

# A protein kináz D által irányított, protektív funkciók vizsgálata neurodegeneráció során

OTKA zárójelentés, 2010 – 2015

## Összefoglalás

Az OTKA által támogatott kutatásaink során a protein kináz D (PKD) idegsejtekben betöltött szabályozó szerepét elemeztük. Kísérleteink célkeresztjében egyrészt a PKD neuroprotektív hatásmechanizmusának, másrészt az idegsejtek plaszticitási, adaptív tanulási folyamatainak háttérében álló, PKD-függő folyamatok felderítése állt.

A PKD idegsejtekben betöltött fontos szerepét jelzi, hogy aktivitásának gátlása az in vivo agyszövetben és az in vitro sejtenyészetekben is neurodegeneratív elváltozásokat és memória-problémákat okoz. A dendrittüskékben zajló, a neuronális plaszticitás háttérében álló folyamatok közül az aktin vázrendszer átrendeződése és a sejtfelszíni AMPA receptorok körforgásának szabályozása során is bizonyítottuk a PKD szerepét.

A neurodegeneratív folyamatok és a PKD aktivitás közötti összefüggések tisztázása érdekében a neurodegeneratív sérüléseket modellező tesztrendszereket (oxidatív stressz, excitotoxicitás, hipoxia/anoxia) alakítottunk ki embrionális egér idegsejtenyészetekben. Megmutattuk, hogy a toxikus stimulusok az endogén PKD aktivitást fokozzák. Bizonyítottuk, hogy az oxidatív stressz alatt a PKD funkciók neuroprotektív hatást közvetítenek, ami az NFkB útvonal egyes elemeinek aktivációjával jár együtt. Meglepő eredményünk, hogy oxidatív stressz hatására idegsejtekben az NFkB jelátviteli útvonal nem a nem-neurális sejtekben leírt módon aktiválódik. Megmutattuk, hogy az idegsejtekben az oxidatív stressz az autofágia mértékét fokozza, amiben a PKD-n keresztüli szabályozó folyamatok is szerepet játszhatnak. Bizonyítottuk, hogy az autofágiát serkentő MTMR14/Jumpy foszfatáz inhibitorok az oxidatív stressz által kiváltott sejtválaszokban neuroprotektív hatásúak, így a klinikumban akár terápiás szerként is alkalmazhatóak lehetnek. Erős neuroprotektív hatást tapasztaltunk egyes új fejlesztésű kis molekulájú kináz inhibitorok esetén is, ezek specificitásának és hatásmechanizmusának feltárása azonban még nem fejeződött be.

Eredményeink alapján a Ser/Thr kinázok közé tartozó PKD család tagjai az idegsejtekben is szerteágazó szabályozó szerepet töltenek be. A kutatási időszak alatt elsősorban alapkutatási eredményeink születtek, de a neuroprotektív szerek azonosítása akár távlati terápiás jelentőségű is lehet.

## Tartalomjegyzék

<b>ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>1</b>
<b>TARTALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>2</b>
<b>1. AZ ENDOGÉN PKD AKTIVITÁS GÁTLÁSÁNAK HATÁSA TRANZGENIKUS EGEREK HIPPOKAMPUSZÁBAN .....</b>	<b>4</b>
1.1. A DOMINÁNS-NEGATÍV HATÁSÚ, INAKTÍV PKD MUTÁNS (KDPKD) JELENLÉTE A HIPPOKAMPUSZBAN ZAJLÓ TÉRBELI MEMÓRIA RÖGZÍTÉSÉT GÁTOLJA .....	4
1.2. AZ ENDOGÉN PKD AKTIVITÁS GÁTLÁSA AZ IDEGSEJTEKBE STRUKTURÁLIS VÁLTOZÁSOKAT INDÍT EL .....	4
1.2.1. A domináns-negatív hatású PKD mutáns termelése a piramissejtek dendritfájának és dendrittüskéinek zsugorodását váltja ki .....	4
1.2.2. A domináns-negatív hatású PKD túltermelése a neuronális Golgi készülék ciszternáinak tágulásához és ún. lipofuscin granulomok felhalmozódásához vezet, a mutáns PKD forma gyakran a mitokondriumok külső membránjához asszociálódik.....	6
<b>2. AZ ENDOGÉN PKD AKTIVITÁS SZEREPE A NEURONÁLIS PLASZTICITÁS ALATT .....</b>	<b>6</b>
2.1. AZ ENDOGÉN PKD AKTIVITÁS GÁTLÁSA A HIPPOKAMPUSZBAN KIVÁLTHATÓ LTP (LONG TERM POTENTIATION) MÉRTÉKÉT CSÖKKENTI .....	6
2.2. A PKD AKTIVITÁS HATÁSA A DENDRITTÜSKÉKBEN .....	7
2.2.1. A PKD aktivitás a dendrittüskék mozgását stabilizálja.....	7
2.2.2. Tenyésztett idegsejtek dendrittüskéiben a PKD aktivitása a dendrittüskék megnagyobbodásához vezető, plasztikus folyamatok alatt fokozódik.....	7
2.2.3. A kémiai kiváltott tüskefej-megnagyobbodás hátterében az aktin turnover PKD-függő megváltozása áll ....	8
2.2.4. A PKD aktivitás gátlása a dendrittüskék fejének kiszélesedését és annak stabilizációját megakadályozza .....	8
2.3. A PKD AKTIVITÁS HATÁSA A SEJTFELSZÍNI RECEPTOROK KÖRFORGÁSÁRA .....	10
2.3.1. A protein kináz D a transzferrin receptor endocitózisát fokozza.....	10
2.3.2. A protein kináz D a sejtfelszíni AMPA receptorok mennyiségét és körforgását is szabályozza .....	11
<b>3. AZ ENDOGÉN PKD AKTIVITÁS SZEREPÉNEK TISZTÁZÁSA A NEURODEGENERÁCIÓS FOLYAMATOKBAN .....</b>	<b>12</b>
3.1. A NEURODEGENERATÍV SÉRÜLÉSEK MODELLEZÉSE IDEGSEJT-TENYÉSZETEKBE: AZ OXIDATÍV STRESSZ, AZ EXCITOTOXICITÁS ÉS A HIPOXIA/ANOXIA HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A TENYÉSZETEK ÉLETKEPESÉRE .....	12
3.2. AZ ENDOGÉN PKD AKTIVITÁS VÁLTOZÁSA NEUROTOXICITÁSI MODELLEKBEN: AZ S910 AUTOFOSZFORILÁCIÓ VIZSGÁLATA ....	12
3.3. AZ ENDOGÉN PKD AKTIVITÁSÁT AZ OXIDATÍV STRESSZ FOKOZZA .....	13
3.3.1. Az oxidatív stressz során aktiválódó endogén PKD detektálása riporter konstrukciókkal .....	13
3.3.2. Oxidatív stressz hatására a PKD mind a citoplazmában, mind a magban aktiválódik .....	14
3.4. A PKD-T GÁTLÓ, KISMOLEKULÁS INHIBITOROK HATÁSA AZ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -KEZELÉSSEL KIVÁLTOTT SEJTPUSZTULÁSRA.....	14
3.4.1. Az új fejlesztésű, kismolekulájú PKD inhibitorok az oxidatív stressz alatt neuroprotektív hatást fejtenek ki .....	14
3.4.2. Az új fejlesztésű, kismolekulájú PKD inhibitor az idegsejtekben fokozza az NFκB aktivitást.....	15
3.4.3. A PKD-specifikus inhibitor kbNB 142-70 az oxidatív stresszre bekövetkező sejtpusztulást fokozza .....	16
3.5. AZ OXIDATÍV STRESSZ IDEGSEJTEKBE A KANONIKUS NFκB ÚTVONALAT AKTIVÁLJA, DE AZ NFκB NUKLEÁRIS TRANZLOKÁCIÓJÁT NEM VÁLTJA KI .....	16
3.5.1. A nem kanonikus NFκB út vonal főbb elemei (RelB, p100) az idegsejtenyészetekben nem expresszálódnak ....	16
3.5.2. Az oxidatív stressz a kanonikus NFκB út vonalban az IKKα és az NFκB/p65 foszforilációját fokozza, de az IκBα degradációját nem váltja ki.....	17
3.5.3. Az NFκB/p65 mennyisége a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -dal kezelt idegsejtekben megnő, de a foszforilált NFκB a sejtmagban nem detektálható.....	17
3.5.4. Az NFκB/p65 nukleáris transzlokációját az H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -dal kezelt idegsejtekben nem tudtuk kimutatni.....	17
3.6. AZ ENDOGÉN PKD AKTIVITÁS GÁTLÁSA AZ IKKα ÉS AZ NFκB/p65 OXIDATÍV STRESSZEL KIVÁLTOTT FOSZFORILÁCIÓJÁNAK MÉRTÉKÉT CSÖKKENTI, DE AZ NFκB NUKLEÁRIS TRANZLOKÁCIÓJÁT NEM BEFOLYÁSOLJA .....	18
<b>4. AZ AUTOFÁGIA ÉS A PKD AKTIVITÁS KÖZÖTTI KAPCSOLAT VIZSGÁLATA AZ ATG8/LC3B FEHÉRJÉN KERESZTÜL.....</b>	<b>19</b>
4.1. PKD MUTÁNS DROSOPHILA-TÖRZSEK VIZSGÁLATA.....	19
4.2. AZ ENDOGÉN PKD AKTIVITÁS HATÁSA EMLŐS IDEGSEJTEK LC3B-II SZINTJÉRE .....	20
<b>5. AZ AUTOFÁGIA ÉS AZ OXIDATÍV STRESSZ KÖZÖTTI KAPCSOLAT VIZSGÁLATA.....</b>	<b>20</b>
5.1. AZ OXIDATÍV STRESSZ SORÁN AZ AUTOFÁGIÁS FLUX FOKOZÓDIK.....	21
5.2. AZ MTMR14/JUMPY FOSZFATÁZ INHIBITOROK AZ AUTOFÁGIÁT INDUKÁLJÁK .....	21
5.2.1. A HeLa sejtekben normálisan alacsony szintű autofágiát az AUTEN-67 és az AUTEN-99 jelentősen fokozza....	21
5.2.2. Az idegsejtekben normál körülmények mellett is igen aktív autofágia folyik, amit az AUTEN-67 és AUTEN-99 tovább fokoz.....	21
5.3. AZ MTMR14/JUMPY FOSZFATÁZ INHIBITOROK A KEZELETLEN SEJTEK ÉLETKEPESÉGET EGY HATÁRIG NÖVELIK, EZEN FELÜL VISZONT TOXIKUSAK.....	22
5.4. AZ MTMR14/JUMPY FOSZFATÁZ INHIBITOROK AZ OXIDATÍV STRESSZ SORÁN NEUROPROTEKTÍV HATÁSÚAK .....	22
5.4.1. Az AUTEN-67 és az AUTEN-99 a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kezelés hatására megemelkedő autofágia mértékét az idegsejtekben fokozza.....	22
5.4.2. Az AUTEN-67 és az AUTEN-99 az idegsejtekben az oxidatív stressz következményében kialakuló sejtpusztulást csökkentik .....	23

<b>HIVATKOZÁSOK.....</b>	<b>24</b>
<b>A KUTATÁSI TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK .....</b>	<b>25</b>
MEGJELENT / ELFOGADOTT KÖZLEMÉNYEK .....	25
BENYÚJTOTT / KÉSZÜLŐ KÖZLEMÉNYEK.....	25
KONFERENCIA RÉSZVÉTELEK.....	25
PHD DOLGOZATOK .....	26
MSC DOLGOZATOK .....	26
HALLGATÓI SZAKMAI VERSENYEK, EREDMÉNYEK .....	27
DÍJAK/ELISMERÉSEK .....	27

## 1. Az endogén PKD aktivitás gátlásának hatása transzgenikus egerek hippocampuszában

### 1.1. A domináns-negatív hatású, inaktív PKD mutáns (kdPKD) jelenléte a hippocampusban zajló térbeli memória rögzítését gátolja

A protein kináz D (PKD) enzimesalád tagjai igen szerteágazó szerepet töltenek be a szövetekben (pl. szekréciós aktivitás, migráció, adhézis kapcsolatok kialakításának szabályozása, hámsejtekben az intracelluláris transzportfolyamatok vagy a tumor progresszió regulálása, stb.), így a PKD aktivitás szisztémás gátlása igen komoly mellékhatásokkal járna. Az idegrendszeri hatások ellenőrzésére ezért egy olyan transzgenikus állatmodellt használtunk, amelyben a PKD1 fehérje domináns-negatív, kináz aktivitásában gátolt pontmutánsát<sup>1</sup> a TetOn rendszer segítségével, doxiciklin-etetéssel indukálhatóan és előagy-specifikusan tudjuk termeltetni (**1. ábra**; CamKII $\alpha$ -rtTA2 x kdPKD-EGFP kettős transzgen egértörzs; Czöndör és mtsai., 2009 és Bencsik és mtsai., 2015). A konstrukció előnye, hogy a mutáns PKD fehérje EGFP-vel fuzionált, így jelenléte és lokalizációja a fluoreszcencia alapján vagy anti-GFP immunfestést követően fény- és elektronmikroszkóppal is azonosítható (ld. **1. és 5. ábrák**).

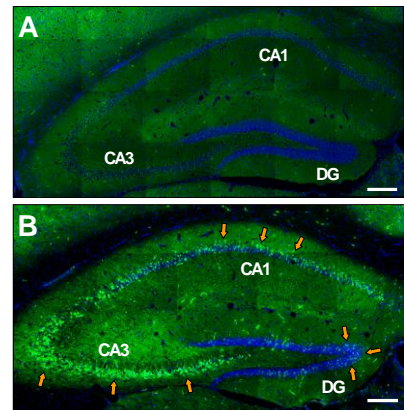
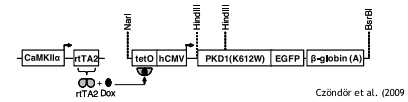
Tartós, 4 hetet meghaladó doxiciklin etetést követően az EGFP fluoreszcenciát mutató, kdPKD-EGFP-t termelő idegsejtek az agyszövetben egyértelműen azonosíthatóak voltak. Az expresszió elsősorban a hippocampusz piramisisejtjeire lokalizálódott, a neocortex egyéb területein csak sporadikus expressziót tapasztaltunk (**1.B ábra**). Kontrollként olyan doxiciklinel etetett alom-testvéreket használtunk, amelyek a mutáns PKD-t kódoló konstrukciót nem, hanem csak a transzaktivátort termelték (CamKII $\alpha$ -rtTA2 egyszeres transzgen egértörzs; **1.A ábra**).

Az endogén PKD funkciók gátlása az egerek hippocampusz-függő térbeli tanulási képességét jelentősen rontotta (Morris-féle vízi labirintus és 8 karú sugárlabirintusban elvégzett vizsgálatok) és csökkent a hippocampuszban kiváltható LTP mértéke is (Bencsik és mtsai., 2015; **2. ábra A-F**). Mindez azt jelzi, hogy a PKD enzimesalád által irányított sejtbiológiai folyamatok az idegsejtek funkcionális működéséhez és a memória rögzítéséhez is szükségesek (ld. részletesebben a 2. pont alatt).

### 1.2. Az endogén PKD aktivitás gátlása az idegsejtekben strukturális változásokat indít el

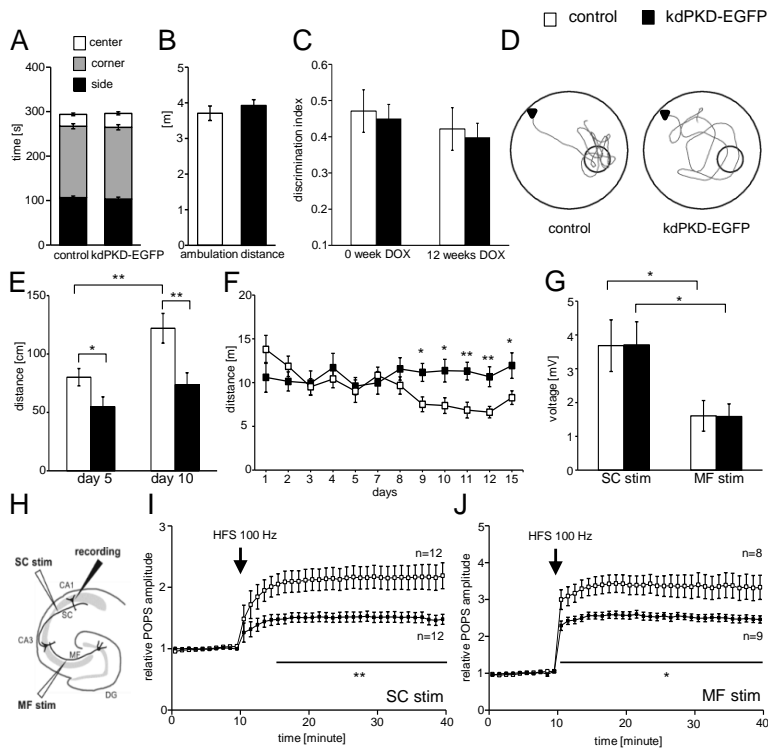
#### 1.2.1. A domináns-negatív hatású PKD mutáns termelése a piramisisejtek dendritfájának és dendrittüskéinek zsugorodását váltja ki

A legerősebb kdPKD-EGFP kifejeződést a doxiciklinel kezelt állatok hippocampuszában CA1 és CA3 piramisisejtjeiben tapasztaltuk (ld. **1. ábra**). Fénymikroszkópos metszeteken kimutattuk, hogy a piramisisejtek dendritfájának kiterjedése mind a CA1 str. radiatum, mind a CA3 str. oriens és lucidum rétegekben csökken (**3. ábra**). A CA1 str. radiatum és a CA3 str. lucidum területén elektronmikroszkópos elemzéseket is végeztünk, ahol a kdPKD-EGFP fúziós fehérje jelenlétét anti-GFP preembedding immunhisztokémiával, Ni-DAB vagy arany szemcsés jelöléssel azonosítottuk. Eredményeink szerint a mutáns PKD-t termelő dendrittüskék területe szignifikánsan lecsökkent, keresztmetszeti profiljuk pedig hosszúkásabbá vált (**4. ábra**). Mindez arra utal, hogy az endogén PKD aktivitás gátlása az idegsejtek morfológiai változását váltja ki.

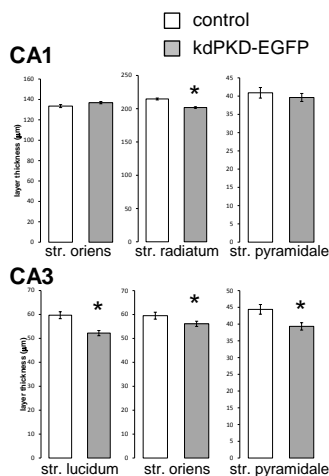


**1. ábra.** EGFP-vel fuzionált, domináns-negatív PKDK512W pontmutáns (kdPKD) indukálható és előagy-specifikus termeltetése transzgenikus egerekben. A mutáns fehérje az EGFP jel alapján azonosítható. 6 hétig doxiciklinel etetett CamKII $\alpha$ -rtTA2 (**A**) és CamKII $\alpha$ -rtTA2xkdPKD-EGFP (**B**) állatok hippocampusza. Mércse: 200  $\mu$ m.

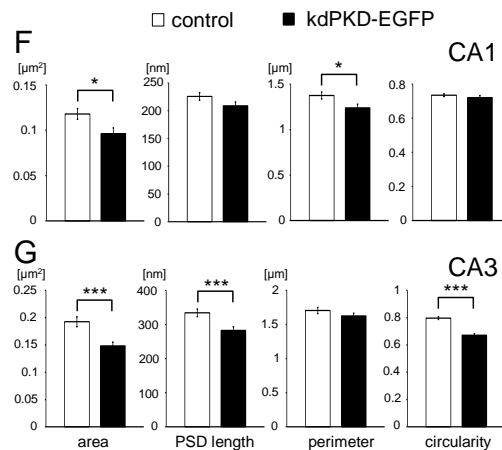
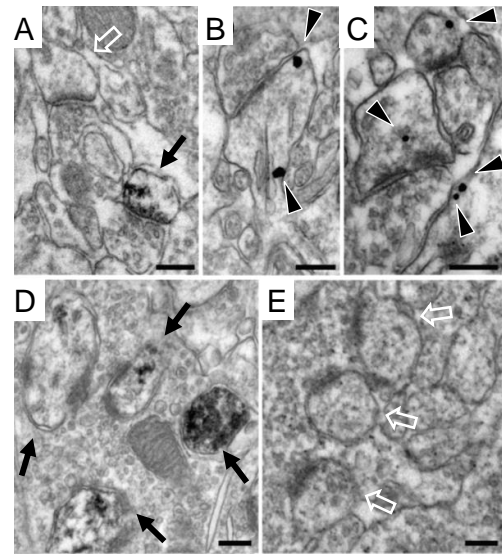
<sup>1</sup> A PKD1<sup>K512W</sup> mutáció az ATPáz aktivitást megszünteti, így a kináz funkció kiesik, de a szubsztrát kötés megmarad – így a mutáns forma túlermelletése domináns-negatív fenotípus kialakulásához vezet. Előzetes eredményeink alapján a domináns-negatív hatás mindhárom endogén PKD izoforma felett érvényesül (Hausser és mtsai., 2005 és Czöndör és mtsai., 2009)



**2. ábra.** Viselkedési és elektrofiziológiai vizsgálatok doxiciklinnel kezelt egyszeres (control) és kétszeresen transzgén (kdPKD-EGFP) egerekben. **A-B:** open field teszt; **C:** új tárgy felismerési teszt; **D-E:** Morris-féle vízi labirintus teszt; **F:** 8 karú sugárlabirintus teszt. **G-J:** hippocampális LTP kiváltása a Schaffer kollaterálisok (SC) vagy a moharostok (MF) ingerlésével. ld. részletesebben Bencsik és mtsai., 2015.



**3. ábra.** A hippocampusz CA1 és CA3 területén mért rétegvastagságok 6 hetes doxiciklin kezelést követően.



**4. ábra.** Elektronmikroszkópos felvételek kontroll (E) és kdPKD-EGFP-t termelő (A-D) állatok hippocampuszának CA1 (A-C) és CA3 (D-E) régiójából. A sötét nyilak az anti-EGFP Ni-DAB, illetve immunarany jelölésekre mutatnak a dendrittűskékben. Mércé: 200 nm. **F, G:** A dendrittűskék átlagos területe, PSD hosszúsága, kerülete és cirkularitása a CA1 (F) és a CA3 (G) régióban. ld. Bencsik és mtsai., 2015.

### 1.2.2. A domináns-negatív hatású PKD túltermelése a neuronális Golgi készülék ciszternáinak tágulásához és ún. lipofuscin granulumok felhalmozódásához vezet, a mutáns PKD forma gyakran a mitokondriumok külső membránjához asszociálódik

A kdPKD-t termelő neuronális sejtekben a Ni-DAB csapadék felhalmozódása alapján a kdPKD fehérje igen gyakran a Golgi készülék vagy a mitokondriális külső membrán közvetlen közelében halmozódott fel (5. ábra). Ezekben a sejtekben igen gyakran találtunk aberráns, kitégült Golgi ciszternákat és felhalmozódott lipofuscin granulumokat is, amelyekhez a kdPKD fehérje szintén asszociálódott (5. ábra E). Ezek a morfológiai elváltozások elsősorban az öregedés vagy az oxidatív stressz során alakulnak ki (Castro-Chavira és mtsai., 2015), így pályázatunk során a PKD aktivitás neuronális plaszticitásban betöltött szerepe mellett (ld. 2. fejezet) a neurodegeneratív folyamatok során betöltött funkcióját is vizsgáltuk (ld. részletesebben a 3. fejezetben).

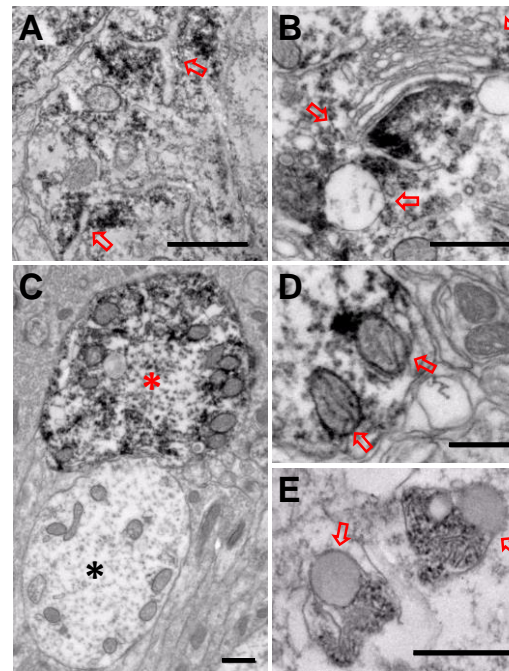
## 2. Az endogén PKD aktivitás szerepe a neuronális plaszticitás alatt

Neuronális plaszticitás alatt az idegsejteket érő környezeti ingerekre, szinaptikus bemenetekre adott adaptív választ értjük, amely magában foglalhat morfológiai változásokat (pl. a nyúlványok hossznövekedése és elágazása, szinapszisok kialakulása vagy eltűnése), a génexpresszió és/vagy fehérjeszintézis megváltozását (pl. transzkripciós faktorok hatása, átalakuló proteom), az intracelluláris transzportútvonalak befolyásolását vagy poszttranszlációs szabályozást is. Mindezek hatására az idegsejtek közötti kapcsolatok erőssége is megváltozik és így a hálózati működés is adaptívan módosul. Ezen szabályozó folyamatok megértése napjainkban is a neurobiológiai kutatások kerestüzeiben áll.

### 2.1. Az endogén PKD aktivitás gátlása a hippocampusban kiváltható LTP (long term potentiation) mértékét csökkenti

A memóriarögzítés egyik morfológiai alapeleme a dendrittüskék plaszticitás-függő alakváltozása. A serkentő bemenetek nagy többsége ezeken a kis méretű, aktin-gazdag dendrit-kitüremkedéseken végződik. A szinaptikus aktivitás függvényében a dendrittüskék száma, mérete és alakja is változik – általánosan elfogadott elképzelés, hogy a tüskék fejének kiszélesedése a posztzinaptikus denzitás (PSD) kiterjedéséhez, így a neurotranszmitter receptorok számának növekedéséhez vezet, ami hatékonyabb szinaptikus transzmissziót eredményez. Ilyen morfológiai és strukturális változások kísérik pl. az LTP (long term potentiation, azaz a szinaptikus hatékonyság hosszú távú növekedése) jelenségét is.

A kdPKD-t termelő hippocampális idegsejtekben a kiváltható LTP mértéke szignifikánsan lecsökkent (2. ábra H-J), ami jól magyarázza az állatok hippocampusz-függő tanulási képességének sérülését is. A kisebb mértékű LTP alapján az is feltételezhető, hogy az endogén PKD aktivitásra a dendrittüskék plasztikus átalakulása során is szükség van. Kutatási pályázatunk során sikerült mechanisztikusan is bizonyítani, hogy a neuronális plaszticitási folyamatok alatt az endogén PKD aktivitás a dendrittüskékben zajló aktin-rendszer stabilizációját segíti elő (ld. alább).



5. ábra. A kdPKD-EGFP felhalmozódást jelző Ni-DAB csapadék a Golgi készülék ciszternái (A, B), a mitokondriumok felszínén (C, D) és a lipofuscin granulumok (E) mellett is kimutatható volt. Mércé: 500 nm. A piros nyilak a kitégült Golgi ciszternákat (A, B), a kdPKD-vel jelölt mitokondriumokat (D) és a lipidcseppeket (E) jelzik. A mozaikos expresszió miatt a képeken kdPKD-EGFP-t termelő (piros csillag) és kontroll dendrit (fekete csillag) is láthatóak (C).

## 2.2. A PKD aktivitás hatása a dendrittűskékben

### 2.2.1. A PKD aktivitás a dendrittűskék mozgását stabilizálja

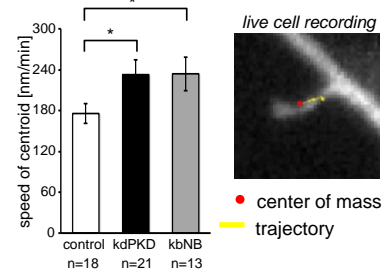
A dendritikus filopódiumok a dendritágakon átmenetileg kialakuló, gyors mozgású protrúziók, amelyek a megfelelő preszinaptikus partner megtalálását követően stabilizálódhatnak és dendrittűskékké alakulhatnak. Ezen átmeneti struktúrák mozgékonyágát és motilitását a belső aktin váz dinamikus átalakulása és stabilitása alapvetően meghatározza.

Ezek a struktúrák igen kicsik (ált. hosszuk 1-2  $\mu\text{m}$ , szélességük 1  $\mu\text{m}$  alatt van), így a hagyományos fénymikroszkópos technikákkal méretük és annak változása pontosan nem követhető. Laboratóriumunkban ezért egy olyan képfeldolgozó algoritmust fejlesztettünk ki, amely segítségével a fluoreszcens markert termelő, élő idegsejtek dendritfájáról készített mikroszkópos felvételsorozatokon a filopódiumok mozgását mérni tudjuk (Tárnok és mtsai., 2015; **6. ábra**). A módszer lényege, hogy az egyedi pixelek súlyozott intenzitásértékei alapján az egyes filopódiumok ún. súlyozott súlypont [weighted centre of mass] pozícióját képkockánként kiszámítja. Így ahelyett, hogy a protrúziók pontos méretét vagy területét definiálnánk, a virtuális súlypont értékekkel kell csak dolgoznunk, ami a manuális elemzések sebességéhez képest nagyságrendekkel gyorsabb kiértékelést tesz lehetővé.

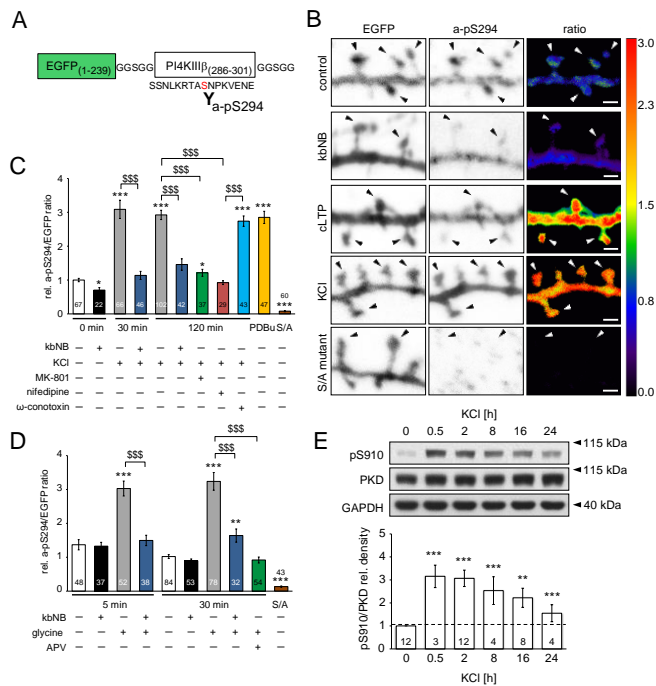
A tenyésztett idegsejtek endogén PKD aktivitását kétféle módon is gátoltuk: egyrészt a domináns-negatív kdPKD mutáns transzfeccióval túltermeltettük, másrészt egy specifikus PKD inhibitor, a kbNB 142-70-et alkalmaztunk. Mindkét esetben igazoltuk, hogy a PKD aktivitás gátlása a filopódiumok mozgását felgyorsítja (**6. ábra**), ami arra utal, hogy a stabil szinapszisok kialakításához szükséges filopódium-stabilizáció PKD-függő folyamat.

### 2.2.2. Tenyésztett idegsejtek dendrittűskéiben a PKD aktivitása a dendrittűskék megnagyobbodásához vezető, plasztikus folyamatok alatt fokozódik

Disszociáltatott hippokampális idegsejtek tenyésztésében kémiai ingerléssel a dendrittűskék fejének kiszélesedéséhez vezető plaszticitási folyamatokat indukáltunk. A szinaptikus potenciórozó hatást egyrészt rövid idejű glicin kezeléssel (ún. kémiai LTP vagy cLTP modell), másrészt a tartósan megemelt KCl szint következtében kialakuló, ún. homeosztatisz upreguláció kiváltásával idéztük elő (ennek során a tartós depolarizáció a hálózati aktivitást tartósan megszünteti, amire a sejtek felszíni receptorkészletük megnövelésével és a posztzinaptikus membránfelszínük növelésével reagálnak.). Az endogén PKD aktivitás mindkét kezelés hatására gyorsan és tartósan fokozódott, amit egy riporter-konstrukció immuncitokémiai detekciójával és Western blot technikával is bizonyítottunk (**7. ábra**). A PKD-aktivitás riporter a PKD endogén szubsztátjának, a PI4KIII $\beta$  enzim 294. szerinjét is tartalmazó



**6. ábra.** Fluoreszcensen transzfeccióval dendritikus filopódiumok mozgási aktivitása. A módszert ld. Tárnok és mtsai., 2015.



**7. ábra.** Endogén PKD aktivitás detektálása a dendrittűskékben PKD aktivitás riporter (**A-D**), illetve a PKD autofoszforylációjának kimutatásával (**E**). Mind a glicinnel kiváltott kémiai LTP (**D**), mind pedig a KCl-dal előidézett, tartós depolarizáció (**C**, **E**) gyors és elnyújtott PKD aktivációhoz vezet. ld. Bencsik és mtsai., 2015.

régióját hordozza target szekvenciaként, EGFP-hez kapcsolva (Czöndör et al., 2009), így a PKD aktiváció sejten belüli lokalizációját és a target foszforiláció relatív erősségét is detektálni tudjuk (7. **ábra A-D**). Mivel a PKD a 910. szerinjét képes autofoszforilálni, így az endogén PKD aktivitás változását a S910 foszforiláltsági szintje is jellemzi (7. **ábra E**).

### 2.2.3. A kémiaailag kiváltott túskefej-megnagyobbodás hátterében az aktin turnover PKD-függő megváltozása áll

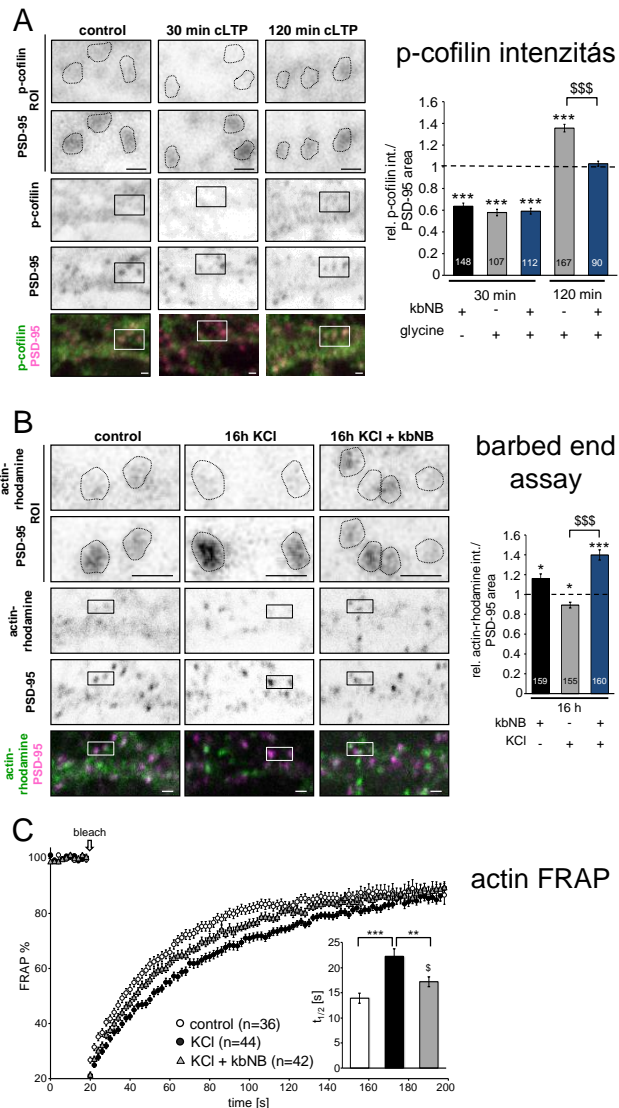
A dendrittűskékben elvégzett mikroszkópos vizsgálatokkal (a foszfo-cofilin szint kvantitatív detektálásával, az aktin polimerizáció intenzitását jelző rhodamin-actin beépülés [actin barbed end assay] elemzésével és az F-aktin turnover dinamikus követésével [actin FRAP, azaz fluorescent recovery after photobleaching]; 8. **ábra**) igazoltuk, hogy a dendrittűskék duzzadásának kezdeti fázisában a depolimerizáció fokozódásával az aktin rendszer dinamikus átalakulása nő, de a későbbi szakaszban, a megnagyobbodott túskefej stabilizációjakor már az F-aktin stabilizációja és a cofilin inaktivációja érvényesül (8. **ábra**).

A dendrittűskék fejének kiszélesedéséhez tehát az F-aktin rendszer kiterjedésének növelése és stabilizációja is szükséges. Ez a folyamat PKD-függő, hiszen a PKD-specifikus gátlószer jelenlétében a cofilin aktivitás nő (azaz a p-cofilin szint lecsökken és a rhodamin-actin beépülés mértéke nő), az aktin-FRAP kísérletben pedig az aktin dinamika gyorsabbá válik (8. **ábra**).

Nem idegi sejtekben már régóta ismert, hogy a PKD számos útvonalon (pl. PAK4, Slingshot vagy cortactin) keresztül az F-aktin rendszer stabilizációját fokozza. A PKD-ra specifikus gátlószer, a kbNB 142-70 jelenlétében, Western blot elemzéssel igazoltuk, hogy a PKD a PAK4-et és a slingshot-ot a kémiai kezelésekkel kiváltott plaszticitási változások során az idegsejtekben is foszforilálja (9. **ábra**). Mindkét molekuláris útvonal a cofilin S3 foszforilációját és inaktivációját fokozza. Mindezt összegezve a PKD aktivitása az F-aktin rendszer stabilizálódását segíti elő.

### 2.2.4. A PKD aktivitás gátlása a dendrittűskék fejének kiszélesedését és annak stabilizációját megakadályozza

Funkcionális kísérletekkel is bizonyítani kívántuk, hogy a dendrittűskékben lezajló F-aktin átrendeződés és stabilizáció PKD-függő módon zajlik. Ezért a tenyészetekben tartós depolarizációval kiváltott túskefej-változásokat az endogén PKD aktivitás gátlása mellett is megvizsgáltuk (10. **ábra**). Mind a domináns-negatív hatású kdPKD mutáns túltermeltetése (10. **ábra C, D**), mind pedig a PKD-specifikus inhibitor, a kbNB 142-70 alkalmazása esetén (10. **ábra B**) a széles fejű (ún. mushroom



8. **ábra.** A dendrittűskék aktin dinamikájának vizsgálata mikroszkópos módszerekkel. A PSD95-tartalmú területeken belül meghatározott relatív p-cofilin intenzitás (A) és a rhodamin-actin beépülés mértékének (B) barbed end esszével történő meghatározása, illetve a fluoreszcens aktin jel visszatérése aktin-FRAP kísérletekben (C). ld. Bencsik és mtsai, 2015.





### 2.3. A PKD aktivitás hatása a sejt felszíni receptorok körforgására

A memóriarögzítés egyik morfológiai alapeleme a dendrittűskék plaszticitás-függő alakváltozása. Általánosan elfogadott elképzelés, hogy a tűskék fejének kiszélesedése a posztszinaptikus denzitás (PSD) kiterjedéséhez, így a neurotranszmitter receptorok számának növekedéséhez vezet, ami hatékonyabb szinaptikus transzmissziót eredményez.

A dendrittűskék fejméretét és a PSD-ben található receptorok mennyiségét gyors transzportfolyamatok és a vezikula-körforgás is szabályozzák. Az AMPA receptorok szinaptikus lokalizációja például gyorsan, akár perces nagyságrendben is szabályozódik. A felszíni receptorkészlet változása értelemszerűen függ a Golgi készülék és a dendritekben található Golgi outpost-ok felől érkező vezikulapool nagyságától és elérhetőségétől. A sejt felszíni receptorok mennyiségét a klatrin burkos endocitózis gyorsan és aktivitás-függő módon csökkenteni tudja, a visszatérő endoszómális rendszer segítségével pedig az aktivitás-függő kihelyeződés is gyorsan szabályozható (ld. **12. ábra**).

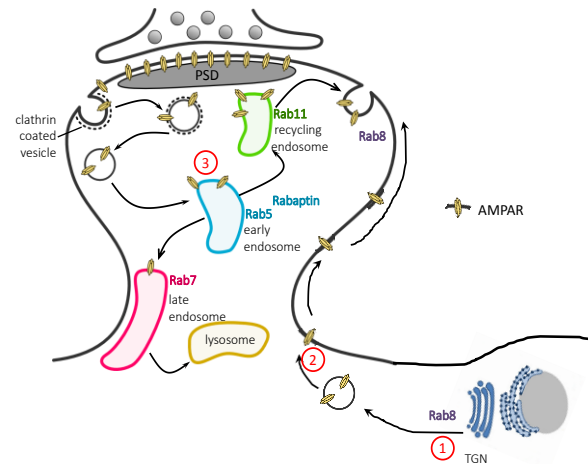
A PKD-ról régóta ismert, hogy nem neuronális sejtekben a szekréciós transzportban, így a Golgi készülékről való vezikula-lefűződésben, a polarizált sejtekben zajló bazolaterális membrán-transzportban és a Rab5 kis GTPáz-függő endocitózisban is szerepet játszanak. Idegsejtekben azonban ennél jóval korlátozottabb ismeretek voltak eddig csak elérhetőek. Az aktin citoskeletális rendszerre gyakorolt hatás mellett ezért azt is vizsgálni kívántuk, hogy az endogén PKD aktivitás a membránreceptorok – elsősorban a szinaptikus plaszticitás egyik kulcsmolekulája, az AMPA glutamaterg receptor – körforgására milyen hatással van. Tisztázni kívántuk azt is, hogy a PKD celluláris plaszticitásra gyakorolt hatásában a receptor turnover befolyásolása mekkora szereppel bír.

#### 2.3.1. A protein kináz D a transzferrin receptor endocitózisát fokozza

Munkánk során a PKD aktivitásának transzmembrán receptor-körforgásra kifejtett hatását a részleteiben jól ismert transzferrin receptor-mediált endocitózis modellben vizsgáltuk. Az idegsejtekben a transzferrin receptor (TfR) nagy mennyiségben fejeződik ki, így a sejtek rövid pulzusjelölést követően is megkötik, majd felveszik a fluoreszcens transzferrint (Tf). A bekebelezett TfR - Tf komplexről a Tf disszociál, majd a TfR vezikulák 80-90%-ban a visszatérő endoszómális rendszeren keresztül visszajutnak a plazmamembránba – e sajátságok alapján az idegsejtekben a transzferrin endocitózis vizsgálatával viszonylag könnyen képet kaphatunk arról, hogy a PKD aktivitás a membránreceptorok körforgását befolyásolja-e tenyésztett idegsejtekben.

Primer hippokampális idegsejtenyészetben a PKD működését mind genetikailag, egy konstitutívan aktív PKD mutáns túltermelésével, mind farmakológiailag, PKD-specifikus gátlószerrel befolyásoltuk. A korai, késői és visszatérő endoszómákat EGFP-vel jelölt, a kis GTPázok közé tartozó Rab5, Rab7 és Rab11 fehérjékkel azonosítottuk. Az endocitotikus folyamatok nyomon követéséhez az idegsejtekkel fluoreszcensen jelzett transzferrint vetettünk fel. Az 1 perces pulzusjelölést követő különböző inkubációs idők leteltével konfokális felvételeken elemeztük a transzferrin endocitózis kinetikáját, illetve a felvett transzferrin molekulák és a Rab fehérjékkel jelzett vezikulák közötti kolokalizáció mértékét és annak időbeli változását (**13. ábra**).

A konstitutívan aktív PKD túltermelése a transzferrin felvételét gyorsította (**13. A ábra**), a korai endoszómákhoz asszociálódó Rab5 pozitív vezikulák és a transzferrin jel közötti kolokalizáció mértékét fokozta (**13. B ábra**). Az endogén PKD aktivitás gátlása a klatrin burkos endocitózis kezdeti



**12. ábra.** A protein kináz D (PKD) a sejt felszíni receptorok körforgását számos útvonalon át szabályozhatja: 1) a szekréciós transzport és a trans-Golgi hálózatról lefűződő vezikulák irányításával; 2) a vezikulák plazmamembránnal történő fúziója során; illetve 3) a visszatérő endoszómális rendszeren keresztül.

lépéseit nem befolyásolta, de az endoszómális rendszerbe való bekerülést és a korai endoszómális rendszerben megjelenő transferrin jel mértékét szignifikánsan csökkentette (**13. A és B ábra**).

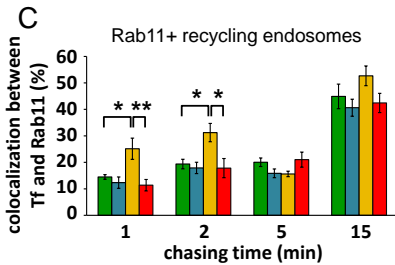
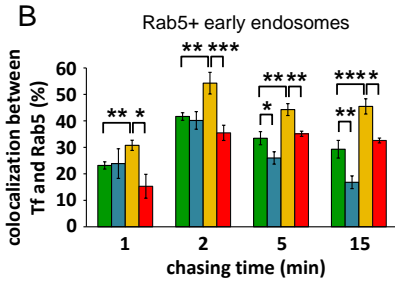
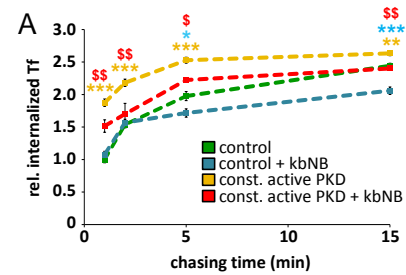
A visszatérő (recycling) endoszómákat jelölő Rab11 pozitívitású endoszómák és a transferrin jel közötti asszociáció a konstitutívan aktív PKD hatására az endocitózis kezdeti lépései során megnövekedett, amit a PKD-specifikus gátlószerekkel kivédhető volt (**13. C ábra**). A késői endoszóma marker Rab7 és a transferrin molekulák közötti kolokalizáció mértékét a PKD aktivitás nem befolyásolta (nincs bemutatva). Mindezek alapján a PKD a transferrin endocitózist és a transferrin receptor körforgását neuronokban is szabályozza.

### 2.3.2. A protein kináz D a sejt felszíni AMPA receptorok mennyiségét és körforgását is szabályozza

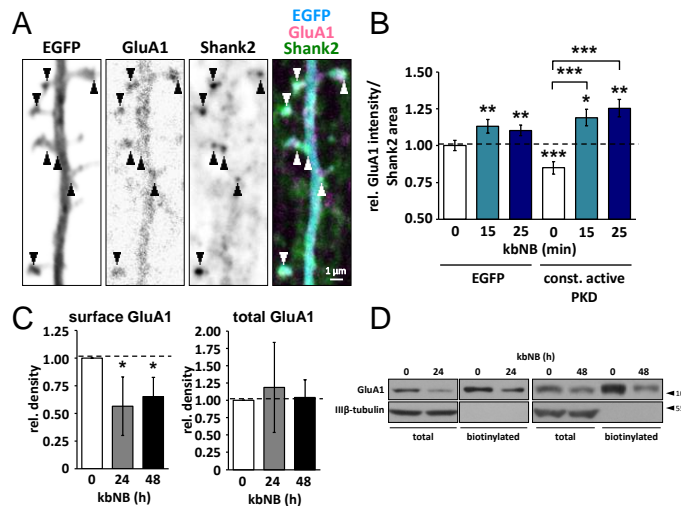
A neuronális plaszticitás szempontjából fontos AMPA receptorok, elsősorban a GluA1 sejt felszíni lokalizációját is vizsgáltuk. Sejt felszíni biotinizációs vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a PKD aktivitás 24-48 órás gátlása a sejt felszíni GluA1 mennyiségét szelektíven csökkenti, de a teljes szintetizált GluA1 mennyiségére nincs hatással (**14. C, D ábra**). Konfokális mikroszkóppal a dendrit tuskékban is vizsgáltuk, hogy a sejt felszíni, illetve a PSD-vel szoros kolokalizációt mutató GluA1 mennyiségét a PKD aktivitás hogyan befolyásolja (**14. A ábra**). Eredményeink alapján a PKD aktivitás gátlása a GluA1 sejt felszíni mennyiségét rövid távon (15-25 perc alatt) szignifikánsan megnöveli, de hosszabb alkalmazása esetén ez a hatás megfordul és a sejt felszíni receptormennyiség lecsökken (**14. B ábra**).

Mindez arra utal, hogy a PKD aktivitás a klatrin burkos endocitózist serkenti, ugyanakkor a plazmamembrán felé irányuló konstitutív GluA1 transzportban is szerepet játszik. Elképzelhető, hogy a PKD az előbbi hatást a RIN1 (Ras és Rab interaktor 1) target molekula segítségével, a Rab5 kis GTPáz működésének szabályozásán keresztül fejt ki – ennek vizsgálata jelenleg is folyamatban van.

A PKD neuronális plaszticitást befolyásoló hatásáról számos konferencián és két megjelent publikációban is beszámoltunk (Cytometry A és J. Cell Biology). A bemutatott anyag ezen felül egy védés előtt álló és egy készülő doktori disszertáció, illetve egy már benyújtott közlemény alapját is képezi.



**13. ábra.** A konstitutívan aktív PKD és a PKD-specifikus gátlószerek (kbNB) hatása a transferrin felvétel kinetikájára (**A**), illetve a Rab5 (**B**) vagy Rab11 (**C**) pozitív vezikulák és a felvett transferrin közötti kolokalizációra.



**14. ábra.** Sejt felszíni GluA1 receptorok kimutatása antibody feeding (**A-B**) és sejt felszíni biotinizációs (**C-D**) módszerrel. **B:** A PSD-marker Shank2 területére vonatkoztatott relatív GluA1 intenzitás a kbNB kezelés időtartamától függ. **C-D:** a sejt felszíni GluA1 receptor alegység relatív mennyiségét a PKD-specifikus inhibitor kezelés hosszú távon lecsökkenti.

### 3. Az endogén PKD aktivitás szerepének tisztázása a neurodegenerációs folyamatokban

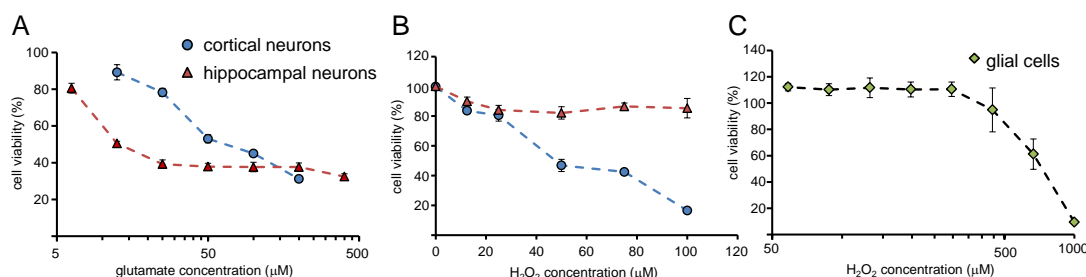
Az 1. fejezetben ismertetett, domináns-negatív hatású kdPKD mutáns fehérjét termelő hippocampális idegsejtekben végzett fény- és elektronmikroszkópos megfigyelések már jelezték, hogy az endogén PKD funkciók károsodása neurodegeneratív következményekkel is járhat (ld. **3-5. ábra**). Korábbi, tenyésztett idegsejtekben végzett megfigyeléseink már megmutatták, hogy a kdPKD mutáns túlermelése a dendritfa zsugorodását és a Golgi készülék szétesését okozza (Czöndör és mtsai. 2009), így in vivo megfigyeléseink ezzel teljesen összhangban állnak. Pályázatunk alatt ezért részletesen vizsgáltuk, hogy az endogén PKD aktivitás a neurodegeneratív sérülések során milyen hatást fejt ki.

#### 3.1. A neurodegeneratív sérülések modellezése idegsejt-tenyészetekben: az oxidatív stressz, az excitotoxicitás és a hipoxia/anoxia hatásának vizsgálata a tenyészetek életképességére

A tenyészetekben az oxidatív stresszt hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) kezeléssel váltottuk ki, amely reaktív oxigén szabadgyökök felszabadulásával jár. Az excitotoxikus idegsejtpusztuláshoz glutamát (Glu) kezelést alkalmaztunk, amely az ionotróp glutamát receptorok túlserkentéséhez, ezáltal pedig az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció nagymértékű növekedéséhez, proteázok és endonukleázok aktiválódásához vezet. A kálium-cianid – dideoxiglükóz kombinált kezelés (OGD) az anoxiás – hipoglikémiás állapot modellezésére alkalmas, mivel a glikolízist és a mitokondriális terminális oxidációt is gátolja. A hipoxia egy enyhébb formáját a tenyészetek hipoxiás kamrában,  $O_2$  helyett  $N_2$  gázt tartalmazó légkeverékkel történő inkubálásával váltottuk ki.

Vizsgálatainkat egér embrionális kortikális (E15 DIV7-8) és hippocampális (E18 DIV10-12) idegsejttenyészeteken, valamint egér posztnatális (P1-3) asztroglia tenyészeteken is elvégeztük, hogy a legmegfelelőbb sejtes rendszert ki tudjuk választani. A kezelést túlélő sejtek arányát MTT életképesség méréssel, fotometriásan határoztuk meg.

Mindhárom tenyésztéstípusnál meghatároztuk, hogy az OGD, a Glu és  $H_2O_2$  kezelést milyen koncentrációban és milyen hosszan kell ahhoz alkalmaznunk, hogy a kezelést követő 24. órában a tenyészetek életképességét jelentősen csökkentse. Az OGD kezelésre mindhárom sejttípus igen érzékeny volt: 30 perces, 1 mM KCN kezelés már jelentős sejtvesztést okozott (nincs bemutatva). Az excitotoxikus kezelés esetén a hippocampális neuronok érzékenyebbnak bizonyultak: már 1 óras, 12,5  $\mu$ M Glu kezelés elegendő volt a tenyészetek ~50%-os sejtpusztulásához, míg a kortikális idegsejttenyészetek esetén a hasonló hatás eléréséhez 50  $\mu$ M Glu kezelés kellett (**15. ábra A**). A várttal összhangban az asztroglia tenyészetekben a Glu kezelés nem váltott ki életképesség-változást (nincs bemutatva). Oxidatív stressz esetén a kortikális tenyészetek  $H_2O_2$  érzékenysége a hippocampális tenyészetekénél nagyobbak bizonyult (**15. ábra B**). Az asztroglia sejtek viszont csak igen magas koncentrációknál reagáltak a  $H_2O_2$  kezelésre (**15. ábra C**).



15. ábra. Különböző sejttípusok életképességének változása Glu (A), illetve  $H_2O_2$  (B-C) kezelés hatására.

#### 3.2. Az endogén PKD aktivitás változása neurotoxicitási modellekben: az S910 autofoszforiláció vizsgálata

A PKD a 910. pozícióban elhelyezkedő szerinjét upstream aktiválódását követően autofoszforilálja, így a foszforilált szerin910 ellen termeltetett ellenanyag (a-pS910) segítségével a PKD katalitikus aktivitásának változását Western Blot technikával nyomon tudtuk követni (ld. **16. ábra**).

A PKD gyorsan, a stimulustól függően általában néhány percen belül a membránban keletkező diacil-glicerolhoz kötve aktiválódik, így első vizsgálataink során a rövid távú (<1h) aktivációt vizsgáltuk. A mintafelvételt megelőzően a toxikus kezeléseket 10 perc és 6h időtartam között alkalmaztuk - ez idő alatt a tenyészetek átlagos sejtszáma, neurontartalma vagy össz-PKD mennyisége nem változott. Az idegsejtenyészetekben mind a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**19. A ábra**), mind az OGD és a Glu kezelés (**16. ábra B-C**) gyors és tranzien PKD aktivációt okozott, ahol a maximális aktivációt a kezelés indítása után 30-40 perccel tapasztaltuk. Az asztroglia sejtekben a Glu kezelés hatására az endogén PKD hatás nem változott, de az OGD és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés itt is hatásos volt (nincs bemutatva). A hipoxiás kezelés az idegsejtekben nem okozott kimutatható PKD aktivációt, de az asztroglia sejtekben egy erős, de gyorsan (30 percen belül) lecsengő autofoszforiláció-emelkedést tapasztaltunk (**16. ábra A**). Összességében azt mondhatjuk, hogy a 24 órás túlélést követően toxikusnak bizonyuló kezelések az ideg- és gliasejtekben is igen hasonló kinetikával, tranzien PKD aktivitás-növekedést okoztak. Mindez utalhat arra, hogy a PKD a sejtpusztulást indukáló hatások kialakulásakor a kiváltó stimulustól függetlenül aktiválódik, így az általános túlélést szabályozó jelátvitelben is szerepet játszhat.

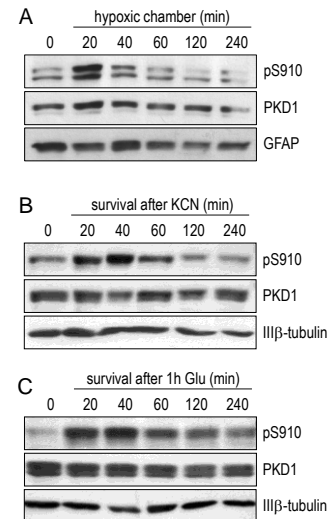
Nem idegi sejteken végzett vizsgálatok szerint az oxidatív stressz esetén a mitokondriumokból származó oxigén szabadgyökök a PKD által irányított kaskádrendszert aktiválják (Storz és mtsai., 2004). Az elektronmikroszkópos vizsgálatok során gyakran tapasztaltuk, hogy a kdPKD mutáns fehérje a mitokondriális membránoknál felhalmozódik. Mivel a mitokondriális funkciók mindegyik vizsgált toxicitási modellben károsodnak, további vizsgálatainkban már csak a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kiváltható oxidatív stresszt alkalmaztuk. Tekintve, hogy a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés az asztroglia sejtekben is jelentős PKD foszforilációt okozott, további kísérleteinkhez a nagy mennyiségben izolálható és asztroglia-mentesen is tenyészthető kortikális idegsejteket használtuk. A tenyészetek jobb túléléséért a sérülésmentes Neurobasal tápfolyadékot 50% gliális kondicionált Neurobasal médiummal is kiegészítettük.

### 3.3. Az endogén PKD aktivitását az oxidatív stressz fokozza

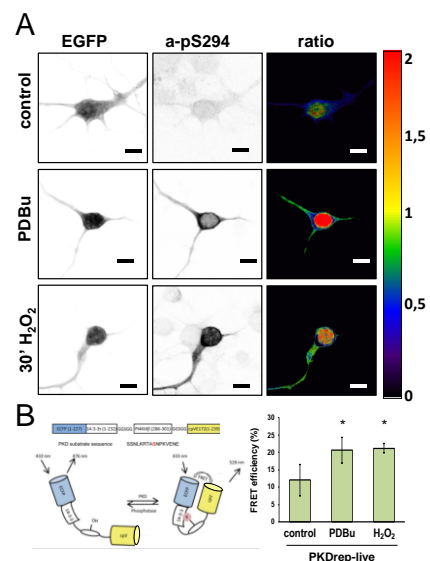
#### 3.3.1. Az oxidatív stressz során aktiválódó endogén PKD detektálása riporter konstrukciókkal

A PKD S910 foszforilációja már utal a megnövekedett PKD aktivitásra, de érdemes a PKD közvetlen szubsztrátjainak foszforilációját is nyomon követni. Fixált sejtekben történő mikroszkópos elemzésekre az ún. PKD-riporter konstrukció alkalmas (ld. **7. ábra**). A Western blot eredményekkel összhangban, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés a foszfo-specifikus a-pS294 szignál intenzitását jelentősen növelte (**17. A ábra**). Feltűnő volt, hogy az intenzitásváltozás a neuronok sejtmagjában is detektálható volt.

Ezek a módszerek az enzim aktivációjáról azonban csak pillanatfelvételeket mutatnak. Ezért Angelika Hausser (Stuttgarteri Egyetem, Sejtbiológiai és Immunológiai Intézet) munkacsoportjával közösen olyan fluorescens rezonáns energiatranszfer (FRET) elvet használó bioszenzort is kialakítottunk, amely élő sejtekben is használható (ún. PKDrep-live riporter; **17. B ábra**).



**16. ábra.** Átmeneti S910 foszforiláció asztroglia sejtekben hipoxiás kamrás kezelés után (**A**), illetve kortikális tenyészetekben OGD (**B**) vagy Glu (**C**) kezelést követően.



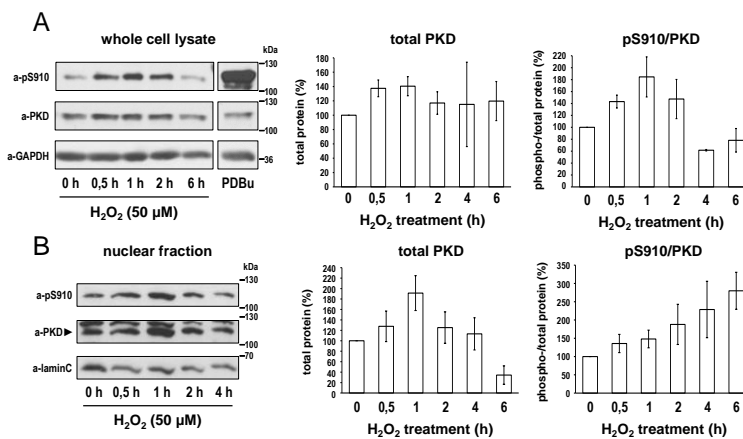
**17. ábra** Az oxidatív stressz következtében megnövekedett PKD aktivitás mikroszkópos módszerekkel, fixált (**A**) és élő (**B**) sejtekben használható PKD riporter konstrukciók segítségével is elemezhető.

A FRET riporterben az ECFP donor és cpVENUS akceptor fluorokróm mellett a 14-3-3 $\tau$  állványfehérje, illetve az ennek C terminálisához fuzionáltatott, PKD által specifikusan foszforilálható PI4KIII $\beta$  motívum szerepel. Az endogén PKD aktivitás hatására foszforilálódó PI4KIII $\beta$  motívumot a szoros közelségében lévő 14-3-3 $\tau$  meg tudja kötni. A bekövetkező térszerkezetváltozás molekuláris közelségbe hozza a donort és akzeptort és létrejön a FRET jelenség (azaz a donort gerjesztve az akceptor emittál). A kinetikai vizsgálatok értelmezéséhez fontos, hogy a FRET jelenség reverzibilis, azaz a szenzor deaktiválódni is tud: a foszforilált motívumot ugyanis a sejten belüli foszfatázok eltávolítják, ami az eredeti térszerkezet visszaállásához és a FRET megszűnéséhez vezet. Az élő sejteken végzett kísérletek is megerősítették, hogy 30 perces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés jelentős, a forbol-észterrel történő aktivációval összemérhető FRET hatékonyság növekedéshez vezet (**17. B ábra**).

### 3.3.2. Oxidatív stressz hatására a PKD mind a citoplazmában, mind a magban aktiválódik

Nem idegi sejtekben kimutatták, hogy a PKD aktivációját követően a szubsztrát-foszforilációra mind a citoplazmában, mind pedig a magban is képes, így egyes transzkripciós faktorok magi lokalizációját és hatását közvetlenül tudja irányítani (pl. a II. típusú hiszton deacetylázok közé tartozó HDAC5 foszforiláció szívizom sejtekben; Sin és Baillie, 2012). A riporter konstrukciókkal elvégzett elemzéseken is látszott, hogy a szubsztrátfoszforiláció emelkedése a sejtmagban kifejezett volt (**17. ábra**). Ezért a PKD jelenlétét és foszforiláltságát az idegsejtenyészetek teljes, illetve citoplazmás és nukleáris frakcióiban is megvizsgáltuk (**18. ábra**).

Oxidatív stressz alatt a sejtmag-frakcióban kimutatható PKD fehérje mennyisége 1 órán belül átmenetileg megnőtt, miközben a pS910 szint mennyisége folyamatosan, 6 órán át nőtt (**18. B ábra**). Ez jelzi, hogy a PKD-függő jelátviteli útvonalak eltérő kinetikával, de mind a citoplazmában, mind a magban aktiválódnak.



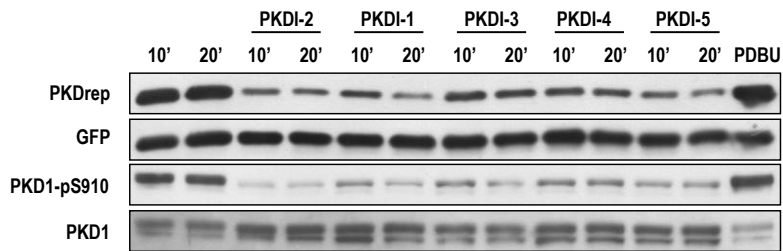
**18. ábra.** Idegsejt-lizátumokban az oxidatív stressz hatására mind össz-fehérje szinten (**A**), mind pedig a nukleáris frakcióban (**B**) megemelkedik a PKD S910 foszforilációja oxidatív stressz alatt. A nukleáris frakcióban a PKD foszforilációja folyamatosan emelkedik, de legnagyobb mennyiségben az oxidatív stressz első órájában detektálható.

### 3.4. A PKD-t gátló, kismolekulás inhibitorok hatása az H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-kezeléssel kiváltott sejtpusztulásra

#### 3.4.1. Az új fejlesztésű, kismolekulájú PKD inhibitorok az oxidatív stressz alatt neuroprotektív hatást fejtenek ki

A Vichem Kft és a Semmelweis Egyetem MTA-TKI Pathobiokémiai Kutatócsoportjának munkatársaival kialakított együttműködés keretében már a pályázat indulásakor hozzájuthattunk új fejlesztésű PKD inhibitorokhoz (ebben az időben a kereskedelmi forgalomban nem állt rendelkezésre kellő specificitású PKD-inhibitor). Mivel az újonnan kifejlesztett gátlószerek kereskedelmi forgalomban még nem kaphatóak, megnevezésükre kódnevet (PKDI-1, PKDI-2, stb.) használunk.

A PKD inhibitorok hatékonyságát és az alkalmazandó koncentrációt a PKD riporter konstrukció HEK sejtekbe történő transzfektálását követően, a-pS292 Western blot segítségével ellenőriztük. A HEK sejtekben a PKD aktivációt szérummegvonást követően az FCS visszaadásával váltottuk ki, ami a PKD gyors és tranziens aktivációját okozza. Az aktiváció kinetikáját és mértékét 6 gátlószertan esetében hasonlítottuk össze, majd kiválasztottuk azt a két inhibitor (PKDI-1, PKDI-2), amely a PKD riporter, illetve a PKD S910 autofoszforilációját 1  $\mu$ M koncentrációban a leghatásosabban gátolta (**19. ábra**).



**19. ábra.** Új fejlesztésű PKD inhibitorok hatása 1  $\mu\text{M}$  koncentrációban a PKD riporter, illetve a PKD S910 foszforilációjára. A GFP jel a riporter fehérje mennyiségét jelzi.

Ezek az inhibitorok a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -kezeléssel kiváltott tranzienst PKD autofoszforiláció mértékét csökkenteni tudták, 24 óras kezelés esetén sem a neuronális, sem a gliális tenyészetek életképességére nem voltak hatással. Mindez azt jelzi, hogy az inhibitor folyamatos jelenléte az idegsejtekre nem káros, de a külső hatással indukált PKD aktivitás mértékét csökkenteni tudja.

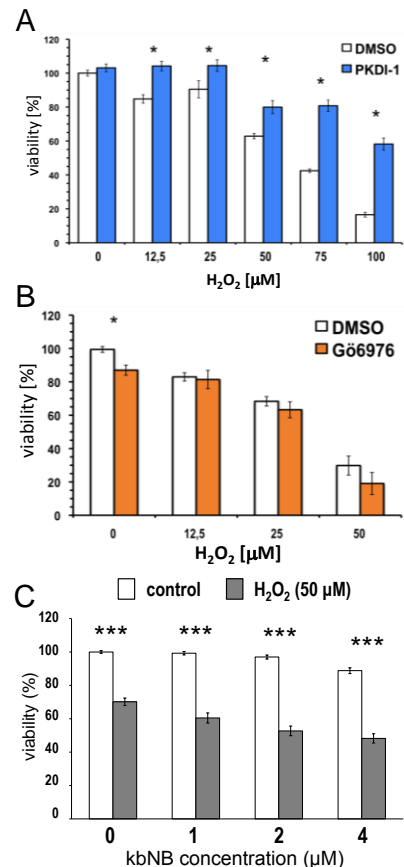
Megvizsgáltuk, hogy a PKDI-1 és PKDI-2 jelenléte a neurodegeneratív sejtpusztulás mértékét az idegsejttenyészetekben mennyiben befolyásolja. Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy a Glu (nincs bemutatva) és a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -kezeléssel kiváltott idegsejtpusztulás mértékét ezek a PKD inhibitorok jelentősen csökkenteni tudják, azaz az idegsejtek túlélése szempontjából protektív hatást fejtenek ki (**20. A ábra**). A továbbiakban csak a PKDI-1 inhibitorral foglalkoztunk.

#### 3.4.2. Az új fejlesztésű, kismolekulájú PKD inhibitor az idegsejtekben fokozza az NF $\kappa\text{B}$ aktivitást

Kíváncsiak voltunk arra, hogy az újonnan fejlesztett inhibitor a neuroprotektív hatást is szabályozó NF $\kappa\text{B}$  útvonalra vajon hat-e. Az NF $\kappa\text{B}$  aktiváció mértékét NF $\kappa\text{B}$  riporter-esszé alkalmazásával<sup>2</sup> kívántuk vizsgálni az idegsejtekben.

A transzfekciós hatékonyság növelésére a Lonza Nucleofector technikáját is kipróbáltuk, ahol a plazmidok transzfektálását a kiültetés során, még szuszpenzióban végeztük el. Ezzel a módszerrel magas (~30%) transzfekciós arányt sikerült elérni (a GFP-pozitivitás alapján FACS-szal megállapított érték), de a transzfektált idegsejtekben a kiültetést követő napokban egyre fokozódó sejtpusztulást figyeltünk meg – valószínű, hogy a riporter konstrukciók hosszú távú termelődése és jelenléte okozta ezt. Mivel a neurotoxikus kezelésekre csak a kiültetést követő 7-8. napon került sor, a fokozódó idegsejtpusztulás a riporter esszé alkalmazását lehetetlenné tette.

Habár az érettebb, már hosszú nyúlványokkal rendelkező idegsejtekben a Lipofectaminnal elvégzett transzfekció hatékonysága alacsony (<1%), sikerült olyan körülményeket elérnünk, ahol a riporter konstrukciók megfelelő mennyiségben termelődnek. Pozitív kontrollként TNF $\alpha$  kezelést alkalmazva sikerült kimutatnunk, hogy a transzfektált idegsejtekben az NF $\kappa\text{B}$  aktivitás szignifikánsan fokozódik ( $147 \pm 24,7\%$ ). Sikerült azt is bizonyítanunk, hogy PKDI-1 normál körülmények mellett az



**20. ábra.** A  $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelést túlélő sejtek életképességét a PKDI-1, új fejlesztésű inhibitor növelte (**A**), a PKC-t és PKD-t is gátló Gö6976 nem befolyásolta (**B**), míg a PKD-specifikus inhibitor, a kbNB 142-70 csökkentette (**C**).

<sup>2</sup> Az idegsejteket két riporter plazmiddal kell transzfektálni: az egyik a transzfekciós hatékonyság ellenőrzését szolgáló, folyamatosan transzkriptálódó Renilla luciferázt kódolja, míg a másik az NF $\kappa\text{B}$  promoterről meghajtott Firefly luciferáz enzim kódolja, amely csak akkor íródik át, ha a promotérhez NF $\kappa\text{B}$  kötődik. Az NF $\kappa\text{B}$  promóter aktivációjára a kétféle luciferáz enzimreakciójának arányából lehet következtetni.

NFκB aktivitást egyértelműen fokozza (5 független mérés egybehangzó eredménye;  $134.6 \pm 16,9\%$ ). Mindez meglepő, hiszen a PKDI-1 normál körülmények mellett a sejtek életképességét nem befolyásolta. Korábbi irodalmi adatok már jelezték, hogy az endogén PKD aktiváció az NFκB útvonal aktivációján keresztül protektív, a sejtek túlélését segítő hatást fejthet ki, ami az előbbiekkal újfent ellentmondásban áll. Hasonló diszkrepanciát fedezhetünk fel a neurotoxikus kezelés során a PKDI-1 és PKDI-2 gátlószerezrel elért protektív hatás, illetve a domináns-negatív kdPKD mutáns fehérje in vivo és in vitro termelődésére bekövetkező, neurodegeneratív elváltozások között.

Ezeket az ellentmondásokat jól magyarázza, hogy ezek az inhibitorok valószínűleg nem PKD-specifikusak, hanem más kinázokra is hatnak. A vizsgált inhibitorokkal rokon, szintén a Vichem Kft vegyülettárából származó VCC251801 pl. a PKD1 és 2 izoforma mellett a VEGFR2 működését is gátolja (Varga és mtsai., 2015). Ez a szinergista hatás tumor-ellenes terápiás szereknél kifejezetten előnyös, a kísérleti rendszerekben viszont hátrányt is jelenthet.

A megfigyelt neuroprotektivitás jelensége mindenképpen figyelemre méltó, így a szabadalmi kérdések tisztázását követően ezeket az eredményeket is szeretnénk publikálni.

### 3.4.3. A PKD-specifikus inhibitor kbNB 142-70 az oxidatív stresszre bekövetkező sejtpusztulást fokozza

A PKDI-1 és PKDI-2 inhibitorokkal elkezdett kísérletek idején még nem volt kereskedelmi forgalomban egy jóval nagyobb specificitást mutató inhibitor, a kbNB 142-70. HEK293T sejtekben bizonyítottuk, hogy a PKD1 és PKD2 izofomákat hatékonyan gátolja és off-target hatása sokkal kisebb, mint a korábban alkalmazott szereké. A továbbiakban ezért ezzel az inhibitorral dolgoztunk.

Amikor a kbNB 142-70 jelenlétében ismételtük meg az  $H_2O_2$  kezelést követő életképességi vizsgálatokat, a túlélő sejtek életképessége jelentősen lecsökkent (**20. C ábra**), míg a PKD mellett a PKC aktivitását is gátló Gö6976 semmilyen protektív hatást sem fejtett ki (**20. B ábra**). Mivel ezt a hatást reprodukálhatóan és egybehangzóan tapasztaltuk, valószínűsíthetjük, hogy az endogén PKD aktiválódása az oxidatív stressz folyamán inkább a neuronok túlélését elősegítő, protektív folyamatokat indít el.

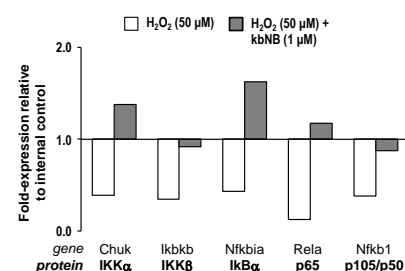
### 3.5. Az oxidatív stressz idegsejtekben a kanonikus NFκB útvonalat aktiválja, de az NFκB nukleáris transzlokációját nem váltja ki

Nem neuronális sejtekben Storz és munkatársai már 10 éve kimutatták, hogy oxidatív stressz során a PKD a mitokondriális membránnál, szabadgyökök segítségével történő aktivációja az NFκB útvonal upregulációjához vezet. Ez az útvonal az idegsejtekben is általános, neuroprotektív hatásokat közvetítő jelpályaként ismert. Kutatócsoportunk ezért ezen hatások felderítésével is megpróbálkozott.

#### 3.5.1. A nem kanonikus NFκB útvonal főbb elemei (RelB, p100) az idegsejtenyészetekben nem expresszálódnak

Mivel az idegsejtekben aktiválódó, az NFκB útvonalban érintett fehérjékkel kapcsolatosan sok az ellentmondó adat (Isd. Listwak és mtsai., 2013), a Cell Signaling NFκB Stellarray qRT-PCR kit-jének segítségével mintegy 50, az NFκB útvonalban szerepet játszó fehérje transzkripciós változását követtük nyomon. Az  $50 \mu M$   $H_2O_2$ -dal, illetve  $H_2O_2$ -dal és kbNB 142-70-el kezelt tenyészetek expressziós adatait a kontroll tenyészetekéhez hasonlítottuk.

Eredményeink alapján a nem kanonikus NFκB útvonal főbb elemei (mint pl. a RelB és a p100), illetve a nem kanonikus útvonalhoz szorosan kötődő, NIK (NFκB indukáló kináz) enzim a tenyészetekben nem expresszálódtak, így ezeket a további, fehérje-szintű vizsgálatokból ki is zártuk. A kanonikus NFκB szignálútvonalba tartozó gének (pl. RelA [p65], Nfkb1 [p105/p50], Chuk [IKK1/IKKα]) expresszióját a  $H_2O_2$  kezelés csökkentette, de a PKD-specifikus inhibitor a  $H_2O_2$  kezeléssel együttesen adva ezt a hatást többnyire megszüntette (**21. ábra**). A MAPK útvonal elemei közül például az Elk1, a növekedési faktor útvonal tagjai között pedig a RhoA esetében tapasztaltunk hasonló változást (nincs bemutatva).



**21. ábra.** Génexpressziós változások a kanonikus NFκB útvonal elemeinél  $H_2O_2$  kezelés, kbNB 142-70 kezelés, illetve a két anyaggal együtt történő kezeléseket esetében.



### 3.5.2. Az oxidatív stressz a kanonikus NFκB útvonalban az IKKα és az NFκB/p65 foszforilációját fokozza, de az IκBα degradációját nem váltja ki

A qRT-PCR eredmények alapján az idegsejtekben kiváltott oxidatív stressz során a kanonikus NFκB útvonal érintett lehet, így a továbbiakban az útvonal főbb elemeinek mennyiségi és foszforilációs változását, illetve a PKD erre kifejtett lehetséges hatását Western blot segítségével elemeztük (**22. A ábra**).

Az NFκB útvonal upstream regulátorai közül az IKKα relatív foszforilációja az oxidatív stressz alatt tranziensen nőtt, a legnagyobb mértékű változást a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelést követő 1. órában tapasztaltuk. Az NFκB foszforilációja a 2. órától kezdve fokozódott. Érdekes módon az idegsejtekben az oxidatív kezelés nem váltotta ki az IκB szintjének csökkenését. Ez azért meglepő, mert irodalmi adatok alapján az IKK-n keresztüli foszforiláció következtében az IκB degradálódik, így a vele addig egy komplexben található NFκB/p65 szabaddá válik és foszforilációját követően a sejtmagba jut (**22. B ábra**).

### 3.5.3. Az NFκB/p65 mennyisége a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt idegsejtekben megnő, de a foszforilált NFκB a sejtmagban nem detektálható

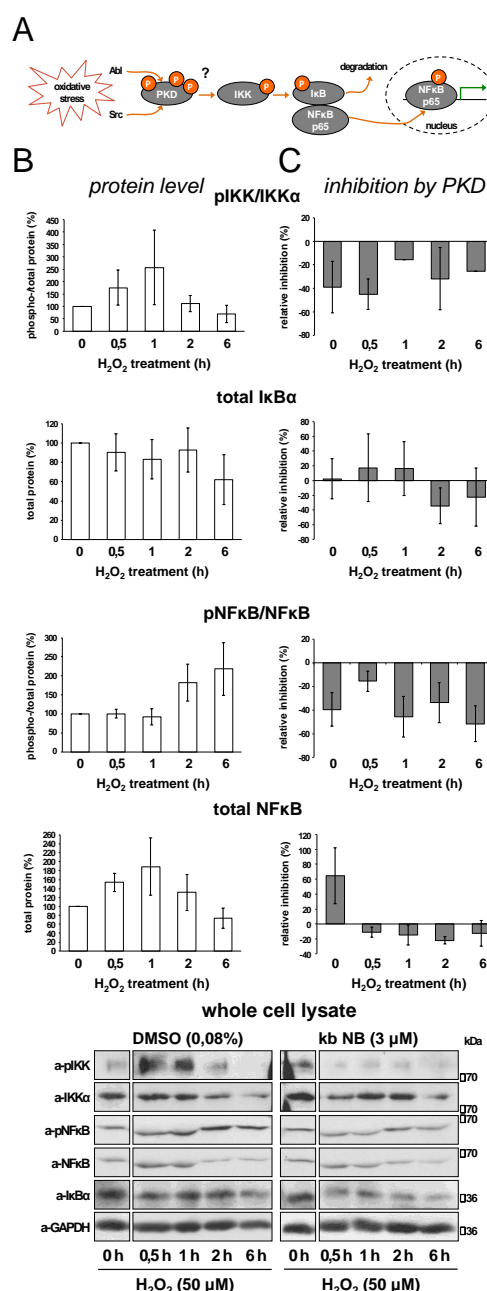
Az idegsejtekben kiváltott oxidatív stressz során az NFκB fehérje mennyisége az össz-fehérje tartalomhoz viszonyítva egy órán belül megemelkedett, majd az IKK foszforilációjához hasonlóan lecsengett (**22. B ábra**). Az NFκB relatív foszforilációjának mértéke ugyanakkor a kezelés elején változatlan maradt, de a 2. órától egyre jobban nőtt. Mivel ezek az adatok várakozásunknak ellentmondtak, részletesebb magyarázatot szerettünk volna kapni.

A "REAP" metodika (Suzuki és mtsai., 2010) segítségével ezért nukleáris és citoplazmás frakciókat izoláltunk, amelyek tisztaságát a lamin C, illetve a tubulin jel aszimmetrikus megoszlásával igazoltuk (**23. A ábra**). Az NFκB fehérjét a magi frakcióban ki tudtuk mutatni, de mennyisége a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés előrehaladtával folyamatosan csökkent, foszforilációját pedig egyáltalán nem tudtuk detektálni. A citoplazmás frakcióban viszont mind az össz-mennyiség, mind pedig a relatív foszforiláció növekedését bizonyítottuk (**23. A ábra**).

Ezek az adatok megkérdőjelezzik, hogy oxidatív stressz esetén az NFκB az idegsejt-tenyészetekben is a jól ismert IKK-IκB útvonalon keresztül aktiválódik, és hogy a foszforiláció az NFκB nukleáris transzlokációját váltja ki.

### 3.5.4. Az NFκB/p65 nukleáris transzlokációját az H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt idegsejtekben nem tudtuk kimutatni

Nem neurális sejtekben régóta ismert és az NFκB immuncitokémiai lokalizációjával is bizonyított tény, hogy a fehérje aktivációját követően átmenetileg a sejtmagba kerül. Ezt HeLa sejtek 1 órás TNFα kezelését követően mi is bizonyítani tudtuk (**23. B ábra**). Ha ugyanezt az elemzést a kortikális



**22. ábra.** Az NFκB útvonal sémája és a PKD feltételezett szerepe (A). A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés az IKKα és az NFκB foszforilációját fokozta, de az IκB degradációját nem idézte elő (B). A PKD inhibitor kbNB 142-70 az IKKα és az NFκB foszforilációját megakadályozta (C).

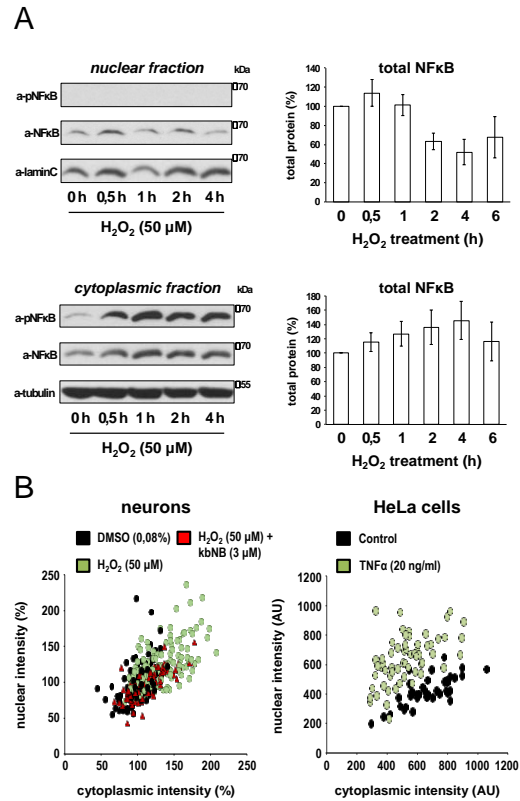
idegsejtenyészetekben végeztük el, akkor a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatására a nukleáris/citoplazmás jelintenzitás aránya nem változott meg, azaz a nukleáris transzlokációt nem, hanem csak az általános mennyiségi növekedést tudtuk detektálni.

### 3.6. Az endogén PKD aktivitás gátlása az IKK $\alpha$ és az NFkB/p65 oxidatív stresszel kiváltott foszforilációjának mértékét csökkenti, de az NFkB nukleáris transzlokációját nem befolyásolja

A kbNB 142-70 alkalmazásával megvizsgáltuk azt is, hogy az endogén PKD aktivitás gátlása vajon az NFkB útvonal egyes elemeire van-e bármilyen hatással. Ehhez az ún. relatív gátlás, vagyis az adott időpontban a kbNB 142-70-el kezelt és kezeletlen tenyészetekben megfigyelhető fehérje szintű relatív változások mértékét határoztuk meg (22. C ábra).

Adataink alapján normál, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal nem kezelt tenyészetekben az IKK $\alpha$  és az NFkB relatív foszforilációjának mértékét a gátlószer csökkentette, míg az I $\kappa$ B mennyiségét nem befolyásolta. Amennyiben a kbNB 142-70-et az oxidatív kezelés során alkalmaztuk, az IKK $\alpha$  és az NFkB relatív foszforilációja tartósan alacsony maradt. Mindez arra utal, hogy ezen két fehérje foszforilálása valószínűleg közvetlen, de PKD-függő módon is megtörténhet (22. C ábra).

A PKD-specifikus gátlószer alkalmazása az össz-NFkB szintet mind a Western blottal (22. C ábra), mind pedig az immuncitokémiai elemzéssel történő kimutatás során csökkentette (a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében megnövekedett jelintenzitást a nukleáris és a citoplazmás területeken egyformán csökkentette) (23. B ábra). Mindezek fényében kizárhatjuk, hogy az oxidatív stressz alatt tapasztalt, PKD-függő neuroprotektív hatás az NFkB útvonal aktiválásán és az NFkB nukleáris transzlokációjának következtében megváltozó transzkripciós változások miatt következne be.



23. ábra. Az NFkB szint változása a nukleáris és a citoplazmatikus sejtfrakcióban oxidatív stressz alatt. A nukleáris frakcióban a p-NFkB jel nem volt detektálható, míg a a citoplazmatikus frakcióban a pNFkB szint növekedett (A). Az NFkB jel nukleáris transzlokációjának vizsgálata immuncitokémiai kimutatással (B). HeLa sejtekben TNF $\alpha$  kezelésre a nukleáris a-NFkB jelintenzitás szelektíven megnőtt. A neuronokban az oxidatív stressz mind a citoplazmában, mind a sejtmagban fokozta az a-NFkB jel intenzitását, amit a kbNB 142-70-vel való együttes kezelés meggátolt.

Eredményeinkről számos konferencián is beszámoltunk. Egy kéziratunkat a J. Neurochemistry folyóiratnak már beküldtük, egy másikat pedig a szabadalmi kérdéseket követően fogunk befejezni. Az ismertett munka egy jövőre esedékes doktori dolgozat alapját is képezi. Az elmúlt években hallgatóm, Liliom Hanna a munkája bemutatásával számos díjat is nyert.

#### 4. Az autofágia és a PKD aktivitás közötti kapcsolat vizsgálata az Atg8/LC3B fehérjén keresztül

Az eukarióta sejtekben a sejtalkotók szabályozott lebontása a sejt homeosztázisának fenntartása szempontjából alapvető jelentőségű. E folyamatok egyik komponense az autofágia („sejtes önemésztés”), amely során a citoplazma egy részlete izoláló membránba csomagolódik, majd az elkülönített citoplazmatikus beltartalom savas hidrolázok segítségével lizoszómálisan degradálódik. A folyamat az éhezés során energiát és a felépítő folyamatokhoz szükséges alapegységeket szolgáltat a sejt számára. Az autofágia ugyanakkor stressz esetén protektív hatású: egyrészt a sérült sejtalkotók lebontásával megvédi a sejtet a stressz következményeitől, másrészt, ha a sérülés túl nagy mértékű, részt vesz a sejt eliminációjában (ún. autofágiás sejthalál).

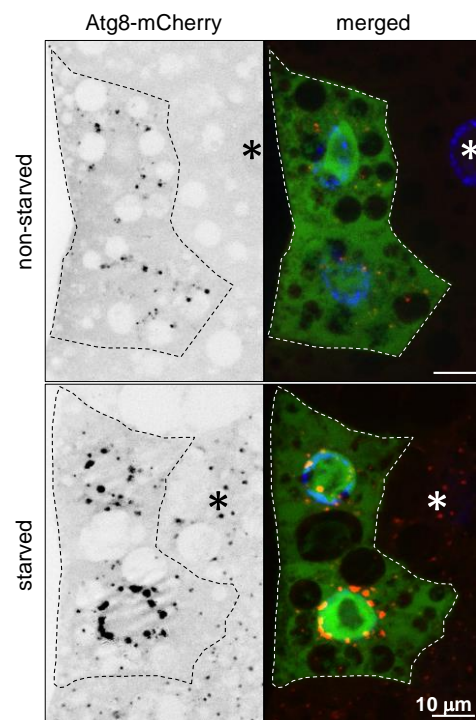
Az idegsejtekben a (makro)autofágia normál állapotban is igen fontos szerepet tölt be, a lizoszómális rendszer, illetve az autofágia közötti kapcsolat sérülése pedig igen sok esetben neurodegeneratív elváltozásokhoz vezet. Éppen ezért fontos volt annak felderítése is, hogy az oxidatív stresszre aktiválódó PKD és az autofágia között van-e kapcsolat, és ez a hatás az idegsejtekre nézve protektív vagy éppen a sejtpusztulást fokozó hatással jár.

##### 4.1. PKD mutáns *Drosophila*-törzsek vizsgálata

A PKD, illetve az autofágia kapcsolatát első lépésként egy jól ismert autofágia modellben, ecetmuslica (*Drosophila m.*) lárvális zsírtestének lebontása során kívántuk vizsgálni. Az ELTE Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék munkatársaival együttműködve sikerült olyan PKD mutáns *Drosophila* törzseket kialakítani, amelyekben a PKD géncsökkentését lehetővé tevő siRNA expressziója lárva-stádiumtól függő módon, a GAL4 rendszerrel szabályozható, a csökkentett sejtek pedig a GFP fluoreszcencia alapján azonosíthatóak (UAS-dsPKD-EGFP; **24. ábra**).

Az így kialakított legyekben a zsírsejtekben lezajló autofágia folyamatát a bebábozódást megelőzően (L32 lárvastádium) ellenőriztük. Ehhez a PKD csökkentett mutánsokat olyan legyekkel kereszteztük össze, amelyek az Atg8 mCherryvel jelzett változatát termelik (Atg8-mCherry). Az Atg8 fehérje alapvető jelentőségű az izoláló membrán kijelölésében/kialakításában. Mivel makroautofágia és mitofágia során a citoplazmatikus Atg8 C-terminálisa az autofagoszóma membránban képződő foszfatidil-etanolaminhoz kapcsolódik, az Atg-mCherry-t termelő állatokban a piros fluoreszcens jel felhalmozódása az autofágia fokozódását, így az autofagoszóma számának és/vagy méretének növekedését jelzi.

Mikroszkópos megfigyeléseink szerint normál tápanyagellátásnál a PKD géncsökkentése (zöld sejtek) az Atg8-mCherry pozitív struktúrák felhalmozódásához vezet, míg a kontroll, nem csökkentett sejtekben ilyenek alig fordultak elő. Mindez utalhat arra, hogy a PKD a normálisan lejátszódó autofágia során szabályozó szerepet tölt be (**24. ábra**). A lárvák éheztetése esetén a kontroll zsírsejtekben is számos Atg8-mCherry pozitív depozit figyelhető meg, összhangban az autofágia aktivációjával. A PKD csökkentése esetén (zöld sejtek) azonban igen nagy Atg8 pozitív struktúrák jönnek létre. Mindez utalhat arra, hogy az endogén PKD fehérje hiányában az autofágia adott stádiumban megreked és a lizoszómális degradáció nem tud megfelelően lezajlani (Nagy és mtsai., 2015).



**24. ábra.** Atg8-mCherry autofágia marker felhalmozódása éheztetett és nem éheztetett állapotban ecetmuslica lárvális zsírsejtjeiben PKD csökkentést követően. Az UAS-dsPKD-EGFP (zöld) csökkentő konstrukció mozaikosan fejeződik ki. Az Atg8-mCherry jel (invertált kép, ill. piros) az autofagoszóma membránjához kapcsolódva halmozódik fel. A sejtmagokat DAPI festés (kék), a csillag a nem csökkentett, kontroll sejteket jelöli.

#### 4.2. Az endogén PKD aktivitás hatása emlős idegsejtek LC3B-II szintjére

Kíváncsiak voltunk arra, hogy az endogén PKD aktivitás az autofágia marker fehérjék mennyiségét emlős sejtekben befolyásolja-e. Idegsejtekben ezért Western blot technikával vizsgáltuk a *Drosophila* Atg8 ortológ LC3B-I és II szintjét.

Nem neuronális, pl. HeLa sejtekhez viszonyítva az LC3B-I és II szintje idegsejtekben igen magas volt (nincs bemutatva). A PKD-specifikus gátlószer, a kbNB 142-70 jelenlétében az LC3B-II/LC3B-I arány lecsökkent (a kontroll tenyészetek értékeihez viszonyítva  $28,8 \pm 15\%$ ). Mindez arra utal, hogy az endogén PKD aktivitás emlős idegsejtekben is hatással van az autofág folyamatokra.

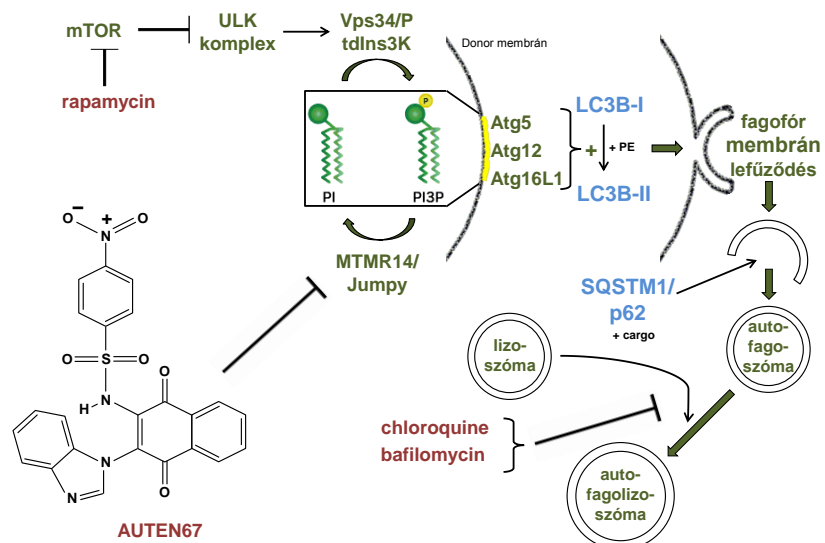
A fenti sejtésünket Eisenberg-Lerner és Kimchi 2012-ben megjelent tanulmánya bizonyította: emlős rendszerben közvetlen kapcsolatot találtak az izoláló membrán kialakításában alapvető jelentőségű Vps34 lipid kináz és a PKD között. Így a PKD a Vps34 foszforilációján és aktiválásán keresztül közvetlenül szabályozhatja az autofagoszóma kialakulását.

Mivel az autofágia PKD-függő szabályozását a részletekbe menően feltárták, kutatásainkban ezzel az iránnyal felhagytunk és az idegsejtekben zajló, magas szintű autofágia, illetve az oxidatív stressz kapcsolatára koncentráltunk.

#### 5. Az autofágia és az oxidatív stressz közötti kapcsolat vizsgálata

Az idegsejtekben a (makro)autofágia normál állapotban is igen fontos szerepet tölt be, a lizoszómális rendszer, illetve az autofágia közötti kapcsolat sérülése pedig igen sok esetben neurodegeneratív elváltozásokat vált ki. A túlpörgetett autofágia ugyanakkor a sejtek önmérsztéséhez és pusztulásához is vezet. Éppen ezért a sejtek életképességének megőrzéséhez, illetve a külső, toxikus folyamatok kivédéséhez az autofágia finom szabályozására van szükség.

Az autofágia folyamatának nyomon követését számos marker fehérje változása is segíti (25. ábra). Az LC3B az Atg8 emlős orthológja, az autofág vakuólum izoláló membránjának kialakításában játszik szerepet. Az autofág folyamatok során az LC3B „lipidálódik”, így a kialakuló LC3B-II forma aránya a citoplazmatikus LC3B-I formához viszonyítva változik. Ha az autofágia intenzív, a további lebomló folyamatok miatt az LC3B-II relatív és össz-



25. ábra. Az autofágia folyamatát jelző markerfehérjék (kék), illetve a folyamatra ható gátló- és indukálószer (barna) vázlatos bemutatása.

mennyisége is csökkenni fog. Ha az autofágia későbbi folyamatai gátló (pl. chloroquine vagy bafilomicin kezelés esetén), akkor az LC3B-II felhalmozódik.

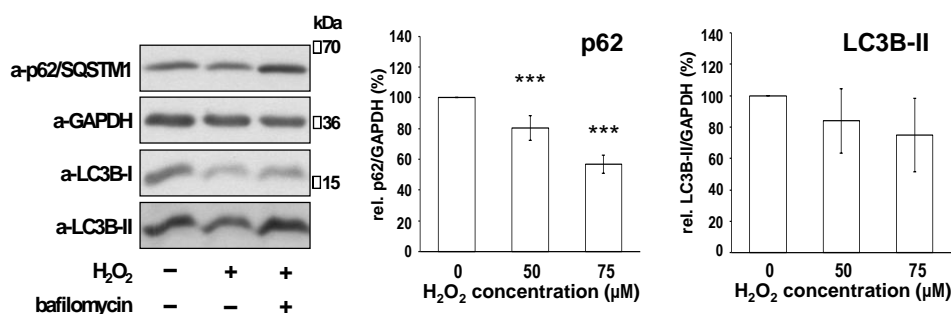
Egy másik, általánosan vizsgált marker fehérje a p62/SQSTM1 fehérje, amely a kialakuló autofagoszómba irányuló transzportban vesz részt és lebomlása autofágia-függő. Ezért mennyiségének csökkenése a megnövekedett autofágiás fluxusra utal. Az LC3B-II-höz hasonlóan viszont mennyisége fokozódik, ha az autofagolizoszómák kialakulása gátlódik.

Egyre több adat támasztja alá, hogy az autofágia genetikai vagy farmakológiai módszerekkel történő fokozása a sejten belüli toxikus anyagok felhalmozódását lelassítja és egyes modellszervezetekben (pl. *Drosophila*-ban és *C. elegans*-ban) az élettartamot is megnyújtja. Az autofágia fokozására eddig használt eljárások azonban elsősorban a központi, TOR (target of

rapamycin) kináz útvonal upstream aktivátorai, így számos mellékhatással is rendelkeznek. Vellai Tibor munkacsoportja (ELTE Genetikai Tanszék) ezért másik megközelítést választott: olyan kis molekulájú inhibitorokat kerestek, amelyek az autofagoszóma membránformálódását antagonizáló Jumpy/MTMR14 foszfatázt gátolják. Ez a megközelítés a TOR útvonal alatti, az autofagoszóma formálódást elősegítő hatást jelent, így szelektívebben, szerteágazó mellékhatások nélkül tudja az autofág aktivitást fokozni.

### 5.1. Az oxidatív stressz során az autofágiás flux fokozódik

Az idegsejtenyészetekben hidrogén peroxid kezeléssel kiváltott oxidatív stressz során vizsgáltuk az autofág folyamatok változását. Az 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelés 24 h alatt kb. 50%-os sejtpusztulást váltott ki a tenyészetekben. Ezekben a sejtekben az autofágiás flux-ot a p62 és az LC3B-II szint csökkenése, illetve a bafilomicin jelenlétében tapasztalt felhalmozódásuk jelezte. Ha a nagyobb mértékű sejtpusztulást okozó, 75  $\mu\text{M}$ -os  $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelést alkalmaztunk, az autofágia fokozódását szintén megfigyeltük (26. ábra).



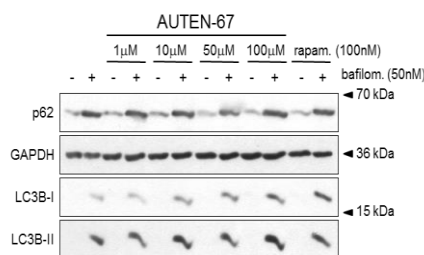
26. ábra. Oxidatív stressz hatására az autofágia idegsejtekben fokozódik.

### 5.2. Az MTMR14/Jumpy foszfatáz inhibitorok az autofágiát indukálják

Idegsejtenyészeteken végzett kísérleteink során 3 potenciális Jumpy/MTMR14 gátló anyagot teszteltünk, ezek közül az AUTEN-67 és AUTEN-99 nevezetű bizonyultak hatékonynak. Mivel az idegsejtekben mindkét foszfatáz inhibitor hasonló változásokat váltott ki, a beszámolóban főleg az AUTEN-67 eredményeket mutatjuk be.

#### 5.2.1. A HeLa sejtekben normálisan alacsony szintű autofágiát az AUTEN-67 és az AUTEN-99 jelentősen fokozza

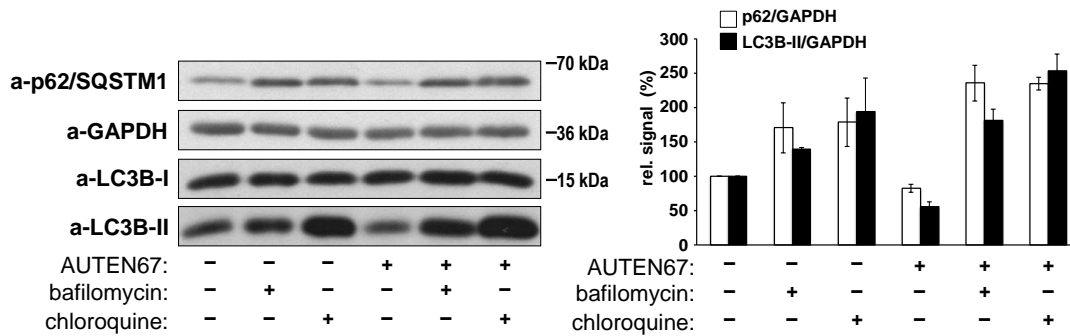
HeLa sejtekben az autofágia igen alacsony szintű volt, bafilomicin nélkül az LC3B-I és II szintje nem volt detektálható (27. ábra). AUTEN-67 esetében az autofágiás flux fokozódását egyrészt a p62 fehérje koncentráció-függő lebomlása, másrészt az LC3B-II bafilomicin jelenlétében megfigyelt, koncentráció-függő felhalmozódása bizonyítja.



27. ábra. AUTEN-67 hatása az autofágiás fluxra HeLa sejtekben.

#### 5.2.2. Az idegsejtekben normál körülmények mellett is igen aktív autofágia folyik, amit az AUTEN-67 és AUTEN-99 tovább fokoz

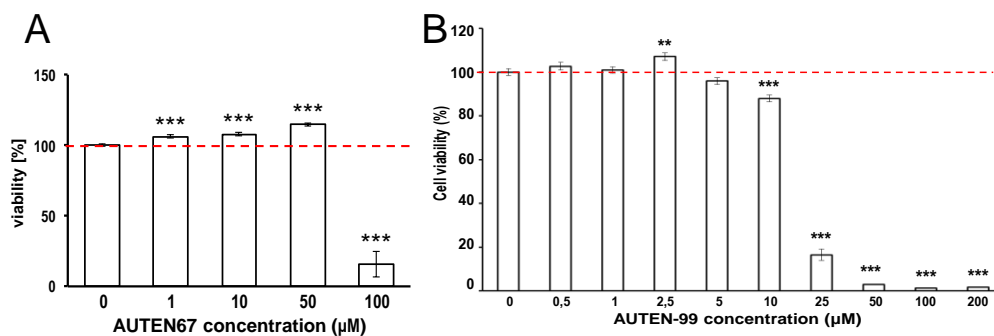
Igazolni tudtuk, hogy az idegsejtekben bármilyen kezelés nélkül is igen magas az LC3II aránya – ez az ún. „housekeeping” autofágia jelentőségét jelzi az idegsejtekben (28. ábra). A HeLa sejtekben tapasztaltakhoz hasonlóan az AUTEN-67 az idegsejtekben is jelentősen növelte az autofágia mértékét, amit a p62 és az LC3B-II szint csökkenése jelezte. Amennyiben az autofagoszóma és a lizoszóma összeolvadását gátló bafilomicinnel vagy chloroquinnel is kezeltük a tenyészeteket, a vizsgált marker fehérjék mennyisége jelentősen megnőtt. Ezt a hatást az AUTEN-67 még tovább fokozta. Mindezek bizonyítják, hogy a vizsgált MTMR14 foszfatáz gátlók az idegsejtekben igen hatásosan fokozzák az autofágiát (28. ábra).



28. ábra. Az AUTEN-67 hatása az idegsejtekben megfigyelhető autofágia mértékére.

### 5.3. Az MTMR14/Jumpy foszfatáz inhibitorok a kezeletlen sejtek életképességét egy határig növelik, ezen felül viszont toxikusak

Fontos megfigyelésünk volt, hogy az AUTEN-67 és AUTEN-99 a normál körülmények mellett tenyésztett idegsejtek életképességét koncentráció-függő módon fokozza (29. ábra). Az AUTEN-67 50  $\mu$ M, az AUTEN-99 pedig 2,5  $\mu$ M koncentrációig serkentő, míg e fölött toxikus hatást fejtett ki. Mindez nem meglepő, hiszen az autofágia túlpörgetése a sejtek túlélésére káros.

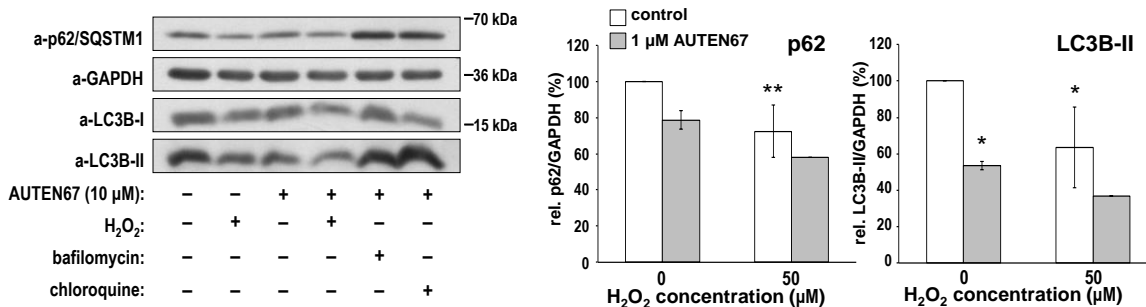


29. ábra. Az AUTEN-67 és az AUTEN-99 koncentráció-függő hatása az idegsejtek életképességére. MTT életképességi tesztek eredménye.

### 5.4. Az MTMR14/Jumpy foszfatáz inhibitorok az oxidatív stressz során neuroprotektív hatásúak

#### 5.4.1. Az AUTEN-67 és az AUTEN-99 a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatására megemelkedő autofágia mértékét az idegsejtekben fokozza

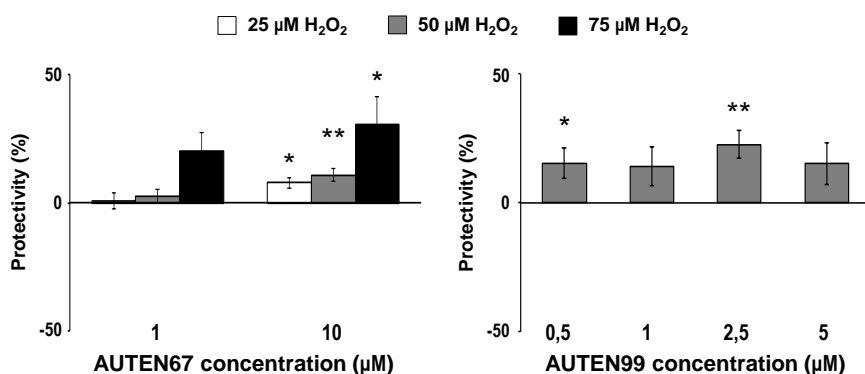
A foszfatáz inhibitorok hatását oxidatív stressz alatt is megvizsgáltuk. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés az autofágia mértékét a már ismertetett módon fokozta (26. ábra). Az autofágiás flux mértékét a foszfatáz gátlók még tovább növelték, hiszen mind a p62, mind pedig az LC3B-II szintje tovább csökkent (30. ábra).



30. ábra. Az oxidatív stressz hatására fokozódó autofágiás aktivitást az AUTEN-67 jelenléte tovább fokozza.

#### 5.4.2. Az AUTEN-67 és az AUTEN-99 az idegsejtekben az oxidatív stressz következményében kialakuló sejtpusztulást csökkentik

A szerek protektivitását életképesség-méréssel teszteltük, ahol az foszfatáz gátlók és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében mért értékeket a csak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -dal kezelt tenyészetek értékeihez viszonyítottuk. Több, független kísérlettel is bizonyítottuk, hogy az oxidatív stressz során mind az AUTEN-67, mind pedig az AUTEN-99 koncentráció-függő módon neuroprotektív hatású (31. ábra).



**31. ábra.** Az AUTEN-67 és az AUTEN-99 is csökkenti az oxidatív stressz következtében kialakuló sejtpusztulás mértékét.

Kooperációban elvégzett kísérletekkel mások azt is bizonyították, hogy az AUTEN-67 és az AUTEN-99 alkalmazása az idegsejtek túlélését, működését in vivo, állatmodellekben is fokozza. Az Alzheimer kór egyik állatmodelljeként szolgáló, a humán amyloid prekursor proteint (APP-t) termelő transzgenikus egerekben az AUTEN-67 kezelés az amiloid plakkok kialakulását lassította, az állatok fészek-építési és gondoskodási hajlamait pedig fokozta. Az AUTEN-99 Drosophila Huntington modellekben a neurodegeneratív elváltozások akkumulációját jelentősen lassította, illetve a Parkinson kór modelljeként ismert Parkin mutáns legyek reflexműködését jelentősen javította.

Mindezek alapján az MTMR14/Jumpy foszfatáz inhibitorok az autofágia mértékét jelentősen fokozzák és több vizsgált modellben is neuroprotektív hatást mutattak. Mindezek fényében ezek az anyagok akár potenciális neuroprotektív szerek is lehetnek.

Eredményeinkről több konferencián is beszámoltunk. Az AUTEN-67 induktorral kapcsolatos eredmények az *Autophagy* folyóiratban már megjelentek, az AUTEN-99 eredmények közzlése még folyamatban van (a kézirat jelenleg elbírálás alatt áll).

## Hivatkozások

- Castro-Chavira SA, Aguilar-Vázquez AR, Martínez-Chávez Y, Palma L, Padilla-Gómez E, Diaz-Cintra S. (2015) Effects of chronic malnourishment and aging on the ultrastructure of pyramidal cells of the dorsal hippocampus. *Nutritional Neuroscience* in press; DOI: 10.1179/1476830515Y.0000000009
- Czondor, K., Ellwanger, K., Fuchs, Y. F., Lutz, S., Gulyas, 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**, 2108-20.
- Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. (2012) PKD is a kinase of Vps34 that mediates ROS-induced autophagy downstream of DAPk. *Cell Death Differ.* 19(5):788-97.
- Hausser, A., Storz, P., Martens, S., Link, G., Toker, A. & Pfizenmaier, K. (2005) Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 7, 880-6.
- Listwak SJ, Rathore P, Herkenham M. (2013) Minimal NF-κB activity in neurons. *Neuroscience.* 250:282-99.
- Nagy P, Varga Á, Kovács AL, Takáts S, Juhász G. (2015) How and why to study autophagy in *Drosophila*: it's more than just a garbage chute. *Methods.* 75:151-61.
- Sin YY1, Baillie GS. (2012) Protein kinase D in the hypertrophy pathway. *Biochem Soc Trans.* 40(1):287-9. doi: 10.1042/BST20110626.
- Storz P, Döppler H, Toker A. (2004) Activation loop phosphorylation controls protein kinase D-dependent activation of nuclear factor kappaB. *Mol Pharmacol.* 66(4):870-9.
- Suzuki K, Bose P, Leong-Quong RY, Fujita DJ, Riabowol K. (2010) REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Res. Notes.* 3:294.
- Varga A, Gyulavári P, Greff Z, Futosi K, Németh T, Simon-Szabó L, Kerekes K, Szántai-Kis C, Brauswetter D, Kokas M, Borbély G, Erdei A, Mócsai A, Kéri G, Vántus T (2015). Targeting vascular endothelial growth factor receptor 2 and protein kinase D1 related pathways by a multiple kinase inhibitor in angiogenesis and inflammation related processes in vitro. *PLoS One* 10, e0124234.



## **A kutatási témához kapcsolódó publikációk**

### ***megjelent / elfogadott közlemények***

1. Tárnok K, Gulyás M, Bencsik N, Ferenc K, Pfizenmaier K, Hausser A, Schlett K. (2015) A new tool for the quantitative analysis of dendritic filopodial motility. *Cytometry A*. 87(1):89-96. 2,928 IF
2. Bencsik N, Szíber Zs, Liliom H, Tárnok K, Borbély S, Gulyás M, Rátkai A, Szűcs A, Hazai-Novák D, Ellwanger K, Rácz B, Pfizenmaier K, Hausser A, Schlett K. (2015) Protein kinase D promotes synaptic plasticity by regulating actin dynamics in dendritic spines. *J Cell Biol*. 210(5):771-83. 9,834 IF
3. Papp D, Kovács T, Billes V, Varga M, Tarnóci A, Hackler L, Puskás LG, Liliom H, Tárnok K, Schlett K, Borsy A, Pádár Z, Kovács AL, Hegedűs K, Juhász G, Komlós M, Erdős A, Gulyás B, Vellai T. (2015) AUTEN-67, an autophagy-enhancing drug candidate with potent anti-aging and neuroprotective effects. *Autophagy*; in press 11,753 IF

### ***benyújtott / készülő közlemények***

1. Kovács T, Billes V, Komlós M, Hotzi B, Papp D, Tarnóci A, Manzóger A, Rácz Á, Noszál B, Hackler L Jr., Alföldi R, Huzian O, Puskás L G., Liliom H, Tárnok K, Schlett K, Borsy A, Welker E, Kovács A, Pádár Zs, Erdős A, Vellai T. The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms. elbírálás alatt.
2. Liliom H, Tárnok K., Ábrahám Zs., Schlett K. Protein kinase D exerts neuroprotective functions during oxidative stress in neurons independently from the NFκB pathway. közlésre benyújtva
3. Szíber Zs., Tóth K., Ignác A, Hausser A, Schlett K. Protein kinase D regulates AMPA receptor turnover in neurons. közlésre benyújtva
4. Liliom H, Tárnok K, Varga A, Órfi L, Kéri G, Vántus T, Schlett K. A novel kinase inhibitor, VCXXX acts as a neuroprotective agent. kézirat készítés alatt

### ***konferencia részvételek***

1. Tárnok, K., Szilágyi L., Berki, T., Németh, P., Gráf L., Schlett, K. Anoxia leads to a rapid translocation of human trypsinogen 4 to the plasma membrane of cultured astrocytes IBRO International Workshop, Pécs, Hungary, 2010
2. Braun G., Vajda F., Tárnok K., Ellwanger K., Schlett K., Neurodegenerative consequences of Protein Kinase D inactivation in hippocampal neurons. IBRO International Workshop, Pécs, Hungary, 2010
3. Szórádi, T.; Klacsmann, F.; Vajda, F.; Tárnok, K.; Schlett, K., Intracellular distribution and axonal transport of PKD in neurons Magyar Idegtudományi Társaság XIII. Konferenciája, Budapest, 2011
4. Liliom H, Braun G, Tárnok K, Varga A, Órfi L, Kéri G, Vántus T, Schlett K Changes in Protein kinase D activity during neurotoxic treatments. Magyar Idegtudományi Társaság XIII. Konferenciája, Budapest, 2011
5. Szórádi T., Vajda F., Tárnok K., Schlett K. The axonal transport of protein kinase D and its role in the selective protein distribution. IBRO konferencia, Szeged, 2013
6. Tárnok, K; Liliom, H; Varga, A; Kéri, G; Vántus, T; Schlett, K; The role of protein kinase D activation in response to oxidative stress- induced neuronal cell death. Molekuláris Élettudományi konferencia, Siófok, 2013
7. Bencsik, N; Gulyás, M; Hazai, D; Tárnok, K; Hausser, A; Rácz, B; Schlett, Kt: Inactivation of protein kinase D activity alters dendritic spine morphology, motility and hippocampal functions. Molekuláris Élettudományi konferencia, Siófok, 2013

8. Bencsik, N; Gulyás, M; Hazai, D; Tárnok, K; Hausser, A; Rácz, B; Schlett, K; Inactivation of protein kinase D activity alters dendritic spine morphology and motility. Magyar Idegtudományi Társaság XIV. Konferenciája, Budapest, 2013
9. Liliom, H; Tárnok, K; Varga, A; Kéri, G; Vántus, T; Schlett, K; The role of protein kinase D activation in response to oxidative stress- induced neuronal cell death. Magyar Idegtudományi Társaság XIV. Konferenciája, Budapest, 2013
10. Szíber, Z; Szórádi, T; Tárnok, K; Hausser, A; Schlett, K; Role of protein kinase D in polarized sorting of neuronal membrane proteins. Magyar Idegtudományi Társaság XIV. Konferenciája, Budapest, 2013
11. Tárnok K., Gulyás M., Bencsik N., Ferenc K., Pfizenmaier K., Hausser A., Schlett K. Analyzing dendritic spine movement in cultures: a fast and effective way to identify regulatory pathways influencing spine motility and maintenance IBRO International Workshop, Debrecen, Hungary, 2014
12. Schlett, K; Szíber, Z; Liliom, H; Tárnok, K; Borbély, S; Gulyás, M; Hazai-Novák, D; Ellwanger, K; Rácz, B; Pfizenmaier, K; Hausser, A; Protein kinase D promotes cellular plasticity and memory formation by regulating actin dynamics in dendritic spines. Magyar Idegtudományi Társaság XV. Konferenciája, Budapest, 2015
13. Tóth K, Szíber Z, Szórádi T, Hausser A, Schlett K Investigating the relationship between protein kinase D and the endocytosis of transferrin receptor . Magyar Idegtudományi Társaság XV. Konferenciája, Budapest, 2015
14. Tárnok K, Liliom H, Hausser A, Schlett K. A protein kináz D szerepe az idegsejtek oxidatív stresszre adott válasza során. 45. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg 2015
15. Liliom H, Tárnok K, Kovács T, Vellai T, Schlett K. Az autofágia aktivációja neuroprotektív hatású az idegsejteket érő oxidatív stressz során. 45. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg 2015
16. Bencsik N, Szíber Z, Liliom H, Tárnok K, Borbély S, Gulyás M, Rátka i A, Hazai-Novák D, Ellwanger K, Rácz B, Pfizenmaier K, Hausser A, Schlett K A protein kináz D a dendrittűskék aktin vázrendszerének stabilizálásán keresztül szabályozza a neuronális plaszticitást és a tanulási folyamatokat 45. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg 2015
17. Szíber Z, Tóth K, Szórádi T, Hausser A, Schlett K A protein kináz D szerepe a neuronális transzmembrán receptorok körforgásában 45. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg 2015
18. Liliom H, Tárnok K, Krutilla Cs, Hausser A, Schlett K. Protein kinase D exerts neuroprotective functions during oxidative stress via NFkappaB-independent pathways. IBRO Workshop Budapest 2016
19. Szíber Z, Tóth K, Hausser A, Schlett K Protein kinase D regulates neurotransmitter receptor turnover in hippocampal neurons IBRO Workshop Budapest 2016

### ***PhD dolgozatok***

1. Bencsik Norbert: A protein kináz D a dendrittűskék aktin vázrendszerének stabilizálásán keresztül szabályozza a neuronális plaszticitást és a tanulási folyamatokat. bírálólat alatt
2. Szíber Zsófia: A protein kináz D szerepe a neuronális transzmembrán receptorok körforgásában. tervezett benyújtás 2016. ősz
3. Liliom Hanna: A protein kináz D neuroprotektív szerepének feltárása. tervezett benyújtás 2017. ősz

### ***MSc dolgozatok***

1. Szórádi Tamás: A protein kináz D axonális transzportja és membránfehérjék eloszlására gyakorolt hatása. Eötvös Loránd Tudományegyetem, biológus MSc (témavezető Schlett K) 2012
2. Liliom Hanna: How altered PKD activity regulates neuronal cell survival during oxidative stress. Eötvös Loránd Tudományegyetem, biológus MSc (témavezető Schlett K) 2013
3. Gulyás Márton: Dinamika és stabilitás a dendrittűskékben. Pázmány Péter Katolikus Egyetem, info-bionikus mérnök MSc (témavezető Schlett K), 2014
4. Ábrahám Zsófia: Az oxidatív stressz által kiváltott protein kináz D aktivitás detekciós lehetőségei. Eötvös Loránd Tudományegyetem, biológus MSc (témavezető Tárnok K), 2014

5. Vancsik Tamás: Az oxidatív stressz és az autofágia kapcsolata idegsejtekben. Eötvös Loránd Tudományegyetem, biológus MSc (témavezető Tárnok K), 2014
6. Tóth Krisztina: A protein kináz D szerepe a receptor-mediált endocitózis szabályozásában idegsejtekben. Eötvös Loránd Tudományegyetem, biológus MSc (témavezető Schlett K), 2015

#### ***Hallgatói szakmai versenyek, eredmények***

1. Szórádi Tamás: A protein kináz D axonális transzportra gyakorolt hatásának vizsgálata. ELTE Biológus TDK Konferencia, 2011 – 1. helyezés
2. Liliom Hanna: A protein kináz D aktivitásának változása neurodegeneráció során. ELTE Biológus TDK, 2011 – 2. helyezés
3. Liliom Hanna: A protein kináz D aktiváció szerepe az oxidatív stresszel kiváltott neuronális sejtpusztulás során. ELTE Biológus TDK, 2012 – 1. helyezés
4. Liliom Hanna: A protein kináz D aktiváció szerepe az oxidatív stresszel kiváltott neuronális sejtpusztulás során. Országos Biológus TDK, 2013 – 1. helyezés

#### ***Díjak/elismerések***

1. Szórádi T., Klacsmann F., Vajda F., Tárnok K., Hausser A., Schlett K. (2011) Intracellular distribution and axonal transport of PKD in neurons. IBRO Meeting, Budapest. – a legjobb hallgatói poszter prezentáció díja
2. Bencsik N, Szíber Zs, Tárnok K, Borbély S, Gulyás M, Liliom H, Hazai-Novák D, Ellwanger K, Rácz B, Pfizenmaier K, Hausser A, Schlett K. (2015) Protein kinase D promotes synaptic plasticity by regulating actin dynamics in dendritic spines. MembránTranszport Konferencia, Sümeg; poszter különdíj és előadás tartása
3. Liliom H, Tárnok K, Kovács T, Vellai T, Schlett K. (2015) Az autofágia aktivációja neuroprotektív hatású az idegsejteket érő oxidatív stressz során. Membrán transzport Konferencia, Sümeg; poszter; poszter különdíj és előadás tartása