

Válasz Dr. Boros Imre Miklós bírálatára

Először is hadd köszönjem meg a Tisztelt Bíráló fáradságos munkáját; alapos, minden részletre kiterjedő elemzését; valamint, hogy pozitívan nyilatkozott munkámról.

Kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

1. kérdés: *A tézisben közöltek alapján nem értek teljes mértékben egyet azzal a következtetéssel, hogy „a TRPV1 és CB1 molekulák meghatározó szereppel bírhatnak a humán prosztata daganatos elváltozásainak kialakulásában”.*

Kérem kommentálja e kérdést a tekintetben, hogy

A, ismertek-e olyan daganatos elváltozások, amelyekben a szóbanforgó két receptor valamelyikének oki szerepe megalapozottan feltételezett?

B, ha igen, akkor milyen típusú megváltozás funkció nyerés, vagy funkció vesztes az, ami a tumoros állapotban jellemzően előfordul?

C, ha nem ismert ilyen tumor, akkor is mondja el véleményét kérem, hogy várhatóan milyen változással módosulva és a tumor kialakulásának melyik fázisában játszhatnak szerepet e receptorok a daganatokban!

Válasz: Az idézett mondat (a tudatosan alkalmazott feltételes mód, valamint egy általános üzenetre való törekvés ellenére is) valóban túl „erősen” és félreérthetően fogalmaz; így a „kialakulás” kifejezés patognomikus szerepet is sugallhat, mely kijelentés természetesen nagyon elhamarkodott lenne. Mindezek miatt elnézést kérek a Tisztelt Bírálotól.

A fenti gondolt mentén felmerült „Tyúk vagy a tojás?” kérdés – miszerint a TRPV1 és CB1 molekulák a daganatok (és egyéb betegségek) esetében primer kóroki szereppel bírnak, és/vagy a kifejeződésükben bekövetkező módosulások a betegség progressziója során másodlagosan alakulnak ki – ugyanakkor igen izgalmas témakört feszeget (erre utalhat az is, hogy egy másik Bíráló, Dr. Széll Márta is felvetette ezt a problémát).

Úgy vélem, hogy a kérdés minden kétséget kizáróan egyelőre nem válaszolható meg, ami főként a téma és a kutatási terület relative „fiatal” (így gyakran ellentmondásokkal tarkított) voltának köszönhető. Így az alábbiakban a legfontosabb tudományos eredményeket foglaltam össze, 3 tematikai csoportba osztva azokat:

- Farmakológiai hatások: A CB receptorokon, valamint a TRPV1-en ható természetes és szintetikus agonisták potenciális antiproliferatív hatását igen nagyszámú tenyésztett humán daganatos sejtvonalon vizsgálták/vizsgáltuk. A kísérletes eredmények szinte minden esetben igen jelentős növekedésgátlásra utaltak, függetlenül az „eredeti” sejttypustól. A celluláris kísérletek emellett feltárták a fenti hatásokat mediáló receptorális és intracelluláris jelátviteli útvonalak számos komponensét is (pl. intracelluláris Ca^{2+} -akkumuláció, kinázrendszerek aktiválódása, reaktív oxidatív és nitroztív elemek felszaporodása, pro-apoptotikus kaspázok aktivitásának fokozódása, génexpressziós változások, stb.). Mivel az *in vitro* sejtes eredmények a legtöbb esetben *in vivo* is reprodukálhatók voltak – azaz kannabinoid és vanilloid vegyületek, intratumoralisan és/vagy szisztémásan adagolva,

hatásosan gátolták az immunhiányos egerekben indukált daganatok növekedését –, így a molekulákat mint „potenciális daganatellenes terápiás célpontokat” említi a tudományos terület.

- Expressziós változások: Ezt a nézetet erősíti az is, hogy számos daganatféleség esetében (pl. CB1: prosztata cc., astrocitóma, limfóma; CB2: glioblasztoma multiforme; TRPV1: prosztata cc, squamosus cc, vastagbél cc) a receptorok fokozott expresszióját írták le. Fontos ugyanakkor két további eredménycsoport ismertetése is: i) A fenti adatokkal szöges ellentétben több munkacsoport számolt be a receptorok kifejeződésének csökkenéséről más daganatos szövetekben (pl. CB1: glioblasztoma multiforme; TRPV1: hólyag cc.). ii) A sejtvonalakon végzett kísérletek emellett számos esetben nem tudták igazolni a receptorok specifikus részvételét az antiproliferatív hatás kifejtésében (annak ellenére, hogy több „receptor-independens” jelátviteli mechanizmust is azonosítottak). Mindezen adatok arra utalnak, hogy a fent részletezett expressziós változások megléte, valamint a specifikus antiproliferatív hatás korántsem általános érvényű, és jelentős mértékben függ az adott sejt és szövet (valamint egyes esetekben az alkalmazott kannabinoid/vanilloid ligand) jellegzetességeitől.
- Kóroki szerep: Úgy gondolom, hogy a fenti receptorok által beindított mechanizmusok elméletileg a tumorgenezis többlépcsős folyamatsorozatának (iniciáció – promóció – progresszió – invázió – disszemináció) minden elemében résztvehetnek. Ennek ellenére a legkevesebb „megalapozott” adattal a molekulák patogenetikai szerepről rendelkezünk. Érdekes megfigyelést tettek ugyanakkor a TRPV1 vizsgálatok. Az egyik „klasszikus” kétlépcsés bőr karcinogenezis modellt (iniciáció: 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, DMBA; promóció: az általános PKC aktivátor 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA) alkalmazva Bode és mtsai (Cancer Res., 2009) ugyanis kimutatták, hogy a TRPV1 génhiányos állatokban mind a kialakult daganatok száma, mind a mérete jelentősen fokozódott a vad típusú állatokban mértékhez képest. Kimutatták azt is, hogy a fokozott tumorgenezis hátterében feltehetően az epidermal growth factor receptor (EGFR) mediált jelátviteli folyamata kóros fokozódása áll. Ezzel jó összhangban Li és mtsai (Carcinogenesis, 2011) hasonló modellt alkalmazva megállapították, hogy a TRPV1 antagonistá AMG9810, az EGFR/Akt/mTOR szignalizáción keresztül, ugyancsak fokozta a daganatképződést. Mindezen adatok arra utalnak, hogy (legalábbis ebben a rendszerben) a TRPV1 aktivitása véd a tumorgenezis kialakulásától, így a TRPV1, valamint a hozzá kapcsolódó jelátviteli folyamatok „loss-of-function” változása szereppel bírhat bizonyos daganatok kialakulásában.

2. kérdés: Kérem adjon egy rövid áttekintést a PKC izoformák eredetéről.

Válasz: Amint azt a Doktori műben is bemutattuk, a PKC izoenzimeket aktivációs mechanizmusaik és szerkezeti sajátágaik alapján több csoportba sorolhatjuk. A „klasszikus vagy konvencionális” csoportba (cPKC) a cPKC α , β I, β II és γ izoenzimek tartoznak, mely fehérjék aktiválódásukhoz diacil-glicerolt (DAG), illetve a DAG analógjaként forbol-észtereket, valamint kalciumot igényelnek. A második csoportba a „novel” kalcium-független, de DAG-függő nPKC δ , ϵ , η és θ izoenzimek tartoznak. Egy további csoportba az „atípusos” aPKC ζ és ι (egérben aPKC λ) izoenzimek

sorolhatók, melyek aktiválódásukhoz sem kalciumot, sem DAG-analóg forbol-észtert nem igényelnek. Végezetül a PKC családba sorolhatók a PKC-kapcsolt kinázok (PRK-ok), valamint a PKC μ (újabb nevén a PKD) is.

A PKC izoenzimek eredetének megértéséhez röviden bemutatjuk a PKC enzimes család felépítésében résztvevő strukturális elemeket:

- **C1 domén:** A regulatórikus doménen található, melynek feladata a DAG, illetve a forbol-észterek kötése. A cPKC és nPKC izoformákban a C1 domént egy tandem elhelyezkedő Zn-új motívum alkotja (C1a és C1b), melyek közül a C1b rendelkezik a nagyobb affinitással. Az aPKC izoformákban csak egy jóval alacsonyabb DAG-kötő affinitással rendelkező egyedi C1 domén található, míg az ugyancsak DAG-inszenzitív PRK-kban hiányzik ez a domén.
- **C2 domén:** A cPKC izoformák regulatórikus doménjén, közvetlenül a C1 domén C-terminális vége mellett található, melynek feladata a Ca²⁺ (és a foszfatidil-szerin) kötése. Érdekes módon a többi PKC izoforma is rendelkezik egy „C2-szerű” doménnel; ezen doménekből ugyanakkor hiányzik a Ca²⁺-kötésért felelős egy vagy több aszpartát. Úgy tűnik, hogy a „C2-szerű” domén feladata a PKC izoenzimek aktivációját kísérő, különféle membránokba történő „targetálás”, valamint a fehérje-fehérje kölcsönhatások szabályozása.
- **HR1 domén:** Csak a PRK-ok regulatórikus doménjének N-terminális végén található domén (HR1a-c), melyet „Rho-interactive modul”-nak nevezünk. Feladatuk a Rho enzimhez kapcsolt szignalizációs útvonal „down-stream” effektoraként működő PRK-ok aktiválásához szükséges GTP/GDP-RhoA komplex kötése.
- **Pszudoszubsztrát régió:** A PKC izoformák regulatórikus doménjén, közvetlenül a C1 domén N-terminális vége mellett található; feladata a katalitikus doménen található kináz régióhoz való kapcsolódás, így az enzim inaktív állapotának stabilizálása. A PRK-okban hiányzik ez a régió; ezen enzimekben a HR1a domén látja el a pszudoszubsztrát „feladatot”.
- **Katalitikus domén:** Az összes PKC izoformában, valamint a PRK-okban egyaránt megtalálható a nagymértékben konzervált szekvenciájú **kináz domén** (mely a szubsztrátok foszforilálásáért felelős), valamint a **V5 domén** (melynek az adott enzim lokalizációjában, a fehérje-fehérje kapcsolatok kialakításában, valamint az enzim foszforilációs állapotának szabályozásában van szerepe).

A PKC izoformák evolúciójának vizsgálatakor megállapították, hogy egy ősi, így a sejtműködés szabályozásában kulcsfontosságú enzimes családról van szó. Az „archetipikus” PKC enzimet ugyanis már az élesztő gombák közé tartozó *Saccharomyces cerevisiae* sörélesztőben is megtalálták, mely gombák 1000-1200 millió évvel ezelőtt válhattak el az állatoktól és a növényektől.



1. ábra Az „archetipikus” *S. cerevisiae* Pkc1 sematikus szerkezete
Mellor H. & Parker P.J. (1998) Biochem. J., 332: 281-292

A *S. cerevisiae* Pkc1, mely a legnagyobb (132 kDa) ismert PKC enzim, az egyetlen PKC izoforma a gombában. A nagy méret az igen kiterjedt regulatórikus doménnek köszönhető; az enzimből ugyanis megtalálható a PKC-re és a PRK-okra jellemző

összes régió (1. ábra). Ennek megfelelően a *S. cerevisiae* Pkc1 a PKC izoformákra jellemző többféle aktivátor mechanizmussal (a „C2-szerű” domén jelenléte miatt a Ca^{2+} kivételével) stimulálható.

A PKC izoenzimcsalád filogenetikai „expanziójáról” *Caenorhabditis elegans* modell szervezet vizsgálatakor nyertek információt. A meglehetősen egyszerű struktúrájú nematoda ugyanis már 4 *pkc* és 1 *prk* gént tartalmaz, melynek termékei nagyfokú hasonlóságot mutatnak a humán enzimekkel (lásd alábbi táblázat):

A *C. elegans* PKC enzimcsalád:

Gén	Fehérje	Humán izoforma és hasonlóság
<i>tpa-1</i>	TPA1A, TPA1B	nPKC δ (46%), nPKC θ (44%)
<i>pkc-1</i>	PKC1A, PKC1B	nPKC ϵ (55%), nPKC η (52%)
<i>pkc-2</i>	PKC2A, PKC2B	cPKC α (66%), cPKC β (65%), cPKC γ (59%)
<i>pkc-3</i>	PKC3	aPKC ζ (55%), aPKC ι (56%)
<i>prk-A</i>	PRKA	PRK1 (35%), PRK2 (35%)

Megemlíthető emellett egy másik modell organizmus is, a *Drosophila melanogaster*. Az ecetmuslica ugyanis szintén több *PKC* és *PRK* gént tartalmaz, melynek fehérjetermékei ugyancsak nagyfokú hasonlóságot mutatnak a humán enzimekkel (lásd alábbi táblázat):

A *D. melanogaster* PKC enzimcsalád:

Gén	Fehérje	Humán izoforma és hasonlóság
<i>PKC53E</i>	3 fehérje	cPKC α (69%)
<i>eye-PKC</i>	1 fehérje	cPKC β (53%)
<i>PKCdelta</i>	1 fehérje	nPKC δ (52%),
<i>PKC98E</i>	1 fehérje	nPKC ϵ (58%),
<i>DaPKC</i>	1 fehérje	aPKC ι (67%)
<i>PKC-related</i>	2 fehérje	PRK2 (66%)

Összefoglalva úgy tűnik tehát, hogy a PKC izoenzimek családja a korai evolúciós korszakoktól kezdve, az organizmusok egyre komplexebb összetételéhez igazodva, folyamatos „gyarapodáson” ment keresztül. Ez egyrészt nagyfokú plaszticitást kölcsönöz a rendszernek, másrészt lehetőséget teremt arra, hogy a PKC enzimek az élettani folyamatok legszélesebb skáláját legyenek képesek befolyásolni és szabályozni.

A 2. kérdésre adott válaszok összeállításához az alábbi összefoglaló irodalmakat használtam fel:

1. Mellor H. & Parker P.J. (1998) Biochem. J., 332:281-292
2. Perez P. & Calonge T.M. (2002) J. Biochem., 132:513-517
3. Tabuse Y. (2002) J. Biochem., 132:519-522
4. Shieh B-H. et al (2002) J. Biochem., 132:523-527

Végezetül, ismételten megköszönve a Tisztelt Bíráló pozitív bírálatát, tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Debrecen, 2011. április 23.

Bíró Tamás