

# **Proliferáció és transzport folyamatok vizsgálata epitéliális mirigyekben**

Doktori tézisek

**Dr. Szűcs Ákos**

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Varga Gábor egyetemi tanár, az MTA doktora  
Hivatalos bírálók: Dr. Kecskeméti Valéria, egyetemi tanár  
Dr. Hegyi Péter, Ph.D., tudományos főmunkatárs  
Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Flautner Lajos egyetemi tanár, az orvostudományok doktora  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Simon György egyetemi tanár  
Dr. Pap Ákos, egyetemi magántanár, az orvostudományok doktora

**Budapest**

**2008**



## **BEVEZETÉS**

Az emésztőcsatorna felső szakaszán az enzimatikus folyamatok lezajlásához az adott pH biztosításában szerepet játszik a nyálmirigy és hasnyálmirigy epitélisejtjei által termelt bikarbonátban gazdag alkalikus nedv. A szekréción folyamatok rendellenességei az emésztési folyamat súlyos zavarához vezetnek. A mirigyek veleszületett rendellenességeinél (pl. ciszikus fibrózis, Sjögren szindróma) a csökkent bikarbonát szekréción sűrű, viszkózus nedvelválasztást eredményez. A kialakult nyákdugó a kivezetőcsöveket elzárva károsítja az emésztési funkciókat és következményes krónikus gyulladáshoz vezet. A bikarbonát elválasztás mechanizmusának megértéséhez számos állatkísérletes modell áll rendelkezésünkre, azonban az emberben zajló transzportfolyamat és annak regulációja nem tisztázott. Hasonlóképpen keveset tudunk a szekréciónban részt vevő regulátorok szerepéről ezen sejtek proliferációs folyamatainak szabályozásában. Noha a gasztrointesztinális (GI) traktus szekréción működésében szerepet játszó hormonszerű anyagokat korábban kizárólag endokrin eredetű termékeknek tartottuk, mára már világos, hogy a szekréción szabályozó hormonális hatásokon túl autokrin, vagy parakrin módon hatva, GPCR-en keresztül aktiválódó szerin-treonin kinázok (ERK és MAPK) stimulációja által fontos szerepet játszanak számos sejtszintű folyamat, így a normális és daganatos sejtproliferáción szabályozásában is. Ezen megfigyelésekből kiindulva érthető, hogy a gasztrointesztinális regulátorok vizsgálata nem csak a mirigyek egyes krónikus gyulladós megbetegedéseinek, hanem akár a daganatos kórképeinek kezelésében is terápiás lehetőségek megismeréséhez vezethet. Mivel normál emberi szövetek funkcionális vizsgálatokhoz gyakorlatilag nem gyűjthetők kellő mennyiségben, vizsgálati modellként kézenfekvő lehet olyan emberi nyálmirigy és hasnyálmirigy adenokarcinómákból származó sejtvonalak alkalmazása, melyek polarizált monolayer-ben növekednek, illetve fenotípus tekintetében a natív szövetre rendkívül hasonlítanak. Tanulmányoztuk tehát az epitélialis bikarbonát- és folyadékszekeréciónját nyálmirigy - és hasnyálmirigy eredetű daganatos sejtvonalakon (Par-C10 és Capan-1), vizsgáltuk a hasnyálmirigy daganatos sejtvonalak (Panc-1) proliferációs folyamataiban szerepet játszó protein-kináz C (PKC) és az extracelluláris jelvezérelt kináz (ERK) működésének mechanizmusait, valamint kutattuk a gasztrointesztinális peptidok szerepét ezen folyamatokban szabályozásában.

## **CÉLKITUZÉSEK**

Jelen tanulmány céljai az alábbiak voltak:

1. modellrendszer felállítása az epitéliális mirigyek duktális transzportfolyamatainak vizsgálatára
2. gasztrointesztinális peptidek szerepének vizsgálata epitéliális mirigyek bikarbonát szekréciójának szabályozásában
3. purinerg jelátviteli rendszer szerepének vizsgálata epitéliális mirigyek bikarbonát szekréciójának szabályozásában
4. gasztrointesztinális peptidek szerepének vizsgálata emberi hasnyálmirigy daganatos sejtek differenciációjának szabályozásában
5. PKC izoformák szerepének vizsgálata a sejtosztódás szabályozásában és az ERK aktivációban emberi hasnyálmirigy daganatos sejtvonalon
6. az ERK aktiváció kinetikájának vizsgálata a proliferáció szabályozásában emberi hasnyálmirigy daganatos sejtvonalon

## MÓDSZEREK

- 1. Sejtenyésztés:** A **Par-C10** sejtvonal David Quissell laboratóriumából származik, a **Capan-1** sejteket az American Type Culture Collection-ból vásároltuk. A mikrofluorometriás mérésekhez  $5 \times 10^5$  sejtet ültettünk ki egy kollagénnel fedett és natúr PTFE membránra (Transwell COL és CLEAR). A kísérleteket 3-5 nap elteltével végeztük, amikor a monolayer transzepiteliális ellenállása (TER) szignifikáns mértékben megemelkedett. Emberi CCK1 receptorral transzfektált Panc-1 sejteket Dr. Craig D. Logsdontól kaptuk és Dulbecco's Modified Eagle Mediumban (Sigma) tenyésztettük 10% magzati borjúsérum (FBS) és 200  $\mu\text{g/ml}$  G418 hozzáadásával 37°C-on, 5%  $\text{CO}_2$  tartalmú közegben.
- 2. RT-PCR:** TRI reagens segítségével total RNS-t izoláltunk **Capan-1** sejtekből. Human pancreasból, agyból és veséből származó total RNS-t használtunk pozitív kontrollként. Az RNS-ből SuperScript II enzim és oligo(dT) primerek felhasználásával cDNS-t készítettünk, majd a tervezett PCR primerekkel amplifikáltuk, a kiválasztott transzporterekkel való specificitást biztosítására. A PCR-t *Taq* polimeráz alkalmazásával végeztük. A PCR termékeket agaróz gélen futtattuk. Belső kontrollként XS13 riboszómális foszfoproteint használtunk.
- 3. Intracelluláris pH ( $\text{pH}_i$ ) mérése:** Az intracelluláris pH-t mikrofluorometriás módszerrel mértük. A konfluens monolayereket HEPES pufferben oldott pH-szenzitív fluoreszcens anyaggal, BCECF-AM-mel töltöttük. Ezután a membránt nyitott perfúziós kamrába helyeztük, melyben lehetőség nyílt a monolayer két oldalának szeparált perfúziójára. Az egész kamrát egy Nikon inverz mikroszkóp objektívje alatt helyeztük el. A kamrát perisztaltikus pumpa segítségével perfundáltuk, állandó 37 °C-os hőmérsékleten tartottuk. Az epitélium kis részletét 440 és 490 nm hullámhosszú fényel váltakozva megvilágítottuk és a fluoreszcens intenzitást ( $F_{440}$  és  $F_{490}$ ) mértük 530 nm-en. Az intracelluláris pH-t az  $F_{490}/F_{440}$  arányból számoltuk. A rendszer kalibrálását Thomas szerint nigericin/ $\text{K}^+$  módszerrel végeztük. A mért intracelluláris pH változásának intenzitását (meredekségét) a számítógéppel illesztett egyenes segítségével határoztuk meg.
- 4. Immunhisztokémia:** A **Capan-1** sejteket 10-14 napon át Transwell-COL membránon tenyésztettük, majd 10 percen keresztül paraformaldehiddel szobahőmérsékleten fixáltuk. A fixálást követően háromszor mostuk Tris pufferoldattal, 0,5%-os Triton-X-100 oldattal 7 percig kezeltük, majd ismét mostuk. A sejteket ezután 2%-os kecske sérumban és 2% BSA-ban egy órán át szobahőmérsékleten kezeltük, majd egy éjszakán át 4°C-on a primer antitestekkel inkubáltuk. Az egérből származó monoklonális anti-occludint (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) 1:50-es hígításban alkalmaztuk és FITC-cel (Stratech Laboratories, Cambridge, UK) kapcsolt másodlagos egér-ellenes antitest segítségével detektáltuk. A filtereket TBS-ben mostuk, majd propidium-jodidot tartalmazó Vectashield médiumba helyeztük (Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, England). A képeket konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal készítettük (Nikon Eclipse TE300 mikroszkópra épített Biorad MRC 1024MP). 40-50 db 0.5  $\mu\text{m}$

vastag optikai metszetből származó összetett képeket Confocal Assistant software segítségével dolgoztuk fel.

5. **[<sup>3</sup>H]-timidin-inkorporáció:** A kiültetett **Panc-1C** sejteket ( $2 \times 10^4$ ) 24 lyukú plate-ben egy éjszakán át tenyésztettük. A második napon a tenyésztőoldatot 24 órára szérum-mentes médiumra cseréltük. A sejteket ezután agonisták vagy gátlószerek jelenlétében vagy anélkül további 24 órán át inkubáltuk. A kezelési idő leteltét követően 2 órára  $1 \mu\text{Ci/ml}$  [<sup>3</sup>H]-timidint adtunk a sejtekhez, majd kétszer mostuk hideg foszfát pufferrel (PBS) és triklórecetsavval fixáltuk. A csapadékot  $0.1 \text{ M NaOH}$ -ban oldottuk és mértük a radioaktivitást.
6. **Immunoblotting:** A Panc-1C sejteket 6cm-es csészébe ültettük egységes sejtszámmal ( $4 \times 10^5$  sejt/csésze), egy éjszakán át inkubáltuk, majd 24 óráig szérum-mentes oldatban blokkoltuk. A nyugvó sejteket agonistákkal vagy gátlószerekkel kezeltük. A sejteket hideg foszfát pufferrel öblítettük,  $1 \times$ SDS-PAGE lizáló pufferrel ( $100 \text{ mM TrisHCl pH}6.8$ ,  $1 \text{ mM EDTA}$ ,  $3\% \text{ SDS}$ ,  $5\% \text{ glycerol}$  and  $2\% \text{ 2-mercaptoethanol}$ ) kezeltük, majd  $6\%$ -os (minden PKC izoforma, Raf-1),  $10\%$ -os (ERK2, phospho-ERK, cyclin D1) vagy  $12\%$ -os (p21Cip1) gélen SDS-PAGE elektroforézist végeztünk, majd a fehérjéket polyvinyl difluoride membránra vittük. A blottolást leállítottuk,  $0.1\% \text{ Tween-20}$ -at és  $2\% \text{ ECL Advance Blocking Reagenst}$  tartalmazó Tris-pufferben (TBS) a megfelelően hígított első antitesttel ( $1:5000 \text{ Anti-ACTIVE MAPK}$ -hez és  $1:1000$  a többi antitesthez) kezeltük, mostuk, majd a második antitesttel inkubáltuk. A reakciót Amersham ECL Advance chemiluminescent detektáló rendszerrel jelenítettük meg.

## EREDMÉNYEK

### Szekréción vizsgálatok:

#### *Transzporterek és receptorok kimutatása RT-PCR segítségével*

PCR vizsgálatokkal kimutattuk a kulcsszerepet játszó elektrolit transzporterek mRNS expresszióját (CFTR, NHE1, pNBC1 és NKCC1) normál emberi hasnyálmirigy szövetből, valamint Capan-1 sejtekből származó cDNS-ek alkalmazásával. Kimutattuk ezen kívül a szekretin, VPAC1 és VPAC2 receptor expresszióját. A vizsgált purinoceptorok közül pozitív eredményt kaptunk a P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> és P2Y<sub>6</sub>, valamint P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>4</sub> és P2X<sub>5</sub> receptorok azonosításakor, ugyanakkor P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>6</sub> és P2X<sub>7</sub> receptorok expressziója nem volt kimutatható.

#### *Áteresztő membránon növesztett monolayerek polarizációja*

**Par-C10** patkány parotisz eredetű dagantsejteket Transwell Clear membránon növesztve jelentős növekedés volt megfigyelhető az üres membrán ellenállásához viszonyítva, mely a 3-5. napon érte el tetőpontját. A fentiekől kissé eltérően **Capan-1** sejteket Transwell-COL membránon növesztve a transzepiteliális ellenállást (TEER) folyamatos növekedést követően a 8-12. napon 50-150  $\Omega$  cm<sup>2</sup> között érte el maximumát "áteresztő epitélium" tulajdonságainak megfelelően. Konfokális mikroszkóp segítségével vizsgálva **Capan-1** sejteken kimutattuk, hogy az occludin jelölés – a tight junction kapcsolatok elhelyezkedésének megfelelően - a plazma membrán területére lokalizálódott és a sejtek apikális felszíne közelében jellegzetes hálós megjelenést mutatott.

#### *Bazolaterális Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> kicserélő kimutatása*

Hogy **Capan-1** sejteken a mesterséges acidifikációt követő intracelluláris pH emelkedés Na<sup>+</sup>-mentes perfúziós oldat alkalmazásával gátolható volt. A bazolaterális oldalon visszaadva a Na<sup>+</sup>-ot, az pH<sub>i</sub> 3  $\mu$ M EIPA alkalmazásával teljes mértékben gátolható növekedést mutatott, ami egy Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> kicserélő, nevezetesen a mindenütt jelen lévő NHE1 jelenlétére utal a bazolaterális membránban.

#### *Bazolaterális Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotranszporter kimutatása*

Bikarbonát tartalmú közegben **Capan-1** sejteken ammónium pulzust követően extracelluláris Na<sup>+</sup> elvétele után is kisfokú, de szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető az intracelluláris pH-ban, mely 1  $\mu$ M bafilomycin A<sub>1</sub> alkalmazásával nem volt gátolható. Így annak hátterében a vakuoláris típusú H<sup>+</sup>-ATPáz (V-ATPáz) aktív működése nem valószínűsíthető. Ugyanakkor a fenoménért felelős transzportfolyamat egyelőre tisztázatlan. Capan-1 sejteken a Na<sup>+</sup>-t bazolaterális visszaadását követően az pH<sub>i</sub> 3  $\mu$ M EIPA és 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>DIDS együttes alkalmazásával gátolható gyors emelkedése volt megfigyelhető. Ugyanakkor H<sub>2</sub>DIDS elvételekor az EIPA folyamatos alkalmazása mellett az intracelluláris pH szignifikáns növekedést mutatott. Mindezekből következik, hogy a bazolaterális membránban feltételezhető egy H<sub>2</sub>DIDS-szenzitív, Na<sup>+</sup>-dependens HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-felvevő mechanizmus is, legnagyobb valószínűség szerint az RT-PCR-rel kimutatott Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotranszporter (NBC1).

#### *Bazolaterális Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> kotranszporter kimutatása*

Az ammónium pulzus alatt a hirtelen alkalizációt követő lassú pH csökkenésben egy lehetséges faktorként szerepet játszhat a  $\text{NH}_4^+$  felvétel savanyító hatása, mely a  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  kotranszporter (NKCC1) működésének köszönhető. A  $\text{pH}_i$  csökkenés mértékét az ismert NKCC1 gátlószer, bumetanide jelenlétében mérve az alkalizációt követő lassú acidifikáció mintegy 60%-kal lassult. Mindez igazolja az RT-PCR kísérletekkel kimutatott NKCC1 aktív működését a sejtekben **Capan-1** sejtekben.

#### ***A transzepteliális $\text{HCO}_3^-$ szekréció mérése***

Epiteiális mirigyek duktális sejtjeiben az intracelluláris pH a bikarbonát szekréciós folyamat alatt állandó marad, hiszen a lumenális  $\text{HCO}_3^-$  efflux acidifikáló hatásával egyensúlyt tart a bazolaterális  $\text{HCO}_3^-$  beáramlás alkalizáló effektusa. Ha a bazolaterális bikarbonát utánpótlásért felelős NHE és NBC transzportereket  $2\mu\text{M}$  EIPA and  $500\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DIDS}$  alkalmazásával gátoljuk, a lumenális membránon keresztüli folyamatos  $\text{HCO}_3^-$  efflux következtében a  $\text{pH}_i$  csökken. A  $\text{pH}_i$ -t ábrázoló görbe csökkenésének kezdeti meredeksége tehát szoros összefüggésben áll a  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióval és így ezen meredekség számolása alkalmazható a duktális bikarbonát szekréció vizsgálatára. Kísérleteinkben ezen technikát alkalmazva vizsgáltuk a vektoriális bikarbonát elválasztás fiziológias szabályozó tényezőit **Par-C10** és **Capan-1** sejtek esetében. **Par-C10** sejteken bazolaterális gátlószer alkalmazása kismértékű, de szignifikáns csökkenést eredményezett az  $\text{pH}_i$ -ban a kontrollhoz viszonyítva, egybecsengve azzal a klinikumból ismert ténnyel, hogy nyálmirigy epitelsejtek esetében a bikarbonát szekréció nem stimulált esetben kismértékű, azonban stimuláció hatására többszörösére növekszik. **Capan-1** sejtekben bazolaterálisan alkalmazott  $3\mu\text{M}$  EIPA kismértékű és visszafordítható csökkenést eredményezett az  $\text{pH}_i$ -ban, ugyanakkor a  $\text{pH}_i$  csökkenése szignifikánsan nagyobb volt EIPA és  $500\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DIDS}$  együttes alkalmazásakor. A bazolaterális NBC tehát kulcsszerepet játszik az alap bikarbonát szekrécióban nem stimulált duktuszsejtek esetében.

#### ***Forskolin hatása a transzepteliális $\text{HCO}_3^-$ szekrécióra***

**Par-C10** sejteken forskolin és a bazolaterális inhibitorok szimultán adásakor szignifikáns  $\text{pH}_i$  csökkenés volt megfigyelhető a kontrollhoz viszonyítva, igazolva a bazolaterális forskolin serkentő hatását a transzepteliális bikarbonát szekrécióra. Hasonló eredményeket kaptunk **Capan-1** sejteken esetében is.

#### ***Sekretin és VIP hatása a transzepteliális $\text{HCO}_3^-$ szekrécióra***

Akárcsak forskolin esetében, **Capan-1** sejteken EIPA és  $\text{H}_2\text{DIDS}$  együttes perfúziója következtében létrejövő  $\text{pH}_i$  esés szignifikáns módon felgyorsult akár sekretin, akár VIP adásakor, még hozzá koncentráció-függő módon. A sekretin és VIP koncentráció-hatás görbéje hasonló morfológiát mutat, a maximális stimuláció 50%-át  $10\text{nM}$  nagyságrendben érik el. A sekretin hatáserőssége ugyanakkor harmadakkora, mint a VIP-é.

#### ***ATP és UTP hatása a transzepteliális $\text{HCO}_3^-$ szekrécióra***



**Par-C10** sejteken ATP luminális alkalmazása – a bazolaterális bikarbonát felvétel egyidejű gátlásakor – szignifikáns  $\text{pH}_i$  csökkenést eredményezett a kontrollhoz viszonyítva. Apikálisan alkalmazott ATP tehát serkenti a transzepitheliális bikarbonát szekréciót Par-C10 sejteken. Ugyanakkor Capan-1 sejteken végzett kísérletektől eltérően – bazolaterálisan alkalmazott ATP hasonló stimuláló hatással bírt a bazolaterális bikarbonát utánpótlás gátlásakor fellépő  $\text{pH}_i$  csökkenésre. A purin nukleotidok másik képviselője, az UTP luminális alkalmazása hasonló módon serkentette a transzepitheliális bikarbonát szekréciót, viszont bazolaterális alkalmazása nem volt szignifikáns hatással az  $\text{pH}_i$ -ra. **Capan-1** sejteken  $1 \mu\text{M}$  ATP vagy UTP apikális alkalmazásakor a bikarbonát utánpótlás EIPA-val és  $\text{H}_2\text{DIDS}$ -val történő egyidejű gátlása esetén a  $\text{pH}_i$  csökkenés szignifikánsan gyorsabb volt a nem stimulált sejtekével összehasonlítva. Ugyanakkor a purin nukleotidok bazolaterális perfúziója az EIPA és  $\text{H}_2\text{DIDS}$  kiváltotta  $\text{pH}_i$  csökkenés meredekségét szignifikáns módon csökkentette. Eredményeink szerint tehát Capan-1 sejteken – akárcsak tengerimalacok esetében – ATP és UTP apikális adása serkenti, míg bazolaterális alkalmazása gátolja a transzepitheliális  $\text{HCO}_3^-$  szekréciót.

### **Proliferációs vizsgálatok:**

#### ***Protein kináz Cε proliferációra és sejtnövekedésre kifejtett hatása***

Az NT serkenti, míg a CCK gyengén, a PMA pedig erőteljesen gátolja a DNS szintézist. A különböző PKC izoformák részvételének meghatározására kísérleteinkben  $20 \text{ nM}$  Gö6983-at használtunk a PKC $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  és - $\delta$  izoformák,  $200 \text{ nM}$  Ro 32-0432-t a PKC $\alpha$ , - $\beta$ I és - $\epsilon$ ,  $40 \text{ nM}$  Gö6976-ot PKC $\alpha$ , - $\beta$ I és - $\mu$  gátlására. Míg Ro 32-0432 gátolta a PMA, CCK és NT sejtproliferációra kifejtett hatását Panc-1C sejteken, addig a Gö6983 hatástalannak bizonyult. Akárcsak a Gö6983, Gö6976 sem gátolta a PMA, CCK és NT hatását. Összefoglalva, **Panc-1** sejtekben a PKC aktiváció növekedésre kifejtett szabályozó hatásáért a PKC $\epsilon$  a felelős, legyen szó akár PMA általi közvetlen vagy natív NT – és transzfektált CCK receptorok általi közvetett hatásról.

#### ***PKC aktivációjának szerepe az ERK kaskád stimulációjában***

A sejteket  $100 \text{ nM}$  PMA-val,  $10 \text{ nM}$  CCK-val vagy  $50 \text{ nM}$  NT-vel kezeltük 2 perctől 6 óráig terjedő időtartamban, majd immunoblot vizsgálatot végeztünk anti-ERK2 és anti-ACTIVE MAPK antitestek felhasználásával. PMA kezelés foszfo-ERK szintjének növekedését legkevesebb 6 óráig serkentette, a CCK 30 percig, az NT pedig 2 percig. Az ERK szint ugyanakkor mindvégig állandó volt. Mindezek alapján feltételezzük, hogy az ERK aktiváció kinetikája a DNS szintézissel korrelál: PMA elhúzódó ERK aktivációt indukál, ugyanakkor drámaian csökkenti a proliferációt, NT tranzienst ERK aktivációt eredményez a növekedés stimulálásával, míg a CCK-hoz köthető átlagos időtartamú ERK aktiváció mérsékelt növekedési gátlással jár együtt.

Miután a sejteket  $20 \mu\text{M}$  ERK foszforilációt gátló MEK inhibitor PD98059-cel kezeltük, a DNS szintézis több, mint 50%-kal csökkent. PD98059 kezelés gátolta az NT serkentő és a PMA gátló

hatását, visszaállítva a [<sup>3</sup>H]-thymidine beépülés mértékét a kontroll szintre. Ugyanakkor PD98059 nem csökkenti a CCK mérsékelt gátló hatását, melynek háttérében feltehetően a DNS szintézisre kifejtett önmagában is erősebb gátló hatás állhat.

Az ERK kaszkádnak a PKC aktiváció növekedést szabályozó folyamatában betöltött szerepét két sejt ciklus gén, a cyclin D1 és a p21Cip1 tumor szuppresszor expresszióján keresztül vizsgáltuk. PMA, CCK és NT a cyclin D1 gén expresszióját serkentette, míg p21Cip1 expressziója PMA és CCK hatására fokozódott, azonban NT nem volt szignifikáns hatással. PD98059 előkezelés a PMA, CCK és NT sejtciklus gének expressziójára kifejtett fenti hatását csökkentette. Mindezen eredményekből nyilvánvaló, hogy az indirekt vagy direkt PKC aktiváció Panc-1C sejtek növekedését az ERK kaszkádon keresztül befolyásolja.

#### ***PKC izoformák szerepe a PMA, CCK és NT indukálta ERK stimulációban***

Nyugvó Panc-1C sejteket PMA-val, CCK-val és NT-vel kezeltük PKC izoforma-szelektív inhibitorokkal történő előkezeléssel vagy anélkül. 200 nM Ro-32-0432 előkezelés csökkentette a PMA, CCK és NT által kifejtett ERK aktivációt, míg 20 nM Gö6983 vagy 40 nM Gö6976 alkalmazásánál ilyen hatás nem volt megfigyelhető. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az ERK kaszkád aktivációjáért a PKC $\epsilon$  a felelős.

## MEGBESZÉLÉS

### Szekréción vizsgálatok:

#### *Capan-1 és Par-C10 sejtek permeábilis membránon növesztve polarizált monolayert formálnak*

**Par-C10** parotisz eredetű daganatsejteket permeábilis felületen, Transwell CLEAR membránon növesztve nagyságrendekkel magasabb transzepiteliális ellenállási értékek mérhetők. Ezen megfigyelések ellentétesek a nyálmirigy acinusokról korábban alkotott képpel, miszerint “áteresztő” epitéliumként funkcionálnak. Eredményeink a korábbi tanulmányokkal korrelálva erősítik azt a nézetet, hogy **Capan-1** sejtek Transwell membránon növesztve polarizált epitéliumot formálnak tökéletesen kialakult sejt-sejt közötti kapcsoló struktúrákkal egyetemben. Ugyanakkor relatíve alacsony transzepiteliális ellenállás háttérben feltehetően jelentős paracelluláris permeabilitás mutatható ki.

#### *A polarizált epitélium funkcionális bizonyítékai – a bazolaterális oldal anion transzporterei*

A **Capan-1** monolayerek polarizált felépítését funkcionális kísérleti eredményekkel és RT-PCR vizsgálatokkal is alátámasztottuk. Az acidifikációt követő  $\text{pH}_i$  emelkedés bazolaterális EIPA adásával teljes mértékben blokkolható volt, ami az NHE jelenlétére utal a bazolaterális membránban. RT-PCR eredmények alapján valószínűsíthető **Capan-1** sejtekben is – mint ahogyan a legtöbb emlős szervezet duktális epithéliumában – NHE1 izoforma jelenléte. Az apikális NHE hiánya viszont arra utal, hogy **Capan-1** sejtekben nem történik  $\text{HCO}_3^-$  reabszorpció. Ezen sejtek néhány faj duktális sejtjeitől eltérően inkább a kis duktuszok fenotípusára hasonlítanak. A bazolaterális oldal másik fontos bikarbonát transzportere a  $\text{H}_2\text{DIDS}$  alkalmazásával gátolható, korábban patkány, illetve tengerimalac hasnyálmirigy duktuszokban, valamint CFPAC-WT sejteken is kimutatott pNBC1. Ugyanakkor tengerimalac hasnyálmirigy duktuszokon végzett kísérletek a bazolaterális membránban kimutatható egy bafilomicin  $\text{A}_1$  rezisztens  $\text{Na}^+$  független transzporter, amely identifikálása további vizsgálatokat igényel. Eredmények alapján kimutatható funkcionálisan is aktív NKCC jelenléte a bazolaterális membránban. Így feltehető, hogy az NKCC1- keresztüli  $\text{Na}^+$ -kapcsolt  $\text{Cl}^-$  felvétel a bazolaterális membrán felől szolgáltatja a hajtóerőt az apikális  $\text{Cl}^-$  szekréciónak. A transzporter jelenléte **Capan-1** sejtekben ugyanakkor arra utal, hogy a sejtek inkább az emberi hasnyálmirigy nagy duktuszaiból eredeztethetők, ahol is a bazolaterális transzporterek expressziós mintázata jelentősen különbözik a  $\text{HCO}_3^-$ -ot nagy mennyiségben szekretáló kisebb interkaláris és intralobuláris duktuszokétól.

#### *A transzepiteliális bikarbonát szekréción és szabályozása – gasztrointesztinális peptidek szerepe*

Kimutattuk tehát, hogy **Capan-1** sejteken az NBC és NHE szekréción során alapvető szerepet játszik a bikarbonát felvételben. Mindezek azonban némiképp ellentmondanak Cheng és munkatársai vizsgálatainak, akik **Capan-1** sejtekben az NBC elhanyagolható szerepét feltételezték. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan RT-PCR vizsgálatokkal kimutattuk szekretin, VPAC<sub>1</sub> és VPAC<sub>2</sub> receptorok expresszóját. Ezeken túl funkcionális kísérletekkel is szolgáltatunk evidenciát a szekretin és VIP

receptorok jelenlétére és aktív működésére. Mindkét peptid egyértelműen serkentő hatással bír a  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióra, azonban a szekretin hatáserőssége némiképp elmarad a VIP-éhez viszonyítva, megfelelő a nemzetközi irodalomból ismert patkány valamint tengerimalac hasnyálmirigy szekréciós vizsgálatok eredményeinek.

#### ***A transzeptéliális bikarbonát szekréció és szabályozása – purinerg jelátvitel szerepe***

**Par-C10** sejteken a bazolaterális bikarbonát felvétel gátlásával egyidőben luminálisan és bazolaterálisan alkalmazott ATP hasonlóképpen növelte az  $\text{pH}_i$  csökkenését. Ugyanakkor UTP luminálisan alkalmazása serkenti, bazolaterális alkalmazása viszont nem befolyásolja a transzeptéliális bikarbonát szekréciót. Lee és munkatársai szerint izolált szubmandibuláris nyálmirigy acinussejtek legalább két különböző P2 receptor típust expresszálnak a luminális és bazolaterális membránban. Előzetes eredményeink alapján feltételezhető, hogy Par-C10 sejteken a luminális membránban P2Y<sub>2</sub> receptor expresszálódik. Akárcsak mikroperfundált tengerimalac duktuszokban, **Capan-1** sejteken is az ATP és UTP alkalmazása bazolaterális majd luminális oldalon ellentétes hatást eredményezett: a nukleotidok luminális adása stimulálta, míg bazolaterális perfúziója gátolta a  $\text{HCO}_3^-$  szekréciót. Noha RT-PCR vizsgálataink mind P2Y, mind P2X receptorok expresszióját bizonyították Capan-1 sejtek membránjában, az ATP és UTP hasonló hatása feltételezi, hogy purinerg aktiváció a sejt mindkét oldalán P2Y receptorhoz kötött. Capan-1 sejteken folytatott korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az ATP az apikális  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  cserét  $\text{Ca}^{2+}$ -függő módon serkenti, amely egyúttal CFTR jelenlétéhez is kötött. A megfigyelésünk, miszerint az emberi hasnyál szignifikáns mennyiségben tartalmaz ATP-t, méginkább megerősítheti, hogy az ATP fontos parakrin mediátorként vesz részt a hasnyálmirigy duktális bikarbonát szekréció szabályozásában. A bazolaterálisan adott ATP gátló hatását azonban nehezebb megmagyarázni. Mind Capan-1 sejteken, mind tengerimalac hasnyálmirigy duktuszon emeli az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt. Patkány duktális sejteken a P2Y<sub>2</sub> (és valószínűleg P2Y<sub>4</sub>) receptor stimulációja emeli az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt, ugyanakkor egyidejűleg csökkenti a teljes sejt  $\text{K}^+$  konduktanciát. Ha ez utóbbi hatás a  $\text{K}^+$  csatornák lokalizációjának megfelelően a bazolaterális membránhoz kötött helyi szignalizációs folyamatokat aktivál, a következményes depolarizáció akár gátolhatja a  $\text{HCO}_3^-$  szekréciót.

#### **Proliferációs vizsgálatok:**

##### ***PKC izoformák hatása a sejtnövekedésre***

Eredményeink azt mutatják, hogy nyugvó **Panc-1C** sejtekben a különböző PKC izoformák aktivációja eltérő hatást fejt ki a sejtnövekedésre. Korábbi megfigyelésekhez hasonlóan forbol észtermediálta direkt PKC aktiváció a DNS szintézis jelentős csökkenését eredményezi, míg a transzfektált CCK-1 receptorok aktivációja mérsékelt gátolja, natív NT receptorok aktivációja pedig serkenti a sejtnövekedést. Kimutattuk, hogy a klasszikus PKC izoformák (cPKCs) és nPKC $\epsilon$  gátlása felfüggeszti a PMA, CCK és NT hatását a DNS szintézisre, ugyanakkor a cPKC-k és nPKC $\delta$  alkalmazása gátló hatást nem eredményezett Panc-1C sejteken. Eredményeink alapján a proliferációra kifejtett hatás

PKC $\epsilon$  függő módon megy végbe. Mivel különböző eredetű sejteken a növekedés szabályozásában más és más izoformák játszanak szerepet, a folyamatok részletes tisztázására, egyéb PKC izoformák szerepének vizsgálatára további kísérletek szükségeltetnek.

#### ***Az ERK kaszkád aktivációjának kinetikája a proliferáció szabályozásában***

Eredményeink szerint PMA, CCK és NT stimulálja az ERK kaszkádot, de alapvetően különböző kinetikával. A növekedést szabályozó hatás feltehetően az ERK aktiváció időtartamával mutat szoros összefüggést: átmeneti aktiváció a proliferációval, tartós ERK aktiváció pedig a növekedés gátlással hozható kapcsolatba. Ezen eredmények azonban kétségtelenül nem korrelálnak teljes mértékben a korábban publikáltakkal. Ezek alapján valószínű, hogy az ERK aktivációnak létezik egy optimális időtartama, amely a legnagyobb növekedést eredményezi a DNS szintézisben. A PMA, CCK vagy NT alkalmazását megelőző specifikus MEK1 MAP kináz inhibitoros kezelés a DNS szintézis mértékét kontroll szintre állítja vissza. Ezen eredmények azt mutatják, hogy legalábbis PMA és NT esetében a proliferációra kifejtett hatás ERK-mediálta módon megy végbe. PMA, CCK és NT ERK-függő módon szabályozza a cyclin D1 és p21Cip1 szintjét. Ezen eredmények egybecsengenek kolorektális daganatos sejteken és fibroblasztokon találtakkal, ahol az ERK szignál időtartama meghatározza, hogy cyclin D1 egyedül indukálódik serkentve ezáltal a proliferációt, vagy cyclin D1 expresszióval együtt jár a p21Cip1 indukciója is, ami növekedés gátláshoz vezet.

#### ***PKC izoformák szerepe az ERK kaszkád aktivációjában***

Ha izoforma-szelektív inhibitorokkal előkezelt Panc-1C sejteket PMA-val, CCK-val vagy NT-vel kezeltük és mértük a foszforilált ERK mennyiségét, azt találtuk, hogy az ERK foszforiláció mértéke a PKC $\epsilon$ -tól, nem pedig a klasszikus PKC izoformáktól vagy PKC $\delta$ -tól függ. Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy Panc-1C emberi hasnyálmirigy daganatsejteken az ERK kaszkád aktivációjáért PKC $\epsilon$  a felelős. Más tanulmányok alapján – mi eredményeinkhez hasonlóan - egér és patkány fibroblaszt sejteken is PKC $\epsilon$  felelős a Raf-1 aktivációjáért. Panc-1C emberi hasnyálmirigy daganatsejteken a PKC aktiváció növekedést szabályozó hatását a következő modellrendszer magyarázza. Natív NTR-1, transzfektált CCK-1 receptorok aktivációja és forbol-észterek általi direkt stimuláció különféle PKC izoformák, beleértve a PKC $\epsilon$  Raf-1-hez kapcsolódó aktivációját eredményezik. PKC $\epsilon$  serkenti a Raf-1-et, az ERK kaszkád aktivációját eredményezve. Az ERK szignál időtartama PMA, CCK és NT kezelés hatására eltérő lehet, ami a sejtciklus gének különböző indukcióját jelenti serkentve vagy gátolva ezáltal a proliferációt. A részletes mechanizmus tisztázása azonban további vizsgálatokat igényel.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Összefoglalásként elmondható, hogy

1. **Par-C10** és **Capan-1** sejtek permeábilis membránon növesztve kiváló modellrendszerként szolgálnak az epitéliális transzportfolyamatok tanulmányozására.
2. a sejtekben kimutatható szabályozott transzeptitéliális bikarbonát szekréció.
3. **Capan-1** sejteken a bikarbonát utánpótlásért a bazolaterális oldalon kimutatott  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  kicserélő (feltehetően az NHE1) és  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$  kotranszporter (feltehetően pNBC1) együttesen a felelős.
4. **Capan-1** sejteken a  $\text{Cl}^-$  szekrécióhoz a hajtóerőt a bazolaterális membrán  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  kotranszportere (feltehetően NKCC1) szolgáltatja.
5. **Capan-1** sejteken az NHE és NBC működése szekretin, VIP és forskolin alkalmazásával cAMP-függő módon serkenthető, fokozott luminális  $\text{HCO}_3^-$  transzportot eredményezve.
6. **Capan-1** és **Par-C10** sejteken mind a bazolaterális, mind a luminális membránban lokalizálódó purinoceptorok részt vesznek a bikarbonát szekréció szabályozásában, csak különböző receptorok és jelátviteli utak aktiválásával.
7. a reguláló peptidek a szekréció szabályozásán túl részt vesznek a proliferációs folyamatok regulálásában: **Panc-1C** sejteken NT serkenti, míg a CCK gyengén, a PMA pedig erőteljesen gátolja a DNS szintézist.
8. a PKC aktiváció növekedésre kifejtett szabályozó hatásáért a PKC $\epsilon$  izoforma a felelős.
9. az indirekt vagy direkt PKC aktiváció **Panc-1C** sejtek növekedését az ERK kaszkádon keresztül befolyásolja, méghozzá különböző kinetikával.
10. az ERK kaszkád aktivációjáért a PKC $\epsilon$  a felelős.

## AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

**Szucs A**, Demeter I, Burghardt B, Ovari G, Case RM, Steward MC, Varga G.

Vectorial bicarbonate transport by Capan-1 cells: a model for human pancreatic ductal secretion.  
Cell Physiol Biochem. 2006;18(4-5):253-64.

Racz GZ, **Szucs A**, Szlavik V, Vag J, Burghardt B, Elliott AC, Varga G.

Possible role of duration of PKC-induced ERK activation in the effects of agonists and phorbol esters on DNA synthesis in Panc-1 cells.  
J Cell Biochem. 2006 Aug 15;98(6):1667-80.

Szucs A, Demeter I, Hegyesi O, Nagy Á, Burghardt B, Steward MC, Varga G

Vectorial bicarbonate transport by Par- C10 cells: a model for human parotid secretion  
Közlésre előkészítve

Demeter I., **Szűcs Á.**, Óvári G., Varga G.

Capan-1 sejtek  $\text{HCO}_3^-$  szekréciójában szerepet játszó transzportfolyamatok vizsgálata  
*Orvostudományi Értesítő*, 2005, 78 (1): 56-60;