A protein kináz D1 új kismolekulás gátlószereinek azonosítása és vizsgálata gyulladásos sejtmodelleken

Doktori tézisek

Varga Attila

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Vántus Tibor Ph.D, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Schlett Katalin, Ph.D, egyetemi docens
Dr. Törőcsik Beáta, Ph.D, adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás, az MTA doktora, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Telekes András Ph.D, egyetemi magántanár
Dr. Nyitrai László, az MTA doktora, egyetemi tanár
Dr. Tekes Kornélia, az MTA doktora, egyetemi tanár

Budapest

2015

1. Bevezetés

A protein kináz D1 (PKD1) a protein kináz D enzimcsaládba tartozik másik két kinázzal, a PKD2-vel és PKD3-mal együtt. Szerkezeti homológiáját tekintve a kalcium/kalmodulin által szabályozott kinázok (CAMK) csoportjába tartozik, míg funkció tekintetében pedig szerin/treonin kináz. Számos jelátviteli útvonal részvevője, mint fontos szabályozó faktor, részt vesz például a génexpresszió szabályozásában a hiszton deacetilázok (HDAC) inaktiváló foszforilációja révén, az oxidatív stressz kivédésére aktiválódó sejt túlélési folyamatokban, a sejtmigráció szabályozásában, illetve a Golgi-rendszerben elősegíti a vezikulák lefűződését és transzportját. A normál fiziológiás funkció mellett a PKD1 szerepét leírták több patológiás mechanizmusban is. Az angiogenezis folyamatában domináns szerepet betöltő VEGFR2 jelpálya egyik kulcsszereplője, ezáltal részt vesz érendotél sejtek proliferációjának, migrációjának valamint az angiogenezis folyamatában fontos gének a szabályozásában. Ismert továbbá a PKD1 funkciója különböző immunsejtek gyulladással kapcsolatos folyamataiban, mint például neutrofil granulociták Fcγ-receptor által indukált szuperoxid termelésében, hízósejtek Fcε-receptor aktiváció során bekövetkező degranulációjában, makrofágok toll-like receptoron keresztül történő citokin termelésében, vagy B-limfociták B-sejt receptor szignalizációjában. Az angiogenezis és a gyulladás folyamata több megbetegedésben is összefügg egymással, például: reumatoid artritiszben, Crohn-betegségben, érelmeszesedésben vagy bizonyos tumoros megbetegedésekben. A krónikus gyulladás területén jelen levő immunsejtek, továbbá az elburjánzó sejtek a hipoxiás állapot következtében angiogenikus faktorokat termelnek. Az ennek következtében újonnan képződő vererek pedig újabb immunsejteket szállítanak a gyulladás helyszínére, súlyosbítva ezzel a gyulladás állapotát, és annak károsító hatását. Mint a legtöbb betegség esetében, az angiogenezis és gyulladás folyamatában is megfigyelhetőek rendellenes módon működő jelátviteli útvonalak, amelyek kinázgátló vegyületek célpontjaiként szolgálnak. Kinázgátló vegyületeket világszerte sikeresen használnak a gyógyászatban, elsősorban a tumoros megbetegedések kezelésére, beleértve a tumor angiogenezist is, továbbá a gyulladás elleni terápiában is egyre nagyobb teret hódítanak ezek a gátlószerek. Annak ellenére, hogy a PKD1 egy potenciális gyógyszercélpont több megbetegedésben is, még nincsen klinikai fázisvizsgálatban PKD1 gátló molekula, illetve a kutatási célra felhasználható PKD1 inhibitorok száma is kevés.

2. Célkitűzések

Egyre több kísérleti adat támasztja alá, hogy a PKD1 több betegségben is potenciális gyógyszercélpont lehet. Ilyenek például a hasnyálmirigy tumor, a patológiás angiogenezis, illetve a gyulladással kapcsolatos megbetegedések. Ennek ellenére a klinikumban, illetve klinikai fázis vizsgálatokban nincsen jelenleg PKD1 inhibitor, továbbá a kísérleti célra felhasználható, kereskedelmi forgalomban kapható PKD1 inhibitorok száma is igen csekély. Ebből kifolyólag PhD munkám céljául azt tűztük ki, hogy a Vichem Chemie Kutató Kft. kinázgátló vegyülettárát felhasználva, olyan új kináz inhibitort, illetve inhibitor családot azonosítunk, amely hatékonyan gátolja a PKD1 enzimet, és egy későbbi gyógyszer-hatóanyag fejlesztés alap vegyülete lehet.

A fentieknek megfelelően a PhD munkám során a következő témakörökkel foglalkoztam:

- A Vichem Kft. tulajdonában lévő kinázokra optimalizált vegyülettár nagy áteresztőképességű előszűrése, *in vitro* módszerrel rekombináns PKD1 enzimre.

- Az előszűrés során kiválogatott PKD1 gátló vegyületek további karakterizálása, szerkezet-hatás összefüggésének vizsgálata, továbbá a gátlószerek szelektivitás vizsgálata.

- Az *in vitro* vizsgálatok alapján kiválasztott inhibitor(ok) bizonyos ADME-Tox paramétereinek meghatározása.

- Olyan kísérleti sejtes modellek kiválasztása és beállítása, amelyekben a PKD1 egy potenciális gyógyszercélpont lehet.

- A szűrővizsgálatok alapján ígéretesnek ítélt gátlószer(ek) karakterizálása a munka során beállított patológiás sejtmodelleken, ahol vizsgálni kívántuk a gátlószer sejten belüli hatásmechanizmusát és egyéb, a PKD1 szempontjából releváns, sejtfunkciókra gyakorolt hatását.

3. Módszerek

Rekombináns kináz vizsgálatok

IMAP® módszer

A kináz inhibitorok PKD1 gátló hatását a Molecular Devices által kifejlesztett IMAP® módszerrel vizsgáltuk. A módszer lényege, hogy a rekombináns kinázt és ATP-t tartalmazó reakcióelegyhez egy fluoreszcens festékkel konjugált peptid szubsztrátot adunk, ami foszforilálatlan állapotában alacsony fluoreszcencia polarizáció értéket produkál. Azonban ha az enzim foszforilálja ezt a szubsztrátot, az először egy, az elegyben megtalálható háromértékű fémionhoz kötődik, ezután az egész komplex egy nanogyöngyhöz kapcsolódik, lecsökken a mobilitása, ami magas fluoreszcencia polarizáció jelet eredményez, ez pedig a kináz aktivitására utal.

Transcreener® módszer

A rekombináns *in vitro* VEGFR2 inhibitor tesztelést a BellBrook Labs által kifejlesztett Transcreener® módszerrel végeztük el. A módszer lényege, hogy a reakcióelegyhez fluoreszcens festékkel konjugált (Alexa633) ADP-t, és anti-ADP ellenanyagot adunk. A enzimreakció során felszabaduló ADP leszorítja az ADP ellenanyagról a fluoreszcens festékkel konjugált ADP-t, így annak megváltozik a fluoreszcencia polarizáció értéke, amiből következtetni tudunk az enzim aktivitására.

Sejttenyésztés

Érendotél sejtes modellként az EA.hy926 (ATCC® - CRL-2922™) hibrid érendotél sejtvonalat használtuk, amely a primer endotél HUVEC és a tüdő adenokarcinóma A549 sejtvonalak fúziójából származik.

Citotoxicitás vizsgálat MTT-módszerrel

Az inhibitorok EA.hy926 sejtekre gyakorolt citotoxikus hatását MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid)-módszerrel határoztuk meg. A módszer lényege, hogy az élő sejtek az MTT kristályokat a mitokondriális reduktáz enzimrendszeren keresztül lila színű formazán kristályokká alakítják, amelyeket feloldva, mérjük azok optikai denzitását, és az eredményekből következtetni tudunk az élő sejtek mennyiségére.

Membrán permeabilitás vizsgálata PAMPA módszerrel

A PAMPA vizsgálathoz a BD Biosciences által erre a célra gyártott, foszfolipidekkel előkezelt mesterséges membránt tartalmazó 96 lyukú plate rendszerét használtuk. Ez a módszer kiválóan modellezi a különböző hatóanyagok sejtmembránon keresztül történő passzív transzportját *in vitro* körülmények között. A kísérlet során 200 μM töménységű oldatokkal dolgoztunk. A méréshez használt vegyületeknek a mérést megelőzően felvettük a fényelnyelési spektrumát, és ennek megfelelően az oldatok abszorbanciáját is ezen a hullámhosszon határoztuk meg, amelyből kiszámoltuk a vegyületek penetrációját.

Sejtproliferáció vizsgálat

A gátlószerek EA.hy926 sejtek proliferációjára gyakorolt hatását tripánkék festést követő sejtszámolással (Countess – Invitrogen) határoztuk meg.

SDS-PAGE és Western blot

Az EA.hy926 sejteket 1 órán keresztül előkezeltük a gátlószerekkel, majd 25 nM PMA-val, vagy 25 ng/ml VEGF-fel aktiváltuk 20 percig. Ezt követően a sejteket RIPA pufferben lizáltuk. A fehérjekoncentrációt Bradford módszerrel határoztuk meg. A mintákat 8 illetve 10%-os SDS-poliakrilamid géleken futtattuk, majd a fehérjéket PVDF membránokra transzferáltuk. A vizsgált fehérjék következők voltak: pSer473-Akt és teljes Akt, β-actin, pSer498-HDAC5 és teljes HDAC5, pSer744/748-PKD1, pSer916-PKD1, illetve teljes PKD1, pTyr951-VEGFR2, és tejes VEGFR2. Az eredményt ECL-módszer segítségével detektáltuk.

Sejtmigráció vizsgálat wound healing módszerrel

A wound healing módszer lényege, hogy a szinte teljesen konfluens sejtréteget megkarcoljuk például egy pipetta heggyel, és követjük a sejtek vándorlását erre a karcolt, sejtmentes felületre. A karcolást követően a kezelőszereket tartalmazó médiumot hozzáadtuk a sejtekhez, majd 18 órán keresztül követtük a sejtmigrációt. Az eredmények kiértékelése során a karcolási felszín területét határoztuk meg, ahol a kezdeti időpont értékéből kivontuk a végpont területeinek értékét, így megkaptuk a „seb” összezáródásának mértékét. A kiértékeléshez az ImageJ képkiértékelő szoftvert használtuk.

In vitro angiogenezis vizsgálat

Az *in vitro* angiogenezis vizsgálatához a tube formation, vagy „csőképzés” módszert használtuk. A módszer azon a jelenségen alapul, hogy ha érendotél sejteket extracelluláris mátrix alapra helyezünk, akkor azok érkapillárisokra hasonlító, csőszerű képződményeket hoznak létre. Az inhibitorokkal kezelt sejtek csőképzését 18 órán keresztül követtük, és fotókat készítettünk fáziskontraszt mikroszkóp segítségével. Az eredmények kiértékelését az ImageJ program Angiogenesis Analyzer Plugin szoftverének segítségével végeztük el.

Szuperoxid termelés vizsgálata Amplex® Red módszerrel

Az EA.hy926 sejtek szuperoxid termelését Amplex® Red módszer segítségével határoztuk meg. A módszer során az Amplex® Red reagens, a szuperoxidból keletkező hidrogén-peroxid jelenlétében 1:1 arányban rezorufinná alakul, amelynek a fluoreszcenciáját detektáljuk, és következtetni tudunk a képződött szuperoxid mennyiségére.

Neutrofil granulociták izolálása

A neutrofil granulocitákat egészséges önkéntes donorok perifériás véréből izoláltuk. A dextrános ülepítést követően, a felülúszót ficoll gradiensen keresztül centrifugáltuk, majd a maradék vörösvértesteket NaCl-oldattal lizáltuk. A neutrofil granulocitákat 20 mM HEPES tartalmú, kalcium és magnéziummentes HBSS/Hepes oldatban vettük fel, és dolgoztunk velük tovább az alábbi kísérleteknek megfelelően.

Neutrofil granulociták szuperoxid termelésének vizsgálata

A kísérleteket 96 lyukú ELISA sejttenyésztő lemezeken végeztük el. Az immobilizált immunkomplex aktiváláshoz humán szérum albumint és anti-humán szérum albumin ellenanyagot használtunk. Az adhézió-függő aktivációhoz a sejttenyésztő lemez lyukait 150 µg/ml fibrinogén tartalmú PBS oldattal kezeltük elő, majd a sejtek kihelyezését követően humán TNFα-át adtunk a lyukakhoz 20 ng/ml végkoncentrációban. A PMA-val történő aktiválás során a lyukakat 10% FCS-tartalmú PBS-sel kezeltük elő, és a sejtek kihelyezése előtt 100 nM PMA-t adtunk a lyukakhoz. A neutrofil granulocitákat a lemezekre történő kihelyezést megelőzően 30 percig 37°C-on előinkubáltuk a gátlószerekkel 0,5 mM Ca^{2+} tartalmú, Mg^{2+}-mentes HBSS/Hepes pufferben. Közvetlenül a kihelyezés és

aktiváció előtt 1 mM Mg^{2+}-ot és 100 μM ferricitokróm c-t adtunk a sejtszuszpenzióhoz, amely segítségével detektáltuk a képződött szuperoxidot.

Neutrofil granulociták migrációjának vizsgálata

A neutrofil granulociták migrációjának vizsgálatához 24 lyukú Transwell-migrációs lemezeket (Corning) használtunk. A Transwell inzertek alja polikarbonát filterrel borított, amin 3 μm átmérőjű pórusok találhatóak. Ezt a filtert a kísérlet megkezdése előtt fibrinogénnel vontuk be. A neutrofil granulocitákat Ca^{2+}-ot tartalmazó HBSS/Hepes oldatban 37°C-on, 30 percig előinkubáltuk az inhibitorokkal, majd az inzertbe történő kihelyezéskor a sejtekhez Mg^{2+}-ot is adtunk. A sejtmigrációt 100 nM fMLP kemoattraktánssal indukáltuk. Az átjutott sejtek számát para-nitrofenil-foszfatáz enzimreakció segítségével határoztuk meg.

Statisztikai analízis

Minden kísérletet legalább három alkalommal ismételtünk meg. A statisztikai kiértékelést a Graph Pad Prism 5 szoftver segítségével végeztük el, ezen kívül a rekombináns kináz vizsgálatok eredményeinek meghatározásához a Microsoft Excel és XLfit (IDBS) szoftvereket is használtuk. Az *in vitro* rekombináns kináz vizsgálatoknál meghatároztuk az ún. Z' értéket, amely a mérés megbízhatóságáról ad információt. Az IC_{50} értékeket nem-lineáris regresszió módszerével határoztuk meg. A statisztikai analízist egymintás ANOVA, és Dunett teszttel végeztük el, és szignifikancia határnak a p=0,05 értéket tekintettük.

4. Eredmények

In vitro rekombináns kináz vizsgálat

A kinázgátló vegyülettár előszűrése

Első lépésként elvégeztük a Vichem Kft. tulajdonában levő, ismert kináz inhibitorokat, és azok szerkezeti analógjait tartalmazó vegyülettár, az EVL (Extended Validation Library – kiterjesztett validációs könyvtár) előszűrését rekombináns PKD1 enzimre, IMAP® módszer segítségével. A 2000 vegyület letesztelését követően a 75%-nál nagyobb gátlási értéket mutató vegyületeket válogattuk ki, ami 72 db vegyületet jelentett 10 µM-ban. Ezt követően azokat a molekulákat válogattuk ki, amelyek a dózisfüggés vizsgálatokban 1 µM alatti IC_{50} értéket mutattak, ez 24 db molekula volt. Megvizsgáltuk a vegyületek szerkezetét és azt figyeltük meg, hogy a 24 db vegyületből 20 db ugyanabba a molekulacsaládba, vagyis a pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-onok közé tartozik. A további vizsgálatokban ezekre a vegyületekre helyeztük a hangsúlyt.

Szerkezet-hatás összefüggés

Megvizsgáltuk, hogy találunk-e összefüggést a pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-on alapszerkezetű vegyületek szerkezete és PKD1 gátló hatása között. Ehhez az EVL könyvtárból olyan molekulákat is kiválogattunk, amelyek szintén pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-on alapszerkezettel rendelkeznek, azonban a PKD1 enzimet nem gátolták az előszűrés során. A vegyületek összehasonlításakor azt figyeltük meg, hogy a PKD1 enzimet jól gátló molekulák, az alapváz 2-es pozíciójához kapcsolódó molekularészen bázikus tercier (esetleg szekunder) amin csoportot tartalmaznak. Megfigyeltük továbbá azt is, hogy a hatékony PKD1 gátló molekulák a 6-os pozícióban egyáltalán nem tartalmaznak funkciós csoportot

Szelektivitás vizsgálat

A következőkben kíváncsiak voltunk arra, hogy az általunk kiválogatott leghatékonyabb PKD1 gátlók mennyire szelektívek más kinázokkal szemben. A vizsgálathoz olyan kinázokat válogattunk össze, amelyek funkció, illetve szerkezet szempontjából nagy hasonlóságot mutatnak a PKD1 enzimmel. Az eredmények alapján a VCC251801-es molekula volt a legszelektívebb, így ezt a vegyületet

választottuk ki további karakterizálásra. Későbbi *in vitro* kináz vizsgálatok során kiderült, hogy a VCC251801 másik fontos célpontjai a VEGFR izoformák is. Mivel a VEGFR kinázok közül a legjobban kutatott, és talán legfontosabb gyógyszercélpont a VEGFR2, így a további kísérleteinkben erre az enzimre is fókuszáltunk, mint a VCC251801 egy másik fontos célpontjára a PKD1 mellett. A VCC251801 PKD1 gátló hatását vizsgálva azt figyeltük meg, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható egyik legjobb gátlószerrel, a kb-NB142-70-nel azonos mértékben gátolta az enzim működését. Továbbá, a VCC251801 szintén hatékonynak bizonyult a VEGFR2 gátlásában, méghozzá a klinikai felhasználásban levő VEGFR gátlószerrel, az Axitinibbel hasonló mértékben gátolt. Mivel a PKD1 és VEGFR2 bizonyítottan szerepet játszik patológiás angiogenezis, valamint különböző gyulladásos folyamatok kialakulásában és fenntartásában, a további vizsgálatokhoz az angiogenezis és a gyulladás folyamatában szerepet játszó sejtes modelleket választottunk.

Korai ADME-Tox paraméterek meghatározása

A korai ADME-Tox paraméterek közül megvizsgáltuk a VCC251801 citotoxicitását, illetve meghatároztuk a mesterséges lipid membránon való penetrációját.

Citotoxicitás vizsgálat

A citotoxicitás vizsgálathoz az erre a célra széles körben használt MTT módszert alkalmaztuk. Jelen esetben az érendotél sejteket 0,4 µM-tól 50 µM-ig terjedő koncentráció tartományban kezeltük az inhibitorokkal állandó 0,5%-os DMSO tartalom mellett. A VCC251801 jelenlétét relatíve magas dózisban is tolerálták a sejtek, és 24 óra és 48 óra elteltével sem történt teljes sejtpusztulás. A későbbi sejtes kísérletekhez a citotoxicitási eredményeket is figyelembe véve választottuk ki a kezelési koncentrációtartományt.

Membrán permeabilitás vizsgálat (PAMPA)

A módszer során egy speciális, sejtmembránt modellező rendszert használtunk, amelyen keresztül megtörténhet a gyógyszerjelölt molekulák transzportja. Az eredmények azt mutatták, hogy a VCC251801 hatékonyan képes passzív transzporttal átjutni a mesterséges lipid membránon.

Angiogenezis modellen végzett vizsgálatok

Angiogenezis modellnek a széles körben használt érendotél eredetű, immortalizált EA.hy926 sejtvonalat választottuk

Érendotélsejt proliferáció vizsgálat

A VCC251801 24 és 48 óra elteltével 0,5 és 1 µM dózisban nem okozott szignifikáns sejtproliferáció csökkenést, azonban az 5, 10 és 50 µM koncentrációban történő kezelések már jelentősen csökkentették az érendotélsejtek proliferációját.

Érendotél sejten belüli hatásmechanizmus

A következő kísérletekben megvizsgáltuk, hogy a VCC251801 képes-e gátolni érendotél sejtekben az endogén PKD1-et illetve VEGFR2-t, valamint az általuk szabályozott jelpályákat. Ehhez a vizsgálathoz kétféle aktivációs stimulánst választottunk, amelyekkel a VEGFR2 és PKD1 aktivitása együtt és külön-külön is jól vizsgálható, ezek a forbol-észter PMA illetve a VEGF voltak.

Először a PMA indukált PKD1 aktivációt vizsgáltuk western blot módszerrel. A VCC251801 koncentrációfüggő módon csökkentette a PKD1 autofoszforilációs helyének, illetve a PKD1 szubsztrátjának, a HDAC5-nek a foszforilációját, tehát a PKD1 működése is csökkent. A PKD1 szerin 744-es és 748-as transz-foszforilációs oldalláncainak foszforiláltsági állapota azonban változatlan maradt, amiből arra következtettünk, hogy a VCC251801 nem gátolta a PKD1-et aktiváló PKC-izoformákat, például a PKCδ-t vagy a PKCε-t.

A következő kísérletekben a VEGFR2 jelpályára fókuszáltunk, és ennek megfelelően a gátlószerekkel való előkezelést követően VEGF-el stimuláltuk az érendotél sejteket. A VCC251801 hatékonyan gátolta a VEGFR2 jelpálya aktivációt, amelyet több fehérje foszforilációján keresztül követtünk nyomon: VEGFR2, PKD1, HDAC5 és Akt. A hatás koncentrációfüggő volt, és 5 µM VCC251801 koncentráció mellett volt szignifikáns az összes vizsgált enzimen. Érdekes volt megfigyelni azt, hogy a kb-NB142-70 kezelés az Akt foszforilációját jelentősen megemelte. Ez azonban nem meglepő, ugyanis korábban már leírták a jelenséget, miszerint a PKD1 egy negatív visszacsatolás révén alulszabályozza az

Akt kináz működését, így a PKD1 gátlása az Akt aktivációjának növekedését idézi elő. Az Axitinibbel történő kezelés során jól láthatóan már a receptor, azaz a VEGFR2 szintjén gátlás történik a jelátviteli útvonalban, amit a PKD1 és Akt foszforilációjának csökkenése is jól mutat, azonban a HDAC5 foszforilációja nem csökkent szignifikáns mértékben. A VCC251801 azonban mindkét enzim foszforilációját hatékonyan csökkentette.

Elmondható tehát, hogy a VCC251801 képes volt hatékonyan gátolni a PMA indukált PKD1, illetve a VEGF indukált VEGFR2 jelpálya aktivációt érendotél sejtekben.

Érendotél sejt migráció

A következő kísérletekben már a VCC251801 endotélsejt funkcióra kifejtett hatásait vizsgáltuk. Először az érendotél sejtek migrációjára fókuszáltunk, amelyet a sejtmigráció vizsgálatára széles körben használt ún. wound-healing vagy „seb-gyógyulás" technika segítségével követtünk nyomon. A sejtmigrációs kísérletekben az inhibitorokat a már korábban használt, azaz 1, 2,5 és 5 μM koncentrációkban alkalmaztuk. A VCC251801 kezelés során jól megfigyelhető a koncentrációfüggő hatás: 1 μM mellett 35%-kal, 2,5 μM koncentrációban pedig 55%-kal csökkent a sejtmigráció mértéke. Az 5 μM koncentrációval történő VCC251801 kezelés esetében a sejtmigráció gátlása szintén markáns volt, viszont ekkor a sejtek kezdtek felúszni, ami valószínűleg sejtpusztulás miatt következhetett be.

In vitro angiogenezis

Az angiogenezis *in vitro* vizsgálatának egyik módszere az ún. tube formation vagy „csőképzés" módszer. A technika lényege, hogy érendotélsejtek extracelluláris mátrix alapra történő kiültetése után a sejtek kapillárisszerű, hálózatos struktúrákat hoznak létre. Ezt a módszert széles körben alkalmazzák az érképződés vizsgálatára *in vitro* körülmények között. Az inhibitorokkal történő kezeléshez a 18 óra inkubációs időt választottuk, ugyanis – korábbi kísérleteink szerint – ekkor már kialakulnak a több sejtből álló kapillárisszerű szerkezetek. A kísérlet során a szakirodalomban is használt három paramétert határoztuk meg: a csövek száma, a csövek hosszának összegét és a csövek által borított terület nagysága. A VCC251801 koncentrációfüggő módon csökkentette a csövek számát, hosszát és

az általuk borított terület nagyságát. A hatás 1 μM esetében kevésbé volt markáns, a statisztikai analízis alapján is csak a csövek hosszának összege csökkent szignifikáns mértékben, a csövek száma illetve a csövekkel borított terület nagysága nem. Azonban 2,5 és 5 μM VCC251801 koncentráció mellett már mindhárom vizsgált paraméter szignifikáns mértékben lecsökkent. Ez a gátlás 5 μM koncentráció esetében igen drasztikus volt, amiben valószínűleg közrejátszik a már az előző, sejtmigrációt tárgyaló fejezetben említett potenciálisan bekövetkező sejtpusztulás. Összességében elmondható, hogy a VCC251801 hatékonynak bizonyult az angiogenezis folyamatának csökkentésében *in vitro* körülmények között.

Érendotél sejtek szuperoxid termelése

Az érendotél sejtek által patológiás körülmények között termelt szuperoxid több betegség velejárója illetve kiváltó tényezője lehet. Érendotél sejtekben a szuperoxid termelésért felelős dominánsan expresszálódó NADPH-oxidáz izoforma a NOX4. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a VCC251801-nek van-e hatása az érendotél sejtek szuperoxid termelésére, vagyis, hogy a PKD1-nek van-e szerepe ebben a folyamatban ugyanis erről még nincsen adat a szakirodalomban. A kísérletek során az érendotél sejteket 30 percig előinkubáltuk a gátlószerekkel, mindegyikkel egységesen 10 μM koncentrációban, majd az Amplex Red reagens hozzáadásával mértük a termelt peroxid mennyiségét. Azonban az eredmények alapján sem a VCC251801, sem pedig a referencia PKD1 gátlószer kb-NB142-70 nem okozott csökkenést az érendotél sejtek szuperoxid termelésében.

Gyulladásos sejtmodellen végzett vizsgálatok

A másik fontos, gyulladással kapcsolatos sejtmodellünk, a humán neutrofil granulociták voltak, amelyek az élő szervezet első védelmi vonalát képezik a különböző bakteriális és gombás fertőzésekkel szemben, viszont számos patológiás folyamatnak is fontos résztvevői.

Neutrofil granulociták szuperoxid termelése

A neutrofil granulociták egyik fontos válaszreakciója a NOX2 NADPH enzimrendszeren keresztül történő szuperoxid termelés, amely több különböző stimulussal is aktiválható. A kísérleteinkhez két specifikus, illetve egy aspecifikus

kináz aktivációt előidéző indukálást választottunk. Először az Fcγ-receptoron keresztül történő immunkomplex mediált autoimmun gyulladás folyamatát modelleztük. A VCC251801 az összes alkalmazott koncentrációban csökkentette a neutrofil granulociták szuperoxid termelését: 0,3 és 1 μM esetében nagyjából 50%-kal, viszont a 3 illetve 10 μM dózis közel 100%-os gátlást idézett elő. A PKD1 szerepét már leírták ebben az aktivációs mechanizmusban, és ennek megfelelően a referencia PKD1-inhibitor kb-NB142-70 szintén szignifikáns mértékben csökkentette a szuperoxid termelést. A következő kísérleti körülmény az adhéziófüggő, TNFα által történő stimuláció volt, amely a gyulladásos környezetben történő neutrofil aktivációt modellezi. Ebben a mechanizmusban a PKD1 szerepét még nem írták le. Meglepetésünkre azonban azt tapasztaltuk, hogy a VCC251801 ebben az esetben is egy igen masszív gátlást idézett elő a szuperoxid termelésben, ugyanis már a legalacsonyabb 0,3 μM koncentrációban közel 50%-kal csökkent a sejtválasz, 1 μM esetében a hatás még markánsabb volt, körülbelül 70%, míg 3 illetve 10 μM koncentráció mellett a gátlás szinte 100% volt. A kbNB-142-70-nel történő kezelés során 0,3 μM esetében nem történt változás, azonban 1 és 3 μM koncentráció mellett a gátlás már jelentős, nagyjából 70%, míg 10 μM esetében a hatást közel 100% volt. A harmadik szuperoxid termelést indukáló módszerünk a nem fiziológás, aspecifikus, a különböző sejtfelszíni receptorok aktivációja nélkül megvalósuló PMA aktiváció volt. Ezt a sejtválaszt a VCC251801 nem gátolta 10 μM koncentrációban sem.

Neutrofil granulociták transzmigrációja

A következő sejtfunkció amit neutrofil granulocitákon vizsgáltunk, a mesterséges membránon keresztül történő sejtvándorlás. Ez a módszer a neutrofilek granulociták véráramból az érfalon keresztül történő kilépését tehát az extravazáció folyamatát modellezi *in vitro* körülmények között. A kísérletünkben kemoattraktánsként 100 nM fMLP-t használtunk, ami például bakteriális fertőzések során szabadul fel. A transzmigrációs lemez inzertjeinek membránjait mindkét oldalon a β_2-integrin ligand fibrinogénnel fedtük, aminek köszönhetően a neutrofilek ki tudnak tapadni a membrán felületéhez. Az inhibitorral nem kezelt sejtek esetében az fMLP szignifikánsan megnövelte a neutrofil granulociták transzmigrációját, az fMLP-t nem tartalmazó mintához képest. Azonban a VCC251801 nem okozott változást az fMLP által indukált neutrofil transzmigrációban.

5. Következtetések

A PhD munkám eredményeiből levont következtetéseket az alábbi pontokban foglaltam össze:

1. Azonosítottunk pirido[2,3-d]pirimidin-7-on alapszerkezettel rendelkező vegyületeket, amelyek igen hatékonyan gátolták a PKD1 enzimet. A vizsgált vegyületcsaládban megfigyeltük, hogy a PKD1 gátlás szempontjából a pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-on alapváz 2-es pozíciójában szükséges egy bázikus szekunder vagy tercier amin csoport jelenléte, valamint az alapváz a 6-os pozícióban ne tartalmazzon aril vagy tienil funkciós csoportot.
2. Kiválasztottuk az általunk leghatékonyabbnak ítélt vegyületet, a VCC251801-et, amely szelektívnek bizonyult a PKD1-hez működésben (például PKC izoformák) és szerkezetben hasonló (CAMK, MLCK) kinázokkal szemben. Továbbá kimutattuk, hogy a VCC251801 egy másik fontos célpontja a VEGFR2, amelyet a klinikai felhasználásban levő VEGFR inhibitorral, az Axitinibbel hasonló koncentrációtartományban gátolt.
3. ADME-Tox vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy az érendotél sejtek a VCC251801-et relatíve magas dózisban is tolerálják. Kimutattuk, hogy az inhibitorunk hatékonyan képes átjutni mesterséges lipid membránon, amiből arra következtettünk, hogy a VCC251801 passzív transzporttal is képes bejutni a sejtekbe.
4. Érendotél sejtekben a VEGFR2 jelpálya hatékony gátlásához szükség volt a VCC251801 által történő PKD1 és VEGFR2 szimultán inhibíciójára. A VEGFR2 jelpálya VCC251801 általi gátlása hatékonyan csökkentette az érendotél sejtek proliferációját, migrációját és az *in vitro* angiogenezist.
5. Az érendotél sejtek szuperoxid termelését nem befolyásolta sem a VCC251801, sem pedig a kb-NB142-70, amiből arra következtettünk, hogy a PKD1 nem vesz részt ennek a jelpályának a szabályozásában.
6. A VCC251801 képes specifikusan gátolni a neutrofil granulociták különböző stimulánsokkal (úgymint immobilizált immunkomplex, illetve adhéziófüggő TNFα indukált aktiváció) kiváltott válaszreakcióját. Azonban az immunkomplex aktivációval ellentétben, a PKD1 szerepét még nem írták le az adhéziófüggő TNFα aktivációs útvonalban, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a PKD1 részt vesz ebben a mechanizmusban.

6. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

[1] **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.* **IF: 3,53**

[2] Borbély G, Huszár M, **Varga A**, Futosi K, Mócsai A, Őrfi L, Idei M, Mandl J, Kéri G, Vántus T (2012). Optimization of important early ADME(T) parameters of NADPH oxidase-4 inhibitor molecules. *Medicinal Chemistry 8, 174-181.* **IF: 1,37**