelés után már 12,5 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is szignifikáns mértékű sejtpusztulást okozott a kontrollhoz képest, 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> esetében pedig közel 100%-os toxicitást figyeltem meg (2. ábra). A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezeléshez tartozó LD<sub>50</sub> érték megközelítőleg 50 μM volt. A rövid kísérleti időtartamoknál (1-6 h) ezért a markánsabb hatást eredményező 100 μM, illetve 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést alkalmaztam.

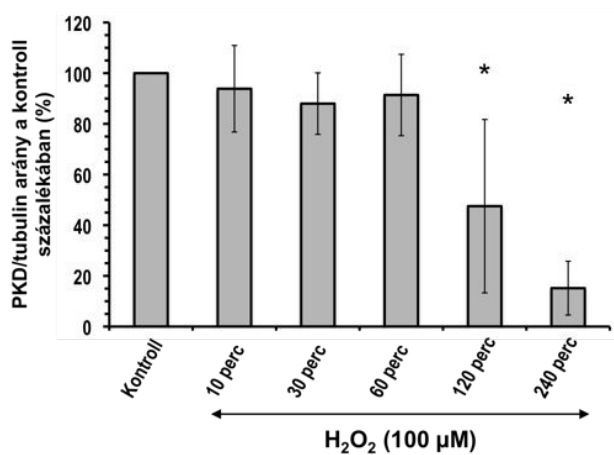
*A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés a PKD aktiválódását okozza*



**3. ábra.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatása a PKD foszforilációs szintjére. Reprezentatív Western Blot. Az ábra jobb szélén a molekulásúly markerek helyét jelöltem. Az egyes ellenanyagok leírását részletesen ld. a szövegben. Pozitív kontrollként a PKD markáns foszforilációját kiváltó, 1 μM forbolészterrel (PDBu) kezelt tenyészet szolgált.

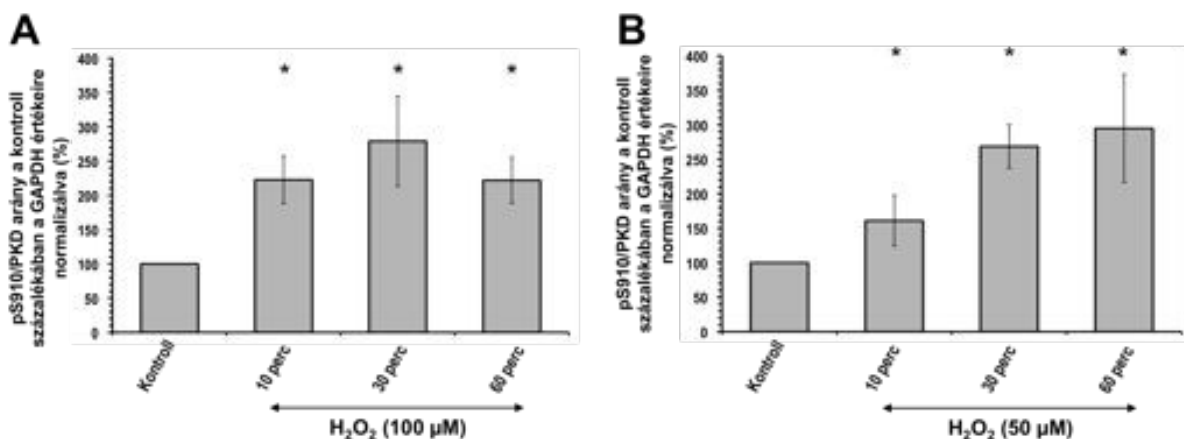
A PKD számos auto-, illetve transzfoszforilációs helyvel rendelkezik [28]. Mivel a 910. pozícióban elhelyezkedő szerint a PKD az upstream aktiválását követően autofoszforilálja, a foszforilált szerin910 ellen termeltetett ellenanyag (a-pS910) segítségével a PKD katalitikus

aktivitásának változását Western Blot technikával nyomon lehet követni [7; 10]. A PKD aktiváció pozitív kontrolljaként forbol-észter (PDBu, 1 $\mu$ M végkoncentrációban, 10 percig) kezelés szolgált, amely a PKD-t erősen aktiválja [28]. A teljes PKD mennyiséget a PKD1 ellen termeltetett ellenanyag (a-PKD) segítségével mutattam ki. A neuronspecifikus III $\beta$ -tubulin (a-III $\beta$  tubulin) csíkja a mintában levő idegsejtek, a minden sejtben termelődő gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (a-GAPDH) csíkja pedig az össz-sejtmennyiséget tükrözi. Az adatok kvantifikálása során a csíkok denzitometrálását követően a foszforilált PKD mennyiség teljes PKD mennyiséghez viszonyított arányát vizsgáltam.



**4. ábra.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatása a teljes PKD szintre. Hat független mérésből származó adat denzitometrállása. Az átlagértékek az egyedi blottokra felvitt és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal nem kezelt, kontroll minták PKD/tubulin arányának százalékában vannak megadva. Hibasávok: SD. \*: p<0,05.

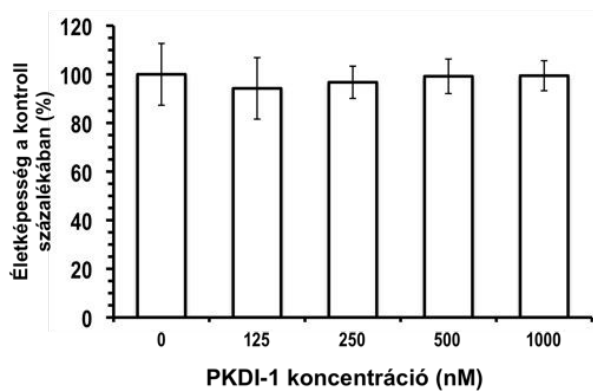
Ezzel a módszerrel a rövid távú hatásokat kívántam vizsgálni, így a mintafelvételt megelőzően a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést (100, vagy 50  $\mu$ M) 10, 30, 60, 120 és 240 percig alkalmaztam. A



**5. ábra.** (A) 100  $\mu$ M-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatása a PKD foszforiláltsági szintjére. Hat független mérésből származó adat denzitometrállása. Az átlagértékek az egyedi blottokra felvitt és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal nem kezelt, kontroll minták GAPDH tartalomra vonatkoztatott pS910/PKD arányának százalékában vannak megadva. \*: p<0,05. (B) 50  $\mu$ M-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatása a PKD foszforiláltsági szintjére. Az átlagértékek az egyedi blottokra felvitt és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal nem kezelt, kontroll minták GAPDH tartalomra vonatkoztatott pS910/PKD arányának százalékában vannak megadva. \*: p<0,05. (A és B) Hibasávok: SEM.

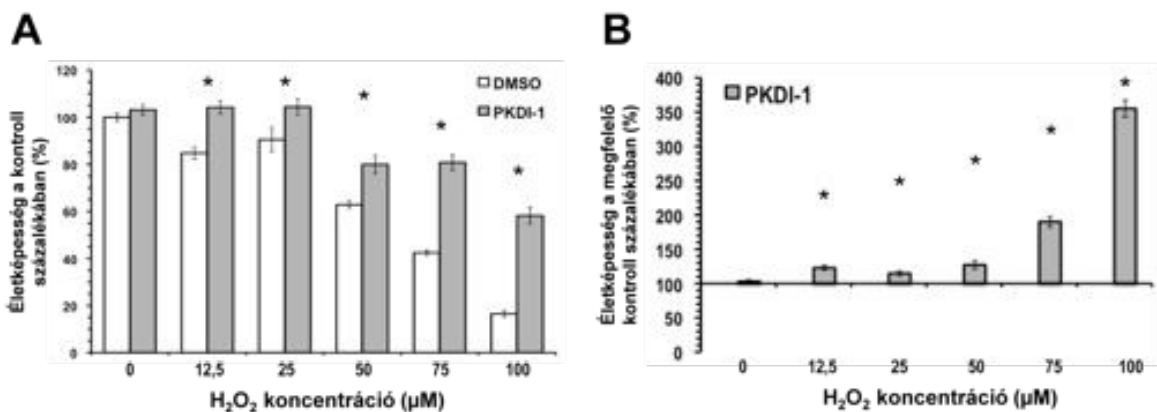
kezelés 120. percéig a tenyészetek átlagos sejtszáma és neurontartalma gyakorlatilag nem változott, amit az a-GAPDH és a-III  $\beta$ tubulin csíkok egyenletes intenzitása is jelez (3. ábra), azonban az össz-PKD mennyiség a 60 percnél hosszabb  $H_2O_2$  kezelés hatására fokozatosan csökkent (3-4. ábra). A PKD S910 autofoszforylációs szintje a kezelés során gyors növekedést mutatott: a foszforylált szerin910 össz-PKD mennyiséghez viszonyított aránya már a kezelés 10. percében megnőtt, és szintje a 30-60. percben volt a legnagyobb (5. ábra).

A  $H_2O_2$  kezeléssel kiváltott sejtpusztulás mértékét a PKDI-1 csökkenti, míg a Gö 6976 inhibitor nem változtatja



**6. ábra.** A szelektív PKD gátlószer (*PKDI-1*) hatása az idegsejtek életképességére. Egy mérésből származó adatsorok, kezelésenként 5-6 párhuzamos adattal. Az egyes lyukakat növekvő koncentrációjú *PKDI-1* inhibitorral kezelt 24 órán át. Az átlagértékek a DMSO-val kezelt lyukakban mért életképességi értékek százalékában vannak megadva. Hibásávok: SD.

Általános probléma a PKD enzimek vizsgálatával kapcsolatban, hogy a kereskedelmi forgalomban szelektív PKD inhibitorok nem kaphatók. Az általánosan alkalmazott Gö 6976 inhibitor például elsősorban a protein kináz C izoformákat gátolja, bár hat a PKD-ra is [9].

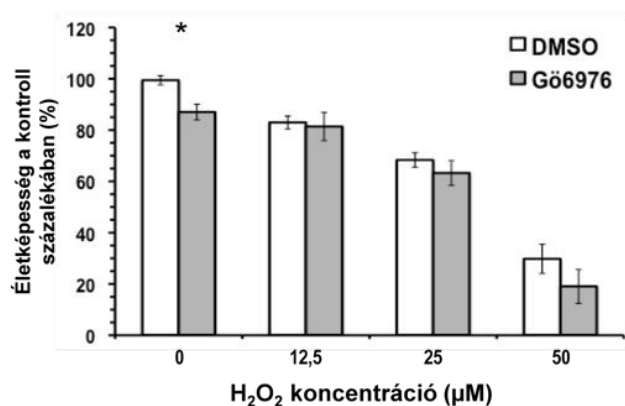


**7. ábra.** A szelektív PKD gátlószer (*PKDI-1*) hatása az idegsejtek  $H_2O_2$  kezeléssel kiváltott pusztulására. Három független mérésből származó adatsorok, kezelésenként 5-6 párhuzamos adattal. (A) Az átlagértékek a  $H_2O_2$ -dal és gátlószerrel nem kezelt lyukakban mért életképességi adatok százalékában vannak megadva. (B) A protektivitás mértéke. Az átlagértékek az adott koncentrációjú  $H_2O_2$ -dal kezelt, de csak DMSO-t kapott lyukakban mért életképességi értékek százalékában vannak megadva. (A és B) Hibásávok: SEM. \*:  $p < 0,05$ .

Saját vizsgálataim során egy újonnan kifejlesztett, a PKD-ra nézve szelektívebb gátlószert alkalmaztam (*PKDI-1*), amelyet a Vichem Kft. bocsátott a laboratórium rendelkezésére<sup>2</sup>. Eredményeim alapján (6-7. ábra) az alkalmazott 24, illetve 26 órás kezelést követően a sejtek életképességét a *PKDI-1* nem befolyásolta szignifikánsan. A kontroll lyukakba mért 0,02% DMSO sem okozott életképességcsökkenést (nincs bemutatva).

A laboratóriumban mások mérései alapján a *PKDI-1* 1  $\mu\text{M}$  koncentrációban már hatékonyan gátolja a PKD-t, ezért saját kísérleteim során is ezt a koncentrációt alkalmaztam. Megvizsgáltam, hogy a 12,5, 25, 50, 75 és 100  $\mu\text{M}$  hidrogén-peroxiddal kiváltott sejtpusztulás mértékére az inhibitor jelenléte milyen hatással van. A neurotoxikus kezeléseket megelőzően az előállító előírásainak megfelelően két órás *PKDI-1* előkezelést alkalmaztam, ezt követően a gátlószert a tápfolyadékban folyamatosan jelen volt, függetlenül attól, hogy a toxikus kezelés meddig tartott.

A 24 órás, folyamatos  $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelést követően azt tapasztaltam, hogy a *PKDI-1* inhibitor jelenlétében az alkalmazott hidrogén-peroxid koncentráció szignifikánsan kisebb életképesség-csökkenést okozott (7. A ábra). Ez a protektív hatás a 75 és 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelésnél volt a leglátványosabb (7. B ábra).



**8. ábra.** A Gö 6976 hatása az idegsejtek  $\text{H}_2\text{O}_2$  kezeléssel kiváltott pusztulására. Három független mérésből származó adatsorok, kezelésenként 5-6 párhuzamos adattal. Az átlagértékek a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal és gátlószerral nem kezelt lyukakban mért életképességi adatok százalékában vannak megadva. Hibaszávok: SEM. \*:  $p < 0,05$ .

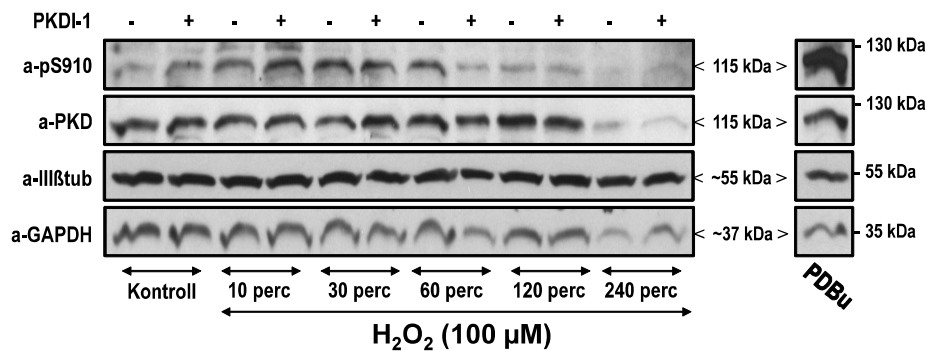
A következőkben megvizsgáltam, hogy egy széles körben használt PKD gátlószernak hasonló hatása van-e a sejtek túlélésére. A Gö 6976 inhibitorot mások hosszú távú kísérleteinek mintájára [8] szintén 1  $\mu\text{M}$  koncentrációban és a *PKDI-1* gátlószerral való kezeléssel azonos módon, két órás előkezeléssel alkalmaztam. Érdekes megfigyelés volt,

<sup>2</sup>A gátlószert kereskedelmi forgalomban nem kapható, ezért megnevezésére kódnevet használunk. A Vichem Kft. által rendelkezésünkre bocsátott információk szerint a *PKDI-1* az ATP-kötő helyet blokkoló allosztérikus inhibitor, amely a PKD-t nanomoláris  $\text{EC}_{50}$  értékben gátolja, de kisebb mértékben bizonyos PKC izoformákra is hat."

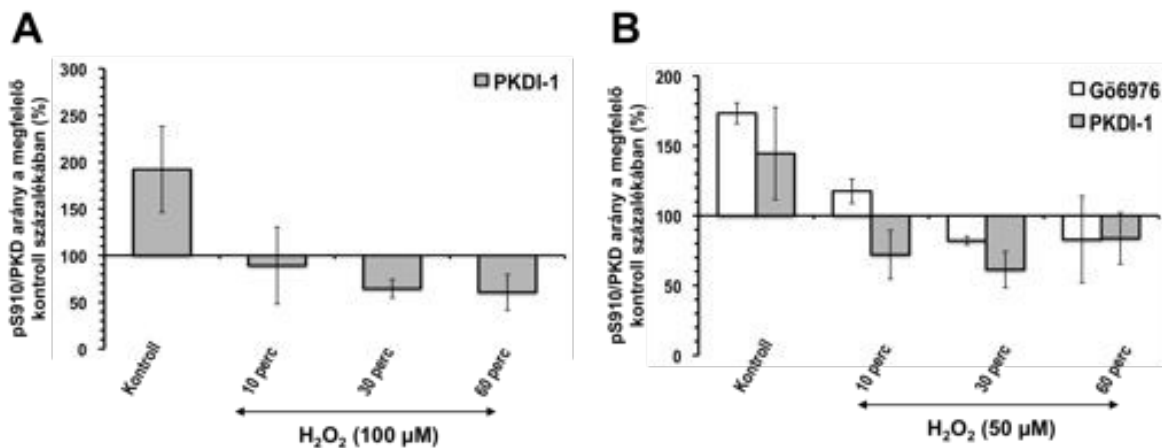
hogy a Gö 6976 a kontroll, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal nem kezelt tenyészetek életképességét kis mértékben, de szignifikánsan csökkentette, de a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében nem fejtett ki protektív hatást (8. ábra).

*A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezeléssel kiváltott PKD aktiváció mértéke inhibitor jelenlétében csökken*

A következőkben megvizsgáltam, hogy a PKD gátlók befolyásolják-e a PKD oxidatív stressz hatására bekövetkező foszforilációjának mértékét. Az inhibitor koncentrációk, illetve a gátlószeres kezelések menete az életképesség-mérésekben alkalmazottakkal megegyeztek (7-8. ábra), és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelések protokollja is megegyezett a 3-5. ábrán is bemutatott, rövid távú kísérletek során alkalmazottakkal.



**9. ábra.** A *PKDI-1* gátlószer hatása a PKD oxidatív stressz által előidézett aktivációjára. Egy reprezentatív Western Blot. Az ábra jobb szélén a molekulásúly markerek helyét jelöltem, a PDBu-val kezelt minta pozitív kontrollként szolgált.



**10. ábra** *PKDI-1* és Gö 6976 hatása a PKD oxidatív stressz által előidézett aktivációjára (A) 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés, illetve (B) 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés esetén. Az átlagértékek az adott ideig H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal és gátlószerrel kezelt mintákban mért pS910/PKD arányhoz viszonyított százalékában vannak megadva. Hibásávok: SEM. (A és B) Két, illetve két-két független mérésből származó adat denzitometrálnak, ami a statisztikai elemzéshez még kevés adat.

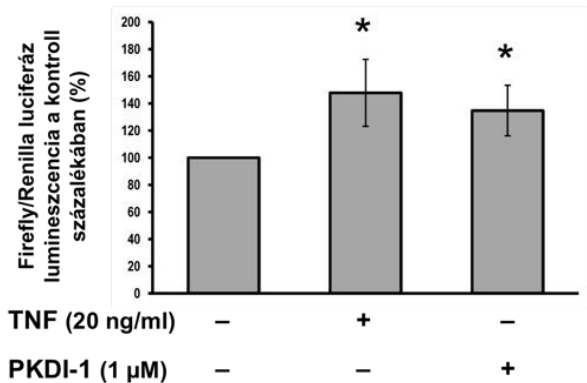
A Western Blot eredmények kvantifikálását követően megállapítottam, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelések esetén a 910. pozícióban levő szerin foszforiláltságának relatív szintjét mind a

*PKDI-1*, mind a Gö 6976 csökkentette (9-10. ábra). Meglepő, de mindkét gátlószernél egybecsengő eredményeim alapján a kontroll, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal nem kezelt tenyészetekben a gátlószerek a PKD 910. szerinjének foszforiláltsági szintjét megnövelték (10. ábra)."

*Az NFκB aktivitás változása a PKDI-1 gátlószer jelenlétében*

Az oxidatív stressz által aktivált PKD és az NFκB útvonal kapcsolatát nem neurális sejtekben korábbi kutatások már bizonyították [18; 24]. Ennek alapján az idegsejttenyészetekben az NFκB aktiváció mértékét a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés, a *PKDI-1* gátlószer, illetve ezek együttes alkalmazása esetén is vizsgálni szeretnénk. Az NFκB aktivitás kimutatását az NFκB riporter-esszé segítségével vizsgáltam (ld. ANYAG ÉS MÓDSZER). A különböző kezelések életképességre gyakorolt hatását MTT-esszé segítségével is nyomon követtem.

Az NFκB riporter-esszé idegsejttenyészetekben történő megfelelő kivitelezése technikailag nem egyszerű feladat, hiszen az idegsejteket két riporter plazmiddal kell transzfektálni. Mivel az érettebb, már hosszú nyúlványokkal rendelkező idegsejtekben a Lipofectamine reagenssel elvégzett transzfecció hatékonysága alacsony (<0,1%), nehéz olyan körülményeket elérni, ahol a riporter konstrukciók megfelelő mennyiségben termelődnek <sup>3</sup>. A kezdeti próbálkozásokat követően a mérés érzékenységét sikerült megfelelően beállítanom, amit a pozitív kontrollként alkalmazott 20 ng/ml TNFα-val történő kezelés is alátámasztott <sup>4</sup>:



**11. ábra.** A *PKDI-1* hatása az idegsejtekben az NFκB aktivációjára. Két (TNF kezelés), illetve öt (*PKDI-1* kezelés) független mérésből származó adatsorok összesítése. Az átlagértékek a TNF-fel és gátlószerrel nem kezelt lyukakban mért Firefly/Renilla luciferáz lumineszcencia érték-arányainak százalékában vannak megadva. Hibásávok: SD. \*: p<0,05."

=====

<sup>3</sup> A transzfecció hatékonyság növelésére a nukleofekció technikát is kipróbáltam, ahol a Lonza Nucleofector készülékével a kiültetés során, még szuszpenzióban végeztem el a plazmidok transzfektálását. Ezzel a módszerrel sokkal magasabb (~30%) transzfecció arányt sikerült elérnem (a GFP-pozitivitás alapján FACS-szal megállapított érték), de a transzfektált idegsejtekben a kiültetést követő napokban egyre fokozódó sejtpusztulást figyeltem meg. Mivel a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelésre csak a kiültetést követő 8-9. napon került sor, az erre az időre bekövetkező nagy mértékű idegsejtpusztulás a riporter esszé alkalmazását lehetetlenné tette."

<sup>4</sup>"A TNFα az NFκB jól ismert aktivátora [13]."



a két független tenyészetben elvégzett TNF kezelés a kontroll tenyészetekhez viszonyítva  $147 \pm 24,7$  %-os aktivitásváltozást okozott (11. ábra).

Az 1  $\mu$ M-ban alkalmazott *PKDI-1* esetében 5 független tenyészet értékeit átlagolva is azt tapasztaltam, hogy a gátlószer önmagában alkalmazva szignifikáns, az alkalmazott TNF  $\alpha$ -kezeléshez hasonló mértékű NF $\kappa$ B aktivitás-növekedést váltott ki ( $135 \pm 19$  % a kontroll érték százalékában; 11. ábra). A párhuzamosan elvégzett MTT-mérések alapján az inhibitor a sejtek életképességében – korábbi méréseim eredményeivel egybehangzóan – nem okozott változást.

A 100  $\mu$ M  $H_2O_2$ -dal történt kezelésekből származó minták eredményei egyelőre ellentmondásosak. Mivel a 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  az alkalmazott 6 órás kezelés alatt a tenyészetek egy részében már jelentős sejtpusztulást okozott, az egyes tenyészetekben megállapítható NF  $\kappa$ B aktiváció mértéke jelentősen eltérő volt. A konzisztens eredményekhez szükséges további mérések jelenleg folyamatban vannak. Eddigi eredményeim alapján megállapítottam, hogy a transzfekció jelentősen megnövelte az idegsejtek érzékenységét a  $H_2O_2$  kezelésre, így az alkalmazott  $H_2O_2$  koncentráció 50, 25, illetve 12,5  $\mu$ M-ra csökkentésével igyekszem megoldani ezt a problémát (nincs bemutatva).

## AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- A  $H_2O_2$  kezelés alkalmas az oxidatív stressz által okozott neurodegeneráció *in vitro* modellezésére.
- A  $H_2O_2$  kezelés a PKD Ser910 gyors, 10 percen belüli foszforilációját okozza, ahol a maximális aktivációt megközelítőleg a kezelés 30. percénél tapasztaltam.
- A *PKDI-1* gátlószer alkalmazása önmagában a sejtek életképességét nem befolyásolja, de oxidatív stressz esetén az idegsejtek túlélését serkenti, protektív hatású. A Gö 6976 gátlószer ezzel szemben normál körülmények mellett kissé csökkenti az életképességet és oxidatív stressz esetén az idegsejtek túlélését nem befolyásolja.
- Normál körülmények mellett a gátlószer önmagukban alkalmazva kiváltják a PKD 910. szerinjének foszforilálódását. Oxidatív stressz hatására azonban mind a két vizsgált gátlószer csökkenti ennek mértékét.
- Munkám során sikerült az NF $\kappa$ B riporter-esszé mérési paramétereit beállítanom. Eddigi eredményeim azt mutatják, hogy a *PKDI-1* jelenléte NF $\kappa$ B aktivációt okoz a neuronális tenyészetekben, miközben a sejtek életképességét nem befolyásolja.

## DISZKUSSZIÓ

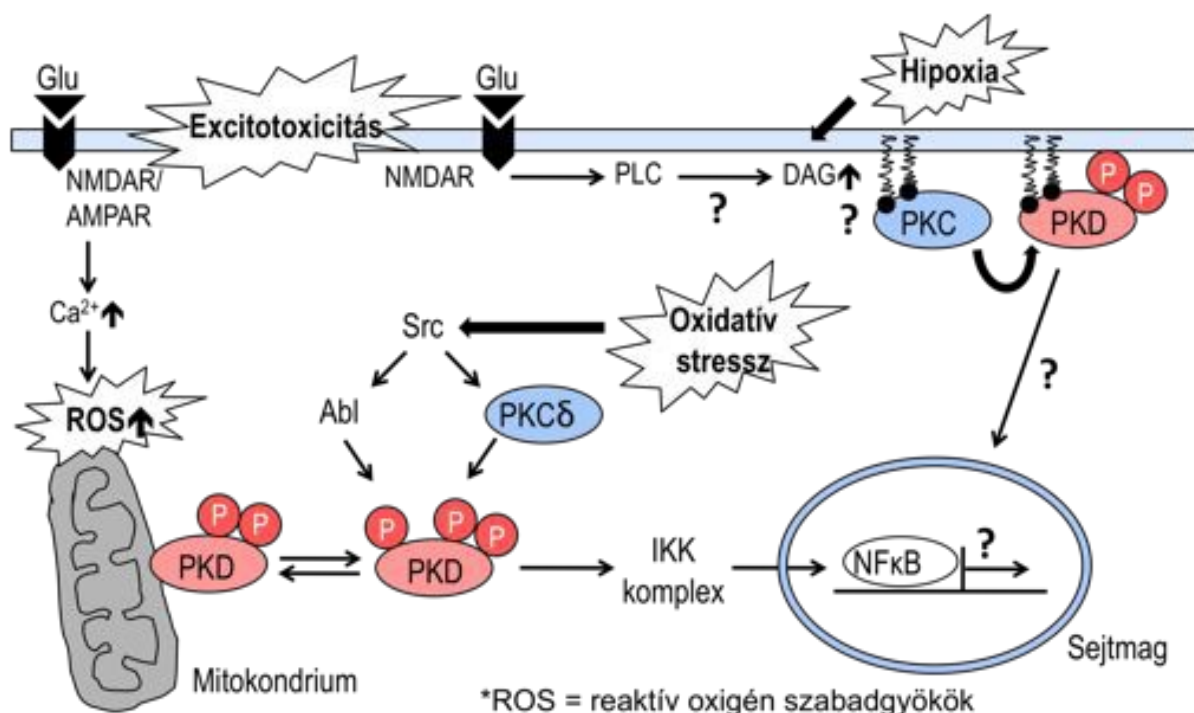
Az oxidatív stresszre adott neuronális sejtválasz mechanizmusának felderítésének az agyi ischaemiás stroke kutatásában van jelentősége, amely az egyik leggyakoribb halálok a fejlett országokban [30]. A kezeléshez elengedhetetlen az ischaemiás stroke mechanizmusának megértése, amiben az ischaemiás stroke során lejátszódó részfolyamatok modellezése segítséget nyújthat. Az ischaemia során fennálló *anoxiás (O<sub>2</sub> hiányos) – hipoglikémiás állapot* modellezésére alkalmas a kálium-cianid – dideoxiglükóz kombinált kezelés, amely a glikolízis és a mitokondriális terminális oxidáció gátlását okozza [17]. Az O<sub>2</sub>- és energiahányos állapot következtében hamar kialakul az *excitotoxikus hatás*. Az energiahányos állapot a preszinaptikus membrán depolarizációját és a feszültség-függő Ca<sup>2+</sup> csatornák aktiválását okozva megnövekedett mértékű glutamát felszabadulást idéz elő, emellett a glutamát asztrociták által elvégzett újrafelvételét is megzavarja. Mindezek következtében a szinaptikus résben levő glutamát koncentrációja jelentősen megnő a normális értékekhez képest, amely az ionotróp glutamát receptorok (elsősorban NMDAR és AMPAR) túlzott mértékű és túl sokáig fennálló aktivációját okozza. Ebből kifolyólag a sejten belüli Ca<sup>2+</sup> koncentráció nagymértékben megnövekszik, s proteázok és endonukleázok aktiválását, illetve közvetetten szabadgyökök felszabadulását okozza [30]. Az excitotoxikus hatás modellezése magas extracelluláris glutamát koncentráció létrehozásával lehetséges, amely az ionotróp glutamát receptorok túlserkentéséhez vezet [1]. Az *oxidatív stressz*-hatás az ischaemiás állapot megszűnése után, a reperfüziókor is fenyegeti a sejteket, mivel azok a hirtelen megnövekedő O<sub>2</sub> koncentráció következtében keletkező szabadgyököket nem képesek elég gyorsan eltávolítani, így sejtpusztulást előidéző károsodásokat szenvedhetnek [30]. Az ischaemia által közvetlenül érintett területen kívül ez a jelenség a sejtpusztulás egyik fő oka az ischaemiás és a káros hatás által érintetlen agyterületek között fekvő, ún. penumbra területén [6]. TDK dolgozatomban az oxidatív stressz kiváltásával kapcsolatos eredményeimet mutatom be, de a másik két neurotoxikus hatás modellezésével is foglalkoztam. Az anoxiás-hipoglikémiás, illetve az excitotoxikus irányokba történő vizsgálatot további munkám során még folytatni szeretném.

*Oxidatív stressz hatására az idegsejtekben a PKD 910. szerinje gyorsan foszforilálódik*

Munkám során sikerült bizonyítanom, hogy oxidatív stressz hatására a protein kináz D az idegsejtekben igen gyorsan, 10 percen belül foszforilálódik; a 910. szerin foszforilálódásának maximális szintjét kb. 30 perc alatt eléri. Mivel a 910. szerin

foszforilációja nagy mértékben a PKD aktivációját követő autokatalitikus hatás eredménye, a relatív foszforiláltság szintjét a PKD katalitikus aktiválódásának általánosan alkalmazott detektálására használják [7; 10]. Meg kell jegyezni azonban, hogy az újabb kutatások fényében a PKD aktivitás detekciójának a 910. szerin foszforiláltsági szintjének elemzése nem 100%-osan megbízható módszere (ld. később).

A PKD aktiváció neuronális sérülések alatti általános voltára utal, hogy a PKD aktivációját az idegsejteket érő DNS károsodás, a lipopoliszachariddal kiváltott gyulladás vagy anoxia-hipoglikémia esetén is kimutatták [2; 19; 21]. Ezzel összhangban saját és munkatársaim adatai szerint az idegsejteket a glutamát excitotoxicitás és az anoxia-hipoglikémia is a PKD aktivációját eredményezte (nincs bemutatva). Az excitotoxicitás, illetve hipoxia és a PKD aktiváció közötti kapcsolat létezését más tanulmányok eredményei is alátámasztják, bár részben közvetett módon. Ismert, hogy az excitotoxicitás azon túl, hogy az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint megnövelésén keresztül reaktív oxigén szabadgyökök felszabadulását, és így a PKD foszforilációját idézi elő, foszfolipázok aktivációját is indukálja. Ilyen például a PLC, amelyről jól ismert, hogy DAG képződését indukálja, ami pedig a PKD kötődéséhez, majd aktiválódásához vezet [34]. A hipoxia következtében



**12. ábra.** A PKD aktivációja kapcsolatba hozható az ischaemiás stroke során, illetve annak következtében lezajló három alapvető jelenséggel: a hipoxia állapotával, az excitotoxicitással, illetve az oxidatív stresszel közvetlen, illetve közvetett bizonyítékok (pl. DAG felszabadulás, vagy PLC aktiváció) alapján [23; 24; 34; 35]. "

aktiválódó szignalizációs útvonalakon belül a DAG által közvetített jelátviteli útvonalak szerepéről is van adat [35] (12. ábra).

Az általam vizsgált körülmények mellett az oxidatív stressz hatására történő aktiváció kinetikája gyors volt, ami a nem-idegsejtekben publikált adatokkal is jól korrelál, hiszen a PKD endomembránokhoz való transzlokációja és aktivációja is relatíve gyors, percekben belül lezajló folyamat [11].

A jelenségek értelmezése szempontjából fontos kérdés, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés vajon milyen upstream szabályozás révén vezethet az aktivációhoz. Az valószínűleg általánosan érvényes, hogy a PKD aktivációjához az endomembránok DAG-jához történő asszociációra van szükség. Az oxidatív stressz általi PKD aktiváció nem neuronális sejtekben több egymást követő lépésben történik. Oxidatív stressz hatására az Src tirozin kináz aktiválja az Abl kinázt, amely a PKD PH doménjében lévő tirozint (Y463) foszforilálja [24]. Ez segíti elő a PKD aktivációjának következő lépését, amikor a PKC $\delta$  – amely maga is az Src kináz szubsztrátja – a katalitikus doménon belül található ún. aktivációs hurok két szerinjét (S738 és S742) foszforilálja [22]. Az oxidatív stresszt okozó szabadgyökök külső források mellett származhatnak a mitokondriumokból is [23]. Ezeknek a szabadgyököknek a detoxifikálása szintén PKD közvetített útvonalon keresztül történik [23], ahol a PKD aktivációja a foszfolipáz D1 (PLD1) által termelt DAG révén valósul meg [3] (12. ábra).

*A PKD 910. szerinjének foszforilálódása mennyire jelzi a PKD aktivációját?*

A PKD aktivitás szerepének tárgyalásakor azonban azt is fontos megjegyezni, hogy a friss publikációkban már kételyek merültek fel azt illetően, hogy a 910. pozícióban levő szerin foszforiláltságának szintje mennyire feleltethető meg a tényleges PKD aktivitásnak, illetve mennyire köszönhető a PKD autofoszforilációjának: a S910 transzfoszforilációját (azaz egy másik PKD molekula által kivitelezett foszforilációját) egyrészt több adat is bizonyítja, másrészt az upstream kinázok által végrehajtott foszforiláció lehetősége sem zárható ki teljesen [15; 20].

A PKD katalitikus aktivitásának sejtekben történő vizsgálatának vitathatatlanul jobb módja lenne egy közvetlenül a PKD kináz aktivitását jelző PKD riporter alkalmazása. Egy ilyen, GFP-hez kötött PKD riporter [4] rendelkezésünkre állna: munkatársaim a HEK293T sejtekben ezt a riporterkonstrukciót alkalmazva igazolták pl. a *PKDI-1* dózisfüggő hatását. A módszer fő problémája azonban az, hogy ez a riporter konstrukció csak transzfekció útján juttatható a sejtekbe, a liposzómás transzfekció határfoka viszont az idegsejtenyészetekben

túlságosan kicsi ahhoz, hogy a termelődő fehérjét Western Blot segítségével detektálni lehessen<sup>5</sup>.

A PKD aktiváció vizsgálatára egy további lehetőséget egy nemrégiben kifejlesztett, a FRET (Förster-féle rezonáns energiaátadás) módszeren alapuló, élő sejtekben működő PKD riporter rendszer [36] alkalmazása jelenthetne. Egy ilyen rendszer segítségével a PKD aktivációját folyamatában is képesek lennénk megfigyelni, ugyanakkor a sejten belüli lokalizációról is kapnánk információt. A rendszer tesztelése munkatársaim által jelenleg is folyamatban van. Ha működése megbízhatónak bizonyul, az idegsejtekben a PKD aktiváció és az oxidatív stressz közötti kapcsolat felderítésére irányuló kutatásaim során feltétlenül alkalmazni fogom.

Egyelőre annak fényében, hogy kísérleteim során a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> az S910 foszforilációját már a kezelés 10. percében kiváltotta, illetve hogy ennek mértékére az alkalmazott gátlószerek már a 10. percben is hatással voltak, fenntartásokkal ugyan, de elfogadjuk azt a feltételezést, hogy az alkalmazott kísérleti körülményekben a 910. szerin foszforiláltsági szintjének változása – legalábbis részben – a PKD aktivitációját is jelzi.

*A PKD aktiválódása vagy hatásának gátlása fejt-e ki protektív hatást? Ellentmondásos irodalmi adatok*

Az eredmények értelmezése szempontjából további fontos kérdés, hogy mi lehet a PKD által szabályozott downstream jelátviteli útvonal. Az oxidatív stressz és a túlélést elősegítő NFκB-mediált útvonal kapcsolatát több publikációban is alátámasztották [23; 24]. Az a megfigyelésem, hogy a szelektív *PKDI-1* inhibitor az oxidatív stressz-hatással előidézett idegsejtpusztulást csökkentette, azaz protektív hatást fejtett ki, ellentmondásban van mások eredményeivel, ahol a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatására aktiválódó PKD az NFκB útvonal aktiválásán, illetve a p38 MAPK útvonal gátlásán keresztül anti-apoptotikus hatást fejtett ki [18; 23]. Egy másik tanulmány szerint azonban a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés a PKD által közvetített hatáson keresztül okozta a sejtek apoptózisát kiváltó JNK kaszkád aktiválódását, vagyis itt a PKD pro-apoptotikus hatást váltott ki [33]. Figyelembe kell venni azonban azt, hogy ezek az eredmények az előbbi esetben nem neuronális, immortalizált sejtvonalakon, utóbbi esetben pedig endoteliális sejteken folytatott vizsgálatokból származnak. Mivel a PKD által szabályozott sejtéletani

.....

<sup>5</sup>Arról természetesen egy riporter konstrukció alkalmazása sem szolgáltat adatot, hogy a vizsgált gátlószert más enzim működését befolyásolja-e – erre az ún. inhibitor profil in vitro tesztekben történő meghatározása alapján következtethetünk.

folyamatok az adott sejtípustól erősen függenek [27], az idegsejtek esetében lehetséges, hogy a PKD aktivációja az oxidatív stressz által aktivált jelátviteli folyamatokban a sejtpusztulást fokozó hatást vált ki.

Ez év elején jelentek meg arról adatok, hogy a PKD az idegsejtekben a HSP27 foszforilálásán keresztül az oxigén- és glükózdeprivációra adott protektív sejtválaszban vesz részt [21]. A PKD a különböző stresszhatásokra adott sejtválaszokban betöltött szerteágazó szerepét vizsgáló tanulmányok fényében ugyanakkor könnyen elfogadható, hogy a különböző stresszhatásokra még azonos sejtípusokban, így az idegsejtekben is eltérő PKD-függő jelátviteli folyamatok aktiválódhatnak.

Mindezen túl fontos azt is megjegyezni, hogy munkatársaim egér primér kortikális, illetve hippokampális idegsejt-tenyészeteken végzett, saját eredményeimtől független kísérleti adatai is alátámasztják a *PKDI-1* általam megfigyelt neuroprotektív hatását (nincs bemutatva). A laboratóriumban mások által elvégzett kísérletekben egy új, kereskedelmi forgalomban is kapható, PKD-specifikusként hirdetett gátlószert, a CID 755673-t (Tocris) is megvizsgálták, hogy a *PKDI-1*, illetve a Gö 6976 gátlószerekhez képest milyen hatást fejt ki. A *PKDI-1* hatásához hasonlóan azt figyelték meg, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés mellett alkalmazott CID 755673 szintén protektív hatással volt az idegsejtekre (nincs bemutatva). Mivel a rendelkezésünkre álló adatok alapján a *PKDI-1* és a CID 755673 gátlószerek más mechanizmuson keresztül gátolják a PKD aktivitását, és az egyéb kinázokra kifejtett, aspecifikus hatásuk is eltérő, feltételezhető, hogy a hasonló neuroprotektív hatás mögött egyformán a PKD aktivitás gátlása állhat.

Egy, a laboratóriumunk által tett érdekes megfigyelés az is, hogy a kortikális neuronok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iránti érzékenysége jóval nagyobb, mint a hippokampális neuronoké. Egy kísérlet adataiból azt az eredményt kaptuk, hogy 100  $\mu$ M-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés kortikális idegsejtekben kb. 50%-os, míg hippokampális idegsejtekben csupán kb. 20%-os sejtpusztulást idézett elő (nincs bemutatva). Ezek alapján joggal feltételezhető, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> által előidézett szignalizációs folyamatok nem feltétlenül zajlanak ugyanolyan módon az eltérő idegsejtípusok esetében sem.

*A PKDI-1 gátlószert a sejtek életképességére nincs hatással, de oxidatív stressz esetén protektív hatást fejt ki*

Kísérleteim során a *PKDI-1* gátlószerral kapott eredményeket többféleképpen is magyarázhatom. A *PKDI-1* PKD aktivitásra kifejtett hatását esetleg egy 'gátlás gátlása' típusú jelenséggel magyarázhatjuk. Ha feltesszük egy olyan hipotetikus foszfatáz létét, amely a

S910-es pozíció defoszforilálására képes, miközben aktivitását a S910-es pozíció autofoszforilálására is képes PKD serkentheti, akkor a gátlószeres kezelés esetén elmaradó, hogy a PKD-függő serkentés hiányában a PKD S910-es pozíción levő autofoszforiláltsági szintje megnövekedhet. Ez a gondolatmenet logikailag úgy is végigvihető, ha az S910 helyet foszforiláló másik, hipotetikus kináz aktivitását a PKD általi foszforiláció – pl. állványfehérjékhez való kikötődésen keresztül [32] – gátolná. Természetesen az sem zárható ki, hogy a *PKDI-1* esetleg más, az S910 hely foszforilációját közvetlenül befolyásoló enzimekre is hathat.

A *PKDI-1* oxidatív stresszel szembeni protektív és a normál körülmények mellett megfigyelhető, NF $\kappa$ B aktivitást növelő hatása között valószínűleg összefüggés van. Utóbbi jelenség magyarázható azzal is, hogy a *PKDI-1* neuroprotektív hatása nem csak és kizárólagosan a PKD gátlásán keresztül érvényesül, hanem a vegyület ismeretlen mellékhatásának következménye. Fontos lenne tisztázni azt is, hogy az inhibitor és a  $H_2O_2$  kezelés együttes alkalmazása milyen hatással van az NF $\kappa$ B aktivitásra.

Nemrégiben elvégzett kísérleteim előzetes eredményei válaszul szolgálhatnak erre a kérdésre. Kísérleteim során a *PKDI-1* gátlószeret időablakokban, azaz három különböző időintervallumban alkalmaztam: a *PKDI-1* gátlószeret vagy csak a 2 órás 'előkezelés' szakasz alatt, vagy csak a  $H_2O_2$  kezelés első 1 órájában, vagy csak a  $H_2O_2$  kezelés 1 óráját követő 23 órában (azaz az életképesség mérés időpontjáig) adtam hozzá az idegsejtenyészetekhez. Eddigi eredményeim azt mutatják, hogy a gátlószer neuroprotektív hatásának kialakításában a 2 órás előkezelés játssza a legnagyobb szerepet. Ezt a hatást magyarázhatjuk azzal, hogy a neuroprotektív hatás a *PKDI-1* nem PKD-ra specifikus hatásának következménye, de azzal is, hogy a *PKDI-1* valamilyen módon - talán éppen az NF $\kappa$ B-út vonal aktiválásán keresztül - felkészíti a sejteket a neurotoxikus hatások kivédésére. Az a tény, hogy a kortikális idegsejtenyészetekben egy másik PKD-ra szelektív gátlószer, a CID 755673 is hasonló neuroprotektív hatást idézett elő, alátámasztja, hogy a PKD aktivitás gátlása és a neuroprotektív hatás összefügghet.

Érdekes megfigyelés volt, hogy ha csak a  $H_2O_2$  kezelés első órájában, vagy csak a  $H_2O_2$  kezelés 1 óráját követő 23 órában adtam hozzá a *PKDI-1* gátlószeret a sejtekhez, az ilyen módon kezelt sejtek életképessége jelentősen lecsökkent a gátlószerrel a kísérlet teljes időtartama alatt, folyamatosan kezelt sejtek életképességéhez képest. Ezt a markáns életképesség-csökkenést különösen a gátlószerrel csupán a  $H_2O_2$  kezelés első órájában kezelt sejtek esetében tapasztaltam. Mindez arra utalhat, hogy az oxidatív stressz során történő PKD

aktiválódás a sejtek túlélését segíti elő, azaz ebben a szakaszban az inhibitor alkalmazása különösen toxikus. Ennek ellenőrzésére azonban további kísérletek elvégzésére van szükség.

*A PKD fehérje mennyisége 60 perces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követően lecsökken: szelektív degradáció vagy kaszpáz-mediálta aktiváció?*

Munkám során azt is megfigyeltem, hogy a detektált PKD mennyisége egy óránál hosszabban fennálló oxidatív stressz esetén fokozatosan csökken. A jelenség megmagyarázására több lehetőség is felmerül. Az első lehetne az, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatására az idegsejtek rövid időn, azaz már 2-4 órán belül elpusztulnak. A sejtek állapotát ugyanakkor a kísérleti idő letelte után mikroszkóp alatt ellenőriztem: ez alapján a 240 perces kezelés néhány esetben már igen, de a 120 perces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés még nem okozott jelentős mértékű pusztulást (nincs bemutatva), ráadásul a mintákban a neuron-specifikus tubulin vázfehérje és a GAPDH relatív szintje is közel állandó maradt. Mindezek alapján ez a lehetséges magyarázat kizárható.

A jelenséget magyarázhatjuk a PKD egy órán túl fennálló oxidatív stressz hatására történő szelektív degradációjával is. Ez lehet pl. ubiquitinálódás, és az azt követő proteolízis következménye. Egy másik lehetőség a kaszpáz-mediálta hasítás, amely a PKD aktiválásának egyik alternatív útja. In vitro adatok alapján a PKD apoptózist indukáló kezelés hatására kaszpáz-mediálta módon két 59, illetve 62 kDa-os, aktív C-terminális fragmentumra bomlik [26]. Eddigi kísérleteim során az össz-PKD szint csökkenésével párhuzamosan nem sikerült ezen fragmentumok mennyiségének megnövekedését Western Blottal detektálnom. Ez önmagában azonban még nem zárja ki a fragmentumok jelenlétét, ugyanis az általam használt poliklonális PKD elleni ellenanyag nem feltétlenül képes a kaszpáz által elhasított fragmentumok kimutatására. A kaszpáz-mediálta hasítás lehetőségének körülményéhez aktivált kaszpáz elleni ellenanyaggal történő detekció, illetve kaszpáz inhibitorok alkalmazását is tervezem. Az mindenesetre biztos, hogy a PKD jel eltűnésének jelenségére a PKD gátlószerek nincsenek hatással.

*A további kísérletek iránya*

Fontos megjegyezni azt is, hogy kísérleteim során különböző időléptéket alkalmaztam: a PKD foszforilációját 10 és 240 perces kezelési idő között vizsgáltam, a PKDI-1 hatására történt NFκB aktivitás-növekedést 6 óra után figyeltem meg, az inhibitor életképességet növelő hatását pedig 24 óra után mértem. Bár ezek a tesztek szükségszerűen más időléptéket



igényelnek, nem zárhatjuk ki, hogy a PKD a neurotoxikus hatás időtartamától függően fejt ki protektív vagy éppen degeneratív hatást.

A következőkben a PKD aktivitás más molekuláris biológiai módszerekkel történő modulálásával (géncsendesítéssel vagy különböző mutáns PKD formák expresszáltatásával) <sup>6</sup>, a lehetséges upstream útvonalak szelektív gátlásával (pl. kaspáz- vagy Abl/src inhibitor kezeléssel), illetve további, a sejteket a *PKDI-1* inhibitorral időablakokban kezelő kísérletek segítségével szeretném tisztázni, hogy a neurodegeneratív folyamatok során a PKD hogyan aktiválódik és aktivitás-fokozódása milyen szerepet tölt be."

---

<sup>6</sup>"Az idegsejtekben történő alkalmazás esetén mindkét módszernek komoly technikai korlátai vannak. A Stetler és munkatársai tanulmányában (2012) alkalmazott géncsendesítési technika pl. adeno-/lentivirális transzfekción alapult, amelyre az idegsejtek rendkívül érzékenyek, emellett kivitelezése technikailag sem egyszerű. A liposzómás oligofekción alapuló géncsendesítés eddigi próbálkozásaink során csak maximum 30 %-os PKD-szint csökkenést okozott (Schlett K, Szórádi T. megfigyelései), ami a kináz funkció eliminálásához messze nem elegendő. Bármilyen mutáns PKD forma kifejeztetését alkalmazó kísérlet esetében pedig az adott fehérje túlexpresszáltatásáról lenne szó. Az ilyen rendszereken végzett kísérletekből kapott eredményeket szükségszerűen fenntartásokkal kell fogadni.

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

A kísérleti módszerek megtanításáért, és az ELTE Élettani és Neurobiológiai Tanszékén, illetve a Stuttgarti Egyetemen folytatott munkám során folyamatosan nyújtott segítségükért, tanácsaikért és támogatásukért köszönettel tartozom témavezetőmnek, Schlett Katalinnak és Tárnok Krisztiánnak. Köszönettel tartozom továbbá Angelika Haussernek és munkatársainak a plazmidkonstrukciók biztosításáért és az NFκB riporter-esszé beállításában nyújtott segítségükért, illetve Vántus Tibornak és munkatársainak az újonnan kifejlesztett PKD gátlószer biztosításáért. Köszönöm Angelika Haussernek és munkatársainak, hogy a Stuttgarti Egyetemhez tartozó laboratóriumukban dolgozhattam, valamint Schlett Katalinnak és Tárnok Krisztiánnak, hogy erre a lehetőséget megteremtették.

A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával a TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 azonosító számú "Nemzeti Kiválóság Program - Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program" című kiemelt projekt keretei között valósult meg.

## IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Arundine M., Tymianski M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34(4-5):325–37.
- [2] Besirli C. G., Johnson E. M. (2006) The activation loop phosphorylation of protein kinase D is an early marker of neuronal DNA damage. *J Neurochem.*, 99(1):218-25.
- [3] Cowell C. F., Döppler H., Yan I. K., Hausser A., Umezawa Y., Storz P. (2009) Mitochondrial diacylglycerol initiates protein-kinase D1-mediated ROS signaling. *J Cell Sci.*, 122(Pt 7):919-28.
- [4] Czöndör K., Ellwanger K., Fuchs Y. F., Lutz S., Gulyás M., Mansuy I. M., Hausser A., Pfizenmaier K., Schlett K. (2009) Protein kinase D controls the integrity of Golgi apparatus and the maintenance of dendritic arborization in hippocampal neurons. *Mol Biol Cell.*, 20(7):2108-20.
- [5] Ellwanger K., Pfizenmaier K., Lutz S., Hausser A. (2008) Expression patterns of protein kinase D 3 during mouse development. *BMC Dev Biol.*, 25:8:47.
- [6] Facecchia K., Fochesato L. A., Ray S. D., Stohs S. J., Pandey S. (2011) Oxidative toxicity in neurodegenerative diseases: role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies. *J Toxicol.*, 2011:683728.
- [7] Hausser A., Link G., Bamberg L., Burzlaff A., Lutz S., Pfizenmaier K., Johannes F. J. (2002) Structural requirements for localization and activation of protein kinase C mu (PKC mu) at the Golgi compartment. *J Cell Biol.*, 156(1):65-74.
- [8] Jeohn G. H., Wilson B., Wetsel W. C., Hong J. S. (2000) The indolocarbazole Gö6976 protects neurons from lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced cytotoxicity in murine neuron/glia co-cultures. *Brain Res Mol Brain Res.*, 79(1-2):32-44.
- [9] LaValle C. R., George K. M., Sharlow E. R., Lazo J. S., Wipf P., Wang Q. J. (2010) Protein kinase D as a potential new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.*, 1806(2): 183-92.
- [10] Matthews S. A., Rozengurt E., Cantrell D. (1999) Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase Cmu. *J Biol Chem.*, 274(37):26543-9.
- [11] Matthews S. A., Iglesias T., Rozengurt E., Cantrell D. (2000) Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD). *EMBO J.*, 19(12):2935-45.
- [12] Oster H., Abraham D., Leitges M. (2006) Expression of the protein kinase D (PKD) family during mouse embryogenesis. *Gene Expr Patterns.*, 6(4):400-8.
- [13] Peters R. T., Maniatis T. (2001) A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases. *Biochim Biophys Acta.*, 1471(2):M57-62.
- [14] Rey O., Reeve J. R. Jr., Zhukova E., Sinnett-Smith J., Rozengurt E. (2004) Protein-coupled Receptor-mediated Phosphorylation of the Activation Loop of Protein Kinase D. *J Biol Chem.*, 279(33):34361-72.
- [15] Rybin V. O., Guo J., Steinberg S. F. (2009) Protein kinase D1 autophosphorylation via distinct mechanisms at Ser744/Ser748 and Ser916. *J Biol Chem.*, 284(4):2332-43.
- [16] Sánchez-Ruiloba L., Cabrera-Poch N., Rodríguez-Martínez M., López-Menéndez C., Jean-Mairet R. M., Higuero A. M., Iglesias I. (2006) Protein kinase D intracellular localization and activity control kinase D-interacting substrate of 220-kDa traffic through a

- postsynaptic density-95/discs large/zonula occludens-1-binding motif. *J Biol Chem.*, 281(27):18888-900.
- [17] Santos M. S., Moreno A. J., Carvalho A. P. (1996) Relationships between ATP depletion, membrane potential, and the release of neurotransmitters in rat nerve terminals. An in vitro study under conditions that mimic anoxia, hypoglycemia, and ischemia. *Stroke.*, 27(5):941-50.
- [18] Song J., Li J., Qiao J., Jain S., Mark Evers B., Chung D. H. (2009) PKD prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via NF- $\kappa$ B and p38 MAPK in RIE-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 378(3):610-4.
- [19] Song M. J., Wang Y. Q., Wu G. C. (2007) Lipopolysaccharide-induced protein kinase D activation mediated by interleukin-1beta and protein kinase C. *Brain Res.*, 1145:19-27.
- [20] Steinberg S. F. (2012) Regulation of protein kinase D1 activity. *Mol Pharmacol.*, 81(3):284-91.
- [21] Stetler R. A., Gao Y., Zhang L., Weng Z., Zhang F., Hu X., Wang S., Vosler P., Cao G., Sun D., Graham S. H., Chen J. (2012) Phosphorylation of HSP27 by protein kinase D is essential for mediating neuroprotection against ischemic neuronal injury. *J Neurosci.*, 32(8):2667-82.
- [22] Storz P., Döppler H., Toker A. (2004) Protein Kinase C  $\delta$  Selectively Regulates Protein Kinase D-Dependent Activation of NF- $\kappa$ B in Oxidative Stress Signaling. *Mol Cell Biol.*, 24(7):2614-26.
- [23] Storz P., Döppler H., Toker A. (2005) Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell Biol.*, 25(19):8520-30.
- [24] Storz P., Toker A. (2003) Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. *EMBO J.*, 22(1):109-20.
- [25] Tárnok K., Szilágyi L., Berki T., Németh P., Gráf L., Schlett K. (2010) Anoxia leads to a rapid translocation of human trypsinogen 4 to the plasma membrane of cultured astrocytes. *J Neurochem.*, 115(2):314-24.
- [26] Vántus T., Vertommen D., Saelens X., Rykx A., De Kimpe L., Vancauwenbergh s., Mikhalap S., Waelkens E., Kéri G., Seufferlein T., Vandenabeele P., Rider M. H., Vandenheede J. R., Van Lint J. (2004) Doxorubicin-induced activation of protein kinase D1 through caspase-mediated proteolytic cleavage: identification of two cleavage sites by microsequencing. *Cell Signal.*, 16(6):703-9.
- [27] Van Lint J., Rykx A., Maeda Y., Vantus T., Sturany S., Malhotra V., Vandenheede J. R., Seufferlein T. (2002) Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol.*, 12(4):193-200.
- [28] Vertommen D., Rider M., Ni Y., Waelkens E., Merlevede W., Vandenheede J. R., Van Lint J. (2000) Regulation of protein kinase D by multisite phosphorylation. Identification of phosphorylation sites by mass spectrometry and characterization by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.*, 275(26):19567-76.
- [29] Wang, Q. J. (2006) PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci.*, 27(6):317-23.
- [30] Won S. J., Kim D. Y., Gwag B. J. (2002) Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol.*, 35(1):67-86.
- [31] Yin D. M., Huang Y. H., Zhu Y. B., Wang Y. (2008) Both the establishment and maintenance of neuronal polarity require the activity of protein kinase D in the Golgi apparatus. *J Neurosci.*, 28(35):8832-43.

- [32] Ziegler S., Eiseler T., Scholz R. P., Beck A., Link G., Hausser A. (2011) A novel protein kinase D phosphorylation site in the tumor suppressor Rab interactor 1 is critical for coordination of cell migration. *Mol Biol Cell.*, 22(5):570-80.!
- [33] Zhang W., Zheng S., Storz P., Min W. (2005) Protein kinase D specifically mediates apoptosis signal-regulating kinase 1-JNK signaling induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> but not tumor necrosis factor. *J Biol Chem.*, 280(19):19036-44.!
- [34] Bazan N. G., Tu B., Rodriguez de Turco E. B. (2002) What synaptic lipid signaling tells us about seizure-induced damage and epileptogenesis. *Prog Brain Res.*, 135:175-85.!
- [35] Temes E., Martín-Puig S., Aragonés J., Jones D. R., Olmos G., Mérida I., Lnadázuri M. O. (2004) Role of diacylglycerol induced by hypoxia in the regulation of HIF-1alpha activity. *Biochem Biophys Res Commun.*, 315(1):44-50.!
- [36] Eisler S. A., Fuchs Y. F., Pfizenmaier K., Hausser A. (2012) G-PKDrep-live, a genetically encoded FRET reporter to measure PKD activity at the trans-Golgi-network. *Biotechnol J.*, 7(1):148-54.