

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

Doktori értekezés

**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

# Tartalomjegyzék

1. Rövidítésjegyzék .....	5
2. Bevezetés, szakirodalmi áttekintés .....	9
2.1 A protein kináz D1 általános jellemzése.....	9
2.1.1 Szerkezet és csoportosítás .....	9
2.1.2 Szabályozás és aktiváció .....	11
2.2 A PKD1 biológiai funkciói .....	14
2.2.1 Géntranszkripció szabályozása .....	14
2.2.2 Sejtmotilitás.....	16
2.2.3 Vezikula transzport .....	17
2.2.4 Oxidatív stressz és túlélés .....	18
2.2.5 Apoptózis által indukált PKD1 aktiváció.....	19
2.3 A PKD1 szerepe patológiás mechanizmusokban .....	20
2.3.1 A PKD1 szerepe tumorokban.....	20
2.3.2 A PKD1 szerepe egyéb megbetegedésekben .....	22
2.4 A PKD1 szerepe az angiogenezis és a gyulladás folyamatában .....	23
2.4.1 Az angiogenezis és a gyulladás folyamatának kapcsolata .....	23
2.4.2 A PKD1 szerepe az angiogenezis folyamatában.....	24
2.4.3 A PKD1 szerepe gyulladásos folyamatokban .....	26
2.5 Kináz inhibitorok .....	30
2.5.1 A kináz inhibitorok terápiai alkalmazása.....	30
2.5.2 A PKD1 inhibitorok .....	30
2.5.3 Az angiogenezist célzó kináz inhibitorok .....	32
2.5.4 Kináz inhibitorok a gyulladás elleni terápiában .....	33
3. Célkitűzések .....	35

4. Módszerek .....	36
4.1 Rekombináns kináz vizsgálatok.....	36
4.1.1 IMAP <sup>®</sup> módszer .....	36
4.1.2 Transcreener <sup>®</sup> módszer .....	37
4.3 Sejttenyésztés.....	38
4.4 MTT-módszer .....	38
4.5 Membrán permeabilitás vizsgálata PAMPA módszerrel.....	39
4.6 Sejtproliferáció vizsgálat .....	40
4.7 SDS-PAGE és Western blot .....	40
4.8 Sejtmigráció vizsgálat wound healing módszerrel .....	41
4.9 <i>In vitro</i> angiogenezis vizsgálat.....	42
4.10 Szuperoxid termelés vizsgálata Amplex <sup>®</sup> Red módszerrel.....	43
4.11 Neutrofil granulociták izolálása.....	43
4.12 Neutrofil granulociták szuperoxid termelésének vizsgálata .....	43
4.13 Neutrofil granulociták migrációjának vizsgálata.....	45
4.14 Statisztikai analízis .....	45
5. Eredmények.....	47
5.1 <i>In vitro</i> rekombináns kináz vizsgálat.....	47
5.1.1 A kinázgátló vegyülettár előszűrése.....	47
5.1.2 Szerkezet-hatás összefüggés .....	49
5.1.3 Szelektivitás vizsgálat .....	51
5.2 Korai ADME-Tox paraméterek meghatározása .....	54
5.2.1 Citotoxicitás vizsgálat .....	54
5.2.2 PAMPA .....	55
5.3 Angiogenezis modellen végzett vizsgálatok.....	57

5.3.1 Érendotélsejt proliferáció vizsgálat .....	57
5.3.2 Érendotél sejt belüli hatásmechanizmus.....	59
5.3.3 Érendotél sejt migráció .....	65
5.3.4 <i>In vitro</i> angiogenezis .....	67
5.3.5 Érendotél sejtek szuperoxid termelése .....	70
5.4 Gyulladásos sejtmodellel végzett vizsgálatok .....	72
5.4.1 Neutrofil granulociták szuperoxid termelése .....	72
5.4.2 Neutrofil granulociták transzmigrációja.....	75
6. Megbeszélés .....	77
7. Következtetések.....	87
8. Összefoglalás.....	89
9. Summary.....	90
10. Irodalomjegyzék .....	91
11. Saját publikációk .....	110
12. Munkamegosztás a társszerzők között .....	111
13. Köszönetnyilvánítás .....	112
14. Mellékletek .....	113



# 1. Rövidítésjegyzék

Abl	Abelson tirozin kináz
Ang1	Angiopoietin 1
Ang2	Angiopoietin 2
ATP	Adenozin-trifoszfát
ARP	Actin-related protein
BCR	B-sejt receptor
BSA	Bovine serum albumin - szarvasmarha szérum albumin
Btk	Bruton-féle tirozin kináz
CAMK	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin mediated kinase – Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin függő kináz
CAMTA	Kalmodulin kötő transzkripció aktivátor
CERT	Ceramide transfer protein – ceramid szállító fehérje
CML	Chronic Myeloid Leukaemia – krónikus mieloid leukémia
COX-2	Ciklooxygenáz-2
CREB	cAMP response element-binding protein
C1a	Cisztein gazdag domén 1-es alegysége
C1b	Cisztein gazdag domén 2-es alegysége
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DPI	Difenil-jodónium
DTT	Ditiotreitol
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor – epidermális növekedési faktor receptor
Egr3	Early growth response protein 3
ERK	Extracellular signal-regulated kinase – extracelluláris szignál által szabályozott kináz

EVL	Extended Validaiton Library – kiterjesztett validációs könyvtár
FDA	Food and Drug Administration – amerikai gyógyszer- és élelmiszerellenőrző hatóság
Fgr	Feline Gardner-Rasheed sarcoma viral oncogene homolog
fMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanin
FP	Fluoreszcencia polarizáció
GPCR	G-protein coupled receptor - G-fehérje kapcsolt receptor
HBSS	Hank's Balanced Saline Solution – Hank-féle normalizált sóoldat
Hck	Hemopoietic cellular kinase
HDAC	Hisztin-deacetiláz
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
HSA	Humán szérum albumin
HTS	High throughput screening - nagy áteresztőképességű tesztelés
HUVEC	Human Umbilical Endothelial Cell – emberi köldökzsínór érendotél sejt
IMAP	Immobilized Metal ion Affinity-based fluorescence Polarization – rögzített fémion affinitás alapú fluoreszcencia polarizáció
IC <sub>50</sub>	Half maximal inhibitory concentration - a maximális hatás felét kiváltó koncentráció
IκB	Nuclear factor κB inhibitor
IKK	IκB kináz
IP3	Inozitol trifoszfát
IGF	Insulin like growth factor – inzulinszerű növekedési faktor
IGFR	Insulinlike Growth Factor Receptor – inzuliszerű növekedési faktor receptor
JAK	Janus-kináz

Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase – limfocita-specifikus tirozin-kináz
Lyn	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
MAPK	Mitogén aktivált protein kináz
MEF-2	Myocyte enhancer factor 2
MLCK	Myosin light chain kinase – miozin könnyű lánc kináz
MLCP	Myosin light chain phosphatase – miozin könnyű lánc foszfatáz
MMP	Mátrix metallo-proteáz
MnSOD	Mangánfüggő szuperoxid dizmutáz
mP	Millipolarizációs egység
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
NOX	NADPH-oxidáz
Nurr1	Nuclear receptor-related factor-1
Nurr77	Nuclear receptor-related factor-77
OBPS	Oxysterol binding protein – oxiszterol kötő fehérje
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay – parallel mesterséges membrán permeabilitás vizsgálat
PCR	Polimerase chain reaction – polimeráz láncreakció
PDGF	Platelet derived growth factor – vérlemezke eredetű növekedési faktor
PH	Pleksztrin homológia domén
PIP <sub>2</sub>	Foszfoinozitol-biszfoszfát
PI4KIII $\beta$	Foszfadilinozitol-4-kináz- $\beta$
PI4P	Foszfadilinozitol-4-foszfát
PKC $\mu$	Protein kináz C $\mu$ , a protein kináz D1 humán változata
PKC $\nu$	Protein kináz C $\nu$ , a protein kináz D3 humán változata

PKC	Protein kináz C
PKD	Protein kináz D
PLC	Foszfolipáz C
PLD	Foszfolipáz D
PIGF	Placenta Growth Factor – placenta növekedési faktor
PMA	Phorbol 12-miristate 13-acetate – forbol-mirisztil-acetát
PVDF	Polivinilidén fluorid
RIN1	Ras/Rab interactor 1 – Ras/Rab kölcsönható fehérje 1
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay
ROS	Reactive oxygen species – reaktív oxigén gyökök
RUNX	Runk-related transcription factor
SD	Standard deviation
SDS	Nátrium dodecil-szulfát
SEM	Standard error of the mean
SSH1L	Slingshot 1L fehérje foszfatáz
Src	Szarkóma tirozin kináz
Syk	Spleen tyrosine kinase – lép tirozin kináz
TAMRA	5-karboxitetrametilrhodamin
TCR	T-sejt receptor
TNF $\alpha$	Tumor nekrosis faktor $\alpha$
TRAF	Tumor necrosis factor receptor associated factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor – érendotél növekedési faktor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor – érendotél növekedési faktor receptor
WAVE-2	Wiscott-Aldrich verprolin homology domain protein 2

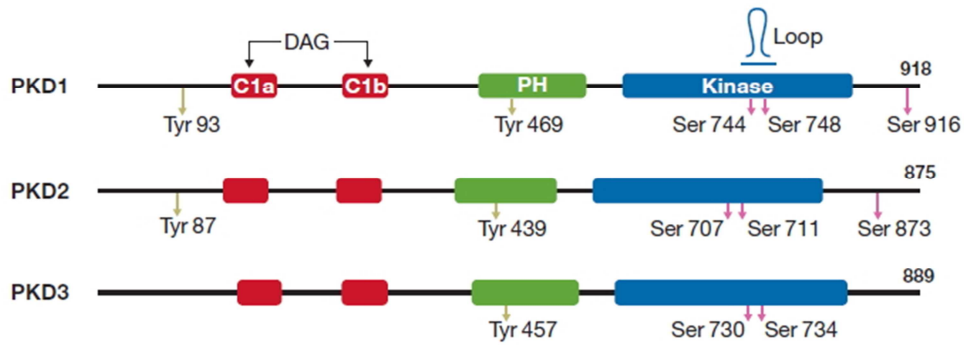
## 2. Bevezetés, szakirodalmi áttekintés

### 2.1 A protein kináz D1 általános jellemzése

A protein kinázok a sejtek közötti kommunikáció és a sejten belüli jelátviteli folyamatok fontos szereplői, hozzájárulnak a szervezet egészséges működéséhez, azonban számos esetben kóros folyamatok résztvevői is lehetnek. A PhD munkám során a protein kináz D1 (PKD1) enzimmel foglalkoztam részletesen. A PKD1 a protein kináz D enzimesalád tagja, amelyek funkció szempontjából a szerin/threonin kinázok csoportjába tartoznak. A PKD család első tagját, a PKD1-et, 1994-ben azonosították két különböző laboratóriumban emberi illetve egér eredetű sejtekből. Az emberből származó kinázt PKC $\mu$ -nek, míg az egerből származót PKD1-nek nevezték el és az 'atipikus' protein kináz C csoportba sorolták [1, 2]. Azonban 1995-ben, fehérje adatbázisok elemzése során kiderült, hogy a PKD1 kináz domén régiója sokkal nagyobb hasonlóságot mutat a kalcium/kalmodulin szabályozott kinázok (CAMK) csoportjába tartozó miozin könnyűlánc kináz (MLCK) kinázdoménjével, mint a PKC enzimekével, ezért ebből kifolyólag a PKD1-et napjainkban a CAMK csoport tagjaként tartják számon [3]. Mint említettem, eredetileg az emberi és egér eredetű kinázt különböző névvel illették, azonban napjainkban egységesen a PKD1 elnevezést használják az 1-es izoforma megnevezésére, így a továbbiakban én is ezt az elnevezést használom. A PKD1-en kívül még két másik izoformát is felfedeztek: a PKD2-t 1999-ben, valamint a PKD3-at (vagy PKC $\nu$ -t) 2001-ben, így a PKD enzimesalád jelenleg három ismert tagot számlál [4, 5].

#### 2.1.1 Szerkezet és csoportosítás

A PKD1, PKD2 és PKD3 szerkezetet és funkciót tekintve azonos alegységekből épülnek fel. Mindhárom enzim alapvetően két nagyobb szerkezeti egységre bontható: az N-terminális részen elhelyezkedő enzimfunkciót és aktivitást szabályozó régióra, illetve a C-terminálison található katalitikus alegységre (*1. ábra*).



**1. ábra A PKD enzimek szerkezete.** A három PKD izoforma azonos szerkezeti egységekből épül fel. Az N-terminális részen elhelyezkedő szabályozó szerepet betöltő ciszteinben gazdag doménekből (C1a és C1b) és PH-doménből, valamint a C-terminális véghez közeli katalitikus doménből [31].

Az N-terminális szabályozó régió funkció szempontjából további alegységekre osztható:

1. A **C1a** és **C1b** ciszteinben gazdag domének, amelyek cink-ujj-szerű tandemisméltlődéseket tartalmaznak. Ezeken az alegységeken keresztül történik a diacil-glicerol (DAG) megkötése, így talán nem meglepő, hogy a régió nagy homológiát mutat a DAG által szabályozott fehérjék DAG-kötő doménjeivel mint például különböző PKC izoformák vagy DAG-kinázok. Továbbá ez a régió felel a DAG analóg forbol-észter kötődésért is [6]. A ciszteinben gazdag doménnek fontos szerepe van a PKD izoformák sejtmembránhoz, illetve a sejt belső membrán rendszereihez történő lokalizációjában, amelyről a későbbiekben részletesebben lesz szó.
2. A ciszteinben gazdag domén mellett helyezkedik el a **PH domén**. Ez egy 120 aminosav hosszúságú szakasz, amelynek jellegzetes háromdimenziós szerkezete inter- és intramolekuláris kapcsolatok létrejöttét teszi lehetővé az enzim számára. A doménon belüli található 469-es tirozin oldallánc foszforilációja az enzim aktiválódását eredményezi. Ezt a foszforilációt a Src, illetve Abl tirozin kinázok katalizálják például oxidatív stressz hatására [7].

Stimulálatlan állapotban a fent felsorolt alegységek gátolják az enzim működését [8-10].

A C-terminális régiót gyakorlatilag a **katalitikus domén** alkotja. Mint ahogy szerkezetben, úgy szubsztrát specifitást tekintve is jelentős különbségek mutatkoznak a PKD-, és PKC-család tagjai között. A PKD enzimek által *in vitro* körülmények között

preferált szubsztrát szekvencia: AALVRQMSAFFF. A konszenzus szubsztrát szekvenciában a foszforilálandó szerinhez képest „-3” pozícióban bázikus aminosav, pl.: arginin, a „-5” pozícióban leucin helyezkedik el. Itt fontos megjegyezni, hogy a leucin jelenléte kritikus, mert ennek hiányában az enzim nem foszforilálja a peptidet vagy fehérjét [11].

A következőkben a PKD1-es izoforma különböző tulajdonságait részletezem, ugyanis ezzel az izoformával foglalkoztam a PhD munkám során.

### 2.1.2 Szabályozás és aktiváció

A PKD1 szerkezete szorosan összefügg aktivációjával, szabályozásával, és sejten belüli eloszlásával. Stimulálatlan sejtekben a PKD1 nagyon alacsony katalitikus aktivitást mutat, köszönhetően a szabályozó régióban elhelyezkedő alegységek gátló hatásának [9, 10].

#### *Fontos foszforilációs helyek*

A PKD1 a legtöbb esetben különböző PKC izoformák, többnyire PKC $\epsilon$  és  $\delta$  által aktiválódik [12, 13]. Ebben a mechanizmusban fontos szerepet játszanak a katalitikus alegységen belül, a 744-es és 748-as pozícióban elhelyezkedő szerin oldalláncok, vagyis az ún. **transzfoszforilációs** helyek. Abban az esetben, ha ezeket az aminosavakat foszforilálódni nem képes aminosavakra, mint például alaninra cseréljük le, az működésképtelen enzimet eredményez. Azonban, ennek a két szerinnek [14] foszforilációt mimikáló aminosavra, például aszparaginsavra történő cseréje egy konstitutívan aktív PKD1-et hoz létre [15]. Waldron és Rozengurt *in vitro* körülmények között végzett kísérletei fényt derítettek arra, hogy a PKD1 megfelelő peptid szubsztrát, ATP és a forbol-észter jelenlétében foszforilálja 748-as szerin oldalláncot, tehát autofoszforiláció megy végbe. Azonban, ha már a reakció kezdetén PKC $\epsilon$ -t is adunk az elegyhez, a 744-es és 748-as szerin oldallánc is igen gyorsan foszforilálódik, ami egyértelmű bizonyítéka a PKC $\epsilon$  közvetlen aktiváló szerepének [15]. Stimulált sejtekben ezek a jelenségek akkor következnek be, amikor a PKD1 a plazmamembránhoz transzlokálódik a DAG és a cisztein gazdag domének interakcióján keresztül [12]. Megfigyelték továbbá, hogy aktiválódás során a PKD1 a plazmamembrántól visszatérve a citoszólba még hosszú ideig aktivált formában marad, akár 1 órán keresztül is [16].

Érdekes módon ez az állapot PKC-független módon jön létre. Ebben az esetben azonban nem transzfoszforiláció történik, hanem a PKD1 autofoszforilációja először a Ser748-as, majd a Ser744-as oldalláncon és ez alakítja ki a hosszan fenntartott aktivált állapotot. Így a Ser744/748-as oldalláncon megvalósulhat a PKD1 PKC-független szabályozása, tehát a PKD1 működése a kulcsfontosságú szerin oldalláncain keresztül transzfoszforilációval és autofoszforilációval egyaránt szabályozható [17].

A PKD1 rendelkezik továbbá egy **autofoszforilációs** hellyel a C-terminális vég közelében, a 916-os szerin oldalláncon. Ez a szakasz nagy szerkezeti homológiát mutat az enzim által preferált és már korábban részletezett peptid szubsztrát szekvenciával [18]. Erről a foszforilációs állapotról sokáig azt gondolták, hogy nagyon szorosan összefügg a PKD1 katalitikus aktivitásával, és az enzimaktivitás egy megbízható markerének tekintették. Azonban 2009-ben Rybin és munkatársai arra lettek figyelmesek, hogy a katalitikus doménben funkcióvesztéses mutációt hordozó PKD1 916-os szerin oldallánca foszforilált állapotban volt, ami ellentmondott az eddigi megfigyeléseknek, valamint az olyan mutáns PKD1 forma, ami a 916-os pozícióban szerin helyett alanin aminosavat hordozott, kináz aktivitást mutatott. Ez a kérdés továbbra sem tisztázott teljesen, viszont azt feltételezik, hogy a 916-os szerin oldallánca foszforilációja valószínűleg elősegíti az aktív enzim stabil konformációjának fenntartását, és szabályozza az aktív állapot időtartamát [19, 20].

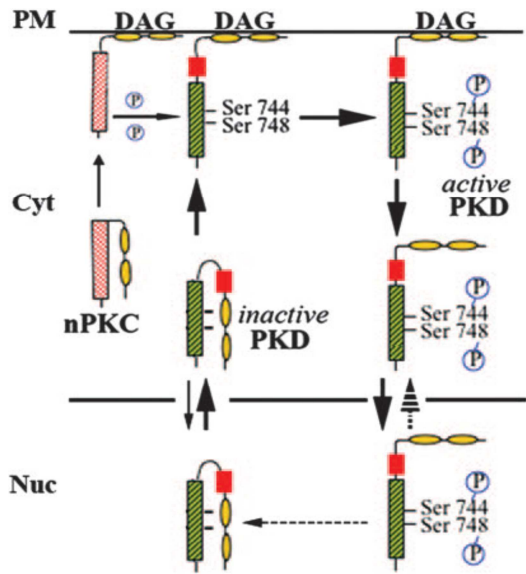
### ***A PH domén szerepe***

A PH domének fehérjék közötti, vagy fehérjén belüli kölcsönhatások kialakításában vesznek részt. A PKD1 N-terminális szabályozó részén elhelyezkedő PH domén funkciója is egyrészt a fent említett kölcsönhatások kialakítása, másrészt gátolja a kináz működését. A PH domén részleges, vagy teljes deléciója ugyanis egy állandóan aktív PKD1-et eredményez [15]. Ezen kívül, a PH domén a kinázaktivitás szempontjából fontos tirozin aminosav oldalláncokat hordoz, amelyeket az Src illetve Abl kinázok foszforilálnak például oxidatív stressz esetében [21].

### ***A cisztein-gazdag alegységek szerepe és a membrán transzlokáció***

A cisztein-gazdag alegységek, azaz a C1a és C1b domének egyrészt gátolják a nyugalmi állapotban levő PKD1 funkcióját, másrészt fontos szerepet játszanak a PKD1 sejten belüli lokalizációjában. A PKD1 nyugalmi állapotban a citoszólban található egyenletes





**2. ábra A PKD1 membrán transzlokáció folyamata.** PM: plazmamembrán, Cyt: citoszól, Nuc: sejtmag, Forrás: [22]

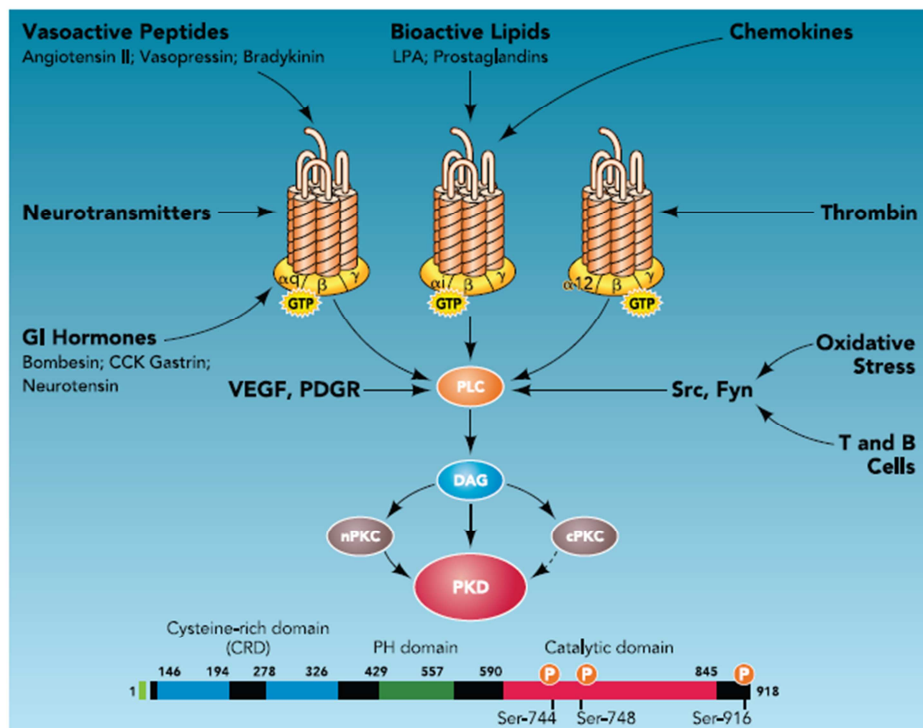
eloszlásban [16]. Azonban különböző stimulusok következtében keletkező DAG a sejtmembránhoz és a sejt belső membránrendszereihez gyűjti a PKD1 enzimeket, azok cisztein-gazdag alegységén keresztül csakúgy, mint más ugyanilyen alegységgel rendelkező fehérjéket, mint például PKC izoformákat [16, 22]. Az így egymáshoz közel került PKD1 és PKC izoformák interakcióján keresztül megtörténik a PKD1 aktivációja (2. ábra).

Ahogy láthattuk, két cisztein-gazdag alegység található a PKD1-ben, amelyek

funkciójuk szempontjából is különböznek. Az enzim a C1a doménon keresztül a Golgi-hálózat membránjához kötődik, míg a C1b alegység pedig a sejtmembránhoz és a sejtmaghártyához való transzlokációban játszik szerepet [15, 23].

## 2.2 A PKD1 biológiai funkciói

A PKD1 biológiai funkciója rendkívül sokrétű és szerteágazó. Szerepet játszik többek közt a gyulladásos folyamatok szabályozásában, az angiogenezisben, az inzulin szekréció szabályozásában, vagy az idegsejtek megfelelő működésében [24-28]. Több jelátviteli útvonal fontos résztvevője és számos stimuláns hatására képes aktiválódni (3. ábra) [29, 30]. Ezek közül a legfontosabbakat az alábbiakban részletezem.



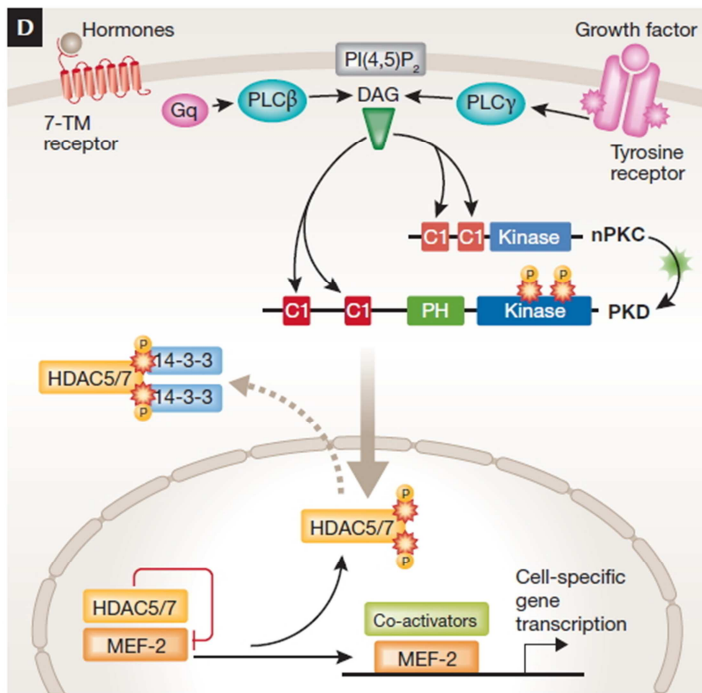
3. ábra A PKD1 aktiváció lehetséges módjai. Forrás: [30]

### 2.2.1 Géntranszkripció szabályozása

A PKD1-nek bizonyítottan szerepe van több jelátviteli útvonalban, azon belül is fontos eleme a transzkripció és génexpresszió szabályozásának. A PKD1 ezen funkcióját a továbbiakban néhány példán keresztül mutatom be.

Megfigyelték például, hogy patkány eredetű szívizomsejteket endothelin 1-gyel kezelve PKD1 aktiváció figyelhető meg. Az aktivált PKD1 a sejtmagba vándorol és foszforilálja a HDAC5-öt, ami ennek hatására először disszociál a MEF2 transzkripciós faktorról, majd a 14-3-3 fehérjéhez kötődik, és kiáramlik a sejtmagból (4. ábra) [31]. A MEF2 ezután olyan gének átírását indítja be, amelyek az izom-összehúzódsért illetve az

anyagcsere folyamatokért felelősek, azonban ezek patológiás körülmények között szívizom hipertófiához vezetnek [32, 33]. A PKD1 ugyanezzel a mechanizmussal részt vesz további szívizom hipertrófiáért felelős faktorok szabályozásában, ilyenek például a CAMTA2, Nrk2-5 [31, 32]. Érdekes módon azonban az egészséges szívizomban a PKD1 pontos szerepe még nincs felderítve [31].



4. ábra A PKD1 szerepe a génexpresszió szabályozásában  
Forrás:[31]

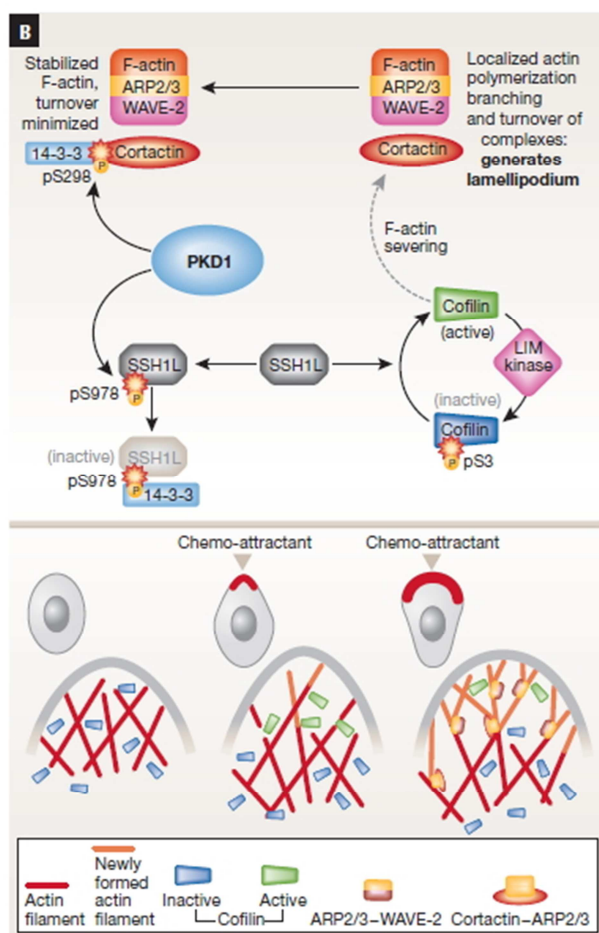
Érendotél sejtekben VEGF-A stimulálás hatására PKD1 aktiváció történik, ami jelen esetben a HDAC5-ön kívül **HDAC7**-et is foszforilálja [34, 35]. A már fent részletezett mechanizmus szerint a HDAC-ok kiáramlanak a sejtmagból, és megindul különböző, angiogenezisért felelős gének átíródása [26]. (A PKD1 és angiogenezis kapcsolatát a későbbiekben tovább részletezem.)

Csontszövet fejlődése során is leírták a PKD1 szerepét, ami szintén a HDAC7 inaktíváló foszforilációja révén valósul meg, és ez által egy, a csontszövet fejlődéséért felelős transzkripciós faktor, a RUNX aktiválódik [36].

Ahogy a fenti példák alapján láthattuk, a PKD1 Ila típusú HDAC-okon keresztüli génexpressziót szabályozó szerepe ugyanazon mechanizmus révén valósul meg különböző sejt- és szövettípus esetében is.

## 2.2.2 Sejtmotilitás

A sejtvándorlás során a sejtek az irányváltoztatás irányában lamellopódiumokat



5. ábra A PKD1 szerepe a sejtmigrációban Forrás: [31]

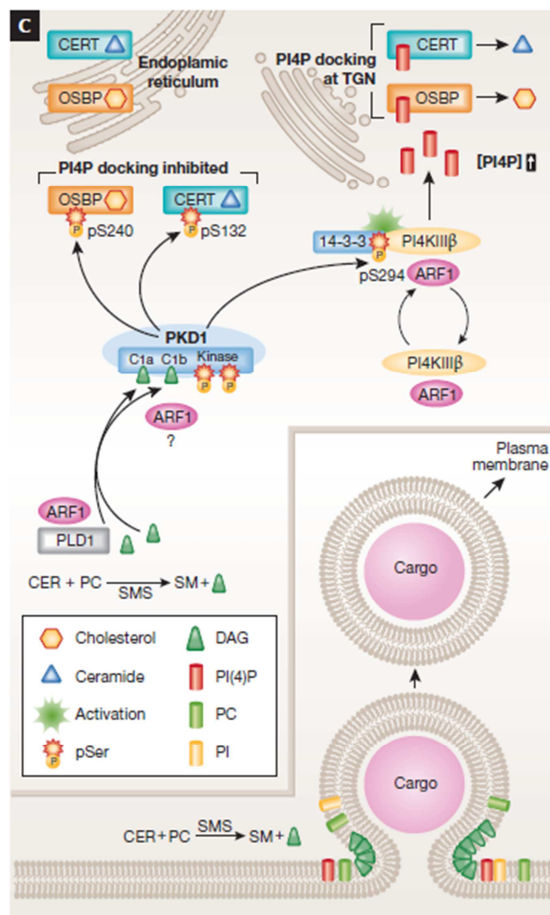
képeznek. A lamellopódiumban a kofilin fehérje készíti elő az aktin fonalak végeit a WAVE-2-kortaktin-ARP2/3 komplex számára, ami egy újabb aktin egységet kapcsol a már meglévő filamentumhoz (5. ábra). Azonban, ha egy LIM kináz foszforilálja a kofilin 3-as pozíciójában elhelyezkedő szerin oldalláncot, az aktin polimerizáció folyamata megszakad, és így a sejt vándorlása is megáll [37]. Az SSH1L foszfatáz viszont képes defoszforilálni a kofilint, és a folyamat haladhat tovább. Azonban a PKD1 képes foszforilálni az SSH1L foszfatázt, aminek az a következménye, hogy az SSH1L egy 14-3-3 fehérjéhez kötődve a citoplazmába vándorol [38, 39]. Ennek következtében a 3-as szerin oldalláncon foszforilált kofilin mennyisége folyamatosan növekszik, az aktin polimerizáció, és így a sejtvándorlás folyamata is megáll. A PKD1 képes még foszforilálni a kortaktint is, ami szintén egy 14-3-3 fehérjéhez kapcsolódik, és így stabilizálja a WAVE-2, ARP2/3 komplexet. Ez a stabilizált komplex viszont szintén blokkolja az aktin polimerizációt, ugyanis a folyamatos lamellopódium képzéshez a WAVE-2 - kortaktin - ARP2/3 komplex állandó megújulására, „turnover”-ére van szükség [40]. A PKD1 ezen kívül még egy harmadik módon is képes a sejtmigráció gátlására, méghozzá a RIN1 fehérje foszforilációján keresztül [41]. A foszforilált RIN1 aktiválja az Abl tirozin kinázt, ami tovább foszforilálja a CRK állványfehérjét. A CRK fontos szerepet játszik az aktin polimerizációban résztvevő fehérjék toborzásában,

azonban az Abl általi foszforilált állapotában a CRK térszerkezete megváltozik oly módon, hogy nem tudnak az aktin polimerizációban részt vevő fehérjék hozzákapcsolódni, és a sejtmigráció folyamata leáll [42].

A fentiekből látható, hogy a PKD1 három ponton (SSH1L, kortaktin, RIN1) is képes beavatkozni, és gátolni a sejtvándorlás folyamatát.

### 2.2.3 Vezikula transzport

A Golgi-rendszer citoplazmatikus felszínéhez kapcsolódott PKD1-nek aktív szabályozó szerepe van a vezikulák Golgi-rendszerrel való lefűződésében és azok exocitózisában (6. ábra) [43]. Bizonyos stimulusok hatására G $\beta$ 1 $\gamma$ 2 G-fehérje heterotrimer alegységek kötődnek a Golgi membránjában jelen levő PLC $\beta$ -hoz és aktiválják azt, ami pedig DAG termelést generál, és így PKC-k közreműködésével megtörténik a PKD1 aktivációja



6. ábra A PKD1 szerepe a Golgi-rendszer működésében Forrás: [31]

[44, 45]. Az aktivált PKD1 foszforilálja a PI4KIII $\beta$ -át, amely ez által egy 14-3-3 fehérjéhez kötődik, stabilizálva annak aktív konformációját [46]. A PI4KIII $\beta$  foszforilálja az foszfatidil-inozitolt és PI4P keletkezik, ami így egy dokkolási pontot hoz létre a lipid és szterol szállító fehérjék, mint például a CERT vagy OSBP számára [47]. A CERT ceramidot szállít az endoplazmatikus retikulumtól a Golgi rendszerhez, ahol a szfingomielin szintáz (SMS) ceramidból és foszfatidilkolinból szfingomielin és DAG-ot állít elő. Ez utóbbi PKC- és további PKD1 aktivációt indukál. Az OSBP és CERT közös komplexben együtt szállítja a koleszterint és a ceramidot, ami az SMS-en keresztül

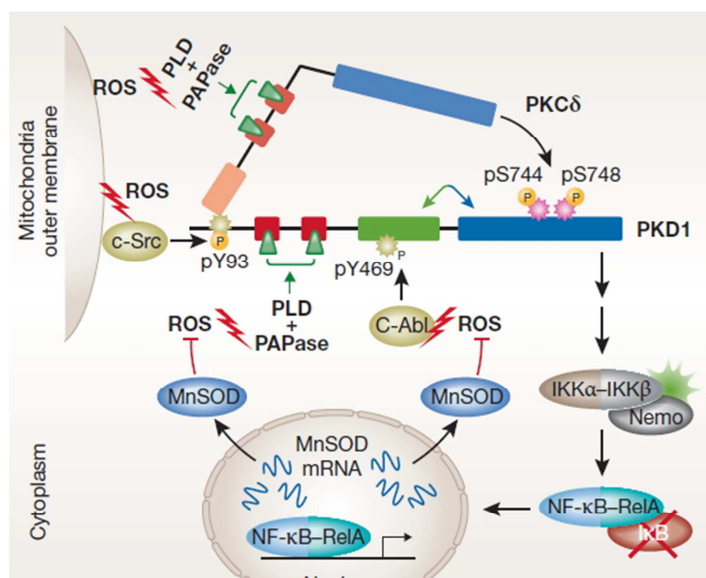
további szfingomielin és DAG termelést, és ezúton újabb PKD1 illetve PI4KIII $\beta$

aktivációt indukál [48]. A szfingomielin és koleszterin komplexek részt vesznek a fehérjék és a lipidek válogatásában, valamint vezikulumokba történő becsomagolásában. A DAG felhalmozódása a Golgi membránjában betüremkedéseket okoz, aminek segítségével a vezikulumok le tudnak fűződni [43]. Azonban a PKD1 képes az **OSBP**-t és **CERT**-et is foszforilálni, aminek az a következménye, hogy az OSBP esetében a szterolok Golgihoz történő szállítása lecsökken, a CERT esetében pedig a ceramid transzport gátolva lesz. Ez a negatív visszacsatolás segít a rendszer finomhangolásában, és megakadályozza, hogy a koleszterin és a szfingomielin toxikus mennyiségben halmozódjon fel.

A PKD1 tehát két módon is részt vesz a Golgi rendszer működésében. Egyrészt pozitívan szabályozza a vezikulák ürülésének folyamatát, másrészt egy negatív visszacsatolás révén leállítja a koleszterin és szfingomielin toxikus mértékben való felhalmozódását.

## 2.2.4 Oxidatív stressz és túlélés

A mitokondrium elektron-transzportláncának működése során reaktív oxigén gyökök (ROS) keletkezhetnek. A sejt rendelkezik ROS elimináló enzimekkel, azonban előfordulhat, hogy ezek sem tudják hatástalanítani a reaktív oxigén gyököket, ami



7. ábra A PKD1 szerepe az oxidatív stressz molekuláris mechanizmusában Forrás: [31]

oxidatív stressz kialakulásához vezet, amely pedig súlyos károsodásokat idézhet elő. Az oxidatív stressz káros következményeinek elhárításában a PKD1-nek is bizonyítottan szerepe van (7. ábra) [21]. A reaktív oxigén gyökök PLD és PAF katalizált DAG termelést idéznek elő, aminek hatására a PKCδ és a PKD1 enzimek

a mitokondrium külső membránjához lokalizálódnak [31]. Itt először egy Src kináz



aktiválja az Abl és PKC $\delta$  enzimeket, valamint foszforilálja a PKD1 93-as pozícióban elhelyezkedő tirozin oldalláncát [49]. Ez egy olyan konformáció változást idéz elő, aminek következtében a PKC $\delta$  hozzáfér a PKD1 aktivációs hurokban elhelyezkedő 744-es és 748-as szerin oldalláncához, és foszforilálja azokat, míg az Abl kináz a PKD1 469-es tirozin oldalláncát foszforilálja [7]. Az aktivált PKD1 az IKK $\alpha$ -IKK $\beta$ -Nemo komplexen keresztül előidézi az NF- $\kappa$ B sejtmagba való transzlokációját, ahol az NF- $\kappa$ B indukálja a reaktív oxigéngyökök eliminálásában szerepet játszó MnSOD szuperoxid dizmutáz expresszióját [50]. A fent leírt folyamat azonban még nincsen teljes mértékben feltárva, ugyanis nem ismert a például, hogy a PKD1 pontosan milyen módon idézi elő az NF- $\kappa$ B sejtmagba történő lokalizációját, mert a PKD1 nem foszforilálja az IKK $\alpha$ -IKK $\beta$ -Nemo komplexet, tehát valószínűleg egy eddig ismeretlen PKD1 szubsztrát szükséges a folyamathoz [31].

### **2.2.5 Apoptózis által indukált PKD1 aktiváció**

Az apoptózis során aktiválódó kaszpáz-3 képes hasítani a PKD1-et a katalitikus és a regulátor régió között [51]. A hasítás során egy 59 és egy 62 kDa nagyságú katalitikus szakasz keletkezik [52]. Ezek a szakaszok tartalmazzák a PH-domént, ami feltételezhetően fehérje-fehérje kapcsolatot létrejöttében játszhat szerepet. A fenti megfigyelést tovább erősítették azok a vizsgálatok, amikor *in vitro* körülmények között rekombináns PKD1-et és kaszpáz-3-at együtt inkubáltak, és a sejtekben is megfigyelt PKD1 hasítás szintén végbement. A hasítás a kaszpáz-3 hasítási helyére jellemző DXXD szekvenciáknál valósul meg, amelyből a PKD1 kettőt is hordoz [52]. Egyelőre azonban ennek az aktivációs mechanizmusnak a fiziológias szerepe nem ismert.

## 2.3 A PKD1 szerepe patológiás mechanizmusokban

Ahogy láthattuk a PKD1 számos sejtfunkcióban vesz részt, így talán nem meglepő, hogy működése összefüggésbe hozható különböző betegségek molekuláris mechanizmusaival is.

### 2.3.1 A PKD1 szerepe tumorokban

A PKD1 tumorokban betöltött szerepe függ a tumor, illetve a szövet típusától, így ennek megfelelően a PKD1 bizonyos tumorokban szupresszor funkciót tölt be, míg más esetekben elősegíti a tumor progressziót [53].

#### *Prostata tumor*

Egészséges prosztatából származó szövetmintákban a PKD1 fehérjeszintje magas, azonban prostata tumorokban ez a fehérjeszint lecsökken [53]. Alapvetően kétféle prostata tumort különböztethetünk meg: androgén függő, és androgén független. Ez utóbbi főleg a késői stádiumokban fordul elő, és hatékony kezelési mód sem áll rendelkezésre. A PKD1 negatívan szabályozza az androgén receptor működését, ami talán magyarázza a PKD1 fehérjeszintjének csökkenését prostata tumorokban [54]. Az androgén függő prostata tumorok alacsony PKD1 szintje tovább csökken, amint a tumor androgén függetlenné válik [55]. A PKD1 alacsony mennyisége elősegíti továbbá a sejtek invazív fázisba való belépését, ugyanis egészséges állapotban a PKD1 pozitívan szabályozza az E-kadherin és  $\beta$ -katenin sejtkapcsoló fehérjéket, megerősítve ezzel a sejtek közötti kapcsolatot, és gátolva ezúton a sejt migrációt [56-58].

#### *Emlő tumor*

Egészséges emlő szövet sejtjeiben a PKD1 nagy mennyiségben expresszálódik csakúgy, mint a korai stádiumban levő emlő tumorok esetében. Áttétet képező emlő tumorok esetében azonban, alacsony PKD1 fehérjeszint figyelhető meg, ugyanis a PKD1 negatívan szabályozza a sejt vándorlásban és invázióban szerepet játszó kortaktin, paxillin illetve különböző MMP izoformák működését [38, 58-60].



### ***Gasztrointesztinális tumorok***

Az emésztőtraktus tumor sejtszövetekben azt figyelték meg, hogy a PKD1 szint 60-70%-kal lecsökkent a normál szövet sejtszövetéhez képest [61]. Kimutatták, hogy **gyomor tumor** sejtszövetekben a PKD1 expressziója rendellenes epigenetikai szabályozás következtében lecsökkent, és ez jól korrelált a megnövekedett áttétképzéssel. Ez utóbbit géncsendesítés módszerével kísérletes módon is bizonyították [58, 62]. **Vastagbél tumorokban** immun-hisztokémiás festéssel azt figyelték meg, hogy a PKD1 mennyisége előrehaladott stádiumokban szintén alacsonyabb volt az egészséges szövetéhez képest [63]. Kísérletes módon bizonyították, hogy a PKD1 a  $\beta$ -katenin sejtkapcsoló fehérjén keresztül erősíti a sejt-sejt kapcsolatokat, és tumor szuppresszív hatást fejt ki, [53]. Azonban vastagbél tumor mikro-környezetében található simaizom sejtek a tumor növekedést elősegítő TNF- $\alpha$ -t termelnek, aminek hatására a COX-2 fehérjeszint is megemelkedik, ehhez viszont a PKD1 működése is szükséges [64, 65].

### ***Hasnyálmirigy tumor***

A hasnyálmirigy tumor az egyik legagresszívabb és legnehezebben kezelhető tumoros megbetegedés. Ellentétben a fenti példákkal, hasnyálmirigy tumorok esetében a PKD1 működése elősegíti a tumor progressziót. Betegekből származó hasnyálmirigy adenokarcinóma minták több mint 60%-ában a PKD1 sokkal nagyobb mennyiségben van jelen, mint az egészséges szövet sejtszövetekben. Továbbá a PKD1 916-os szerin oldalláncának foszforilációja is jelentős mértékben megemelkedik a normál szövetéhez képest, ami az enzim aktivitására utalhat [66] [67]. Hasnyálmirigy tumor sejtszövetekben leírták, hogy az egyik, tumor növekedésben is szerepet játszó peptid, a neurotensin a receptorán keresztül képes aktiválni a PKD1-et, és rajta keresztül a sejtproliferációt indukáló Erk1/2 kinázokat. A neurotensin indukált sejtproliferáció, illetve *in vivo* állatmodellben a tumor növekedés PKD inhibitorok hatására szignifikáns csökkenést mutatott, ami tovább bizonyítja a PKD1 szerepét ebben a jelátviteli útvonalban és a hasnyálmirigy tumor progresszióban [68]. PKD1-et kis mennyiségben expresszáló hasnyálmirigy tumor sejtszövetekben mesterséges módon túltermeltették a PKD1-et, amelynek következtében a tumor sejtszövetek érzékenysége a CD95 vagy Fas által indukált apoptózis irányába szignifikánsan lecsökkent. A jelenség molekuláris hátterében különböző anti-apoptotikus fehérjék, úgymint c-FLIPL és survivin termelésének

felerősödése állt. Azonban a sejtek PKD-inhibitorral történő kezelése visszaállította a sejtek CD95 irányába mutatott érzékenységét [67].

### **2.3.2 A PKD1 szerepe egyéb megbetegedésekben**

A tumorokban betöltött szerep, és a későbbiekben részletezett patológiás angiogenezis, és gyulladásos folyamatokban feltárt funkciókon kívül a PKD1 szerepét részletesen leírták a keringési rendszer megbetegedésével kapcsolatos szívizom hipertrófiában, így a következőkben röviden erről lesz szó.

#### ***Szívizom hipertrófia***

A szívizomsejtek patológiás megnövekedésében, azaz a szívizom hipertrófiában is bizonyítottan szerepe van a PKD1-nek [69]. A szívizom hipertrófia kiváltó tényezői lehetnek például a magas vérnyomás, vagy molekuláris szinten az angiotenzin II-, az endotelin-1, a noradrenalin és az aldosteron, amelyek egyébként PKD1 aktivációt okoznak szívizomsejtekben [70-72]. Ahogyan már korábban volt róla szó, szívizom sejtekben az aktivált PKD1 foszforilálja HDAC5-öt, és ezzel annak inaktivációját, valamint sejtmagból való kiáramlását idézi elő, ezáltal viszont a hipertrófia kialakulásában kulcsfontosságú gének transzkripciója indul be [31, 73].

## **2.4 A PKD1 szerepe az angiogenezis és a gyulladás folyamatában**

### **2.4.1 Az angiogenezis és a gyulladás folyamatának kapcsolata**

Az angiogenezis és a gyulladás folyamata több megbetegedésben is együtt fordul elő, ilyenek például a reumatoid arthritisz, Crohn betegség, diabétesz, érlemezésedés és a tumoros megbetegedések [74]. A gyulladásos területen megtalálható immunsejtek több olyan faktort termelnek, amelyek hatással vannak az érendotél sejtekre, azok növekedésére, és így magára az angiogenezisre [54-56]. Másrészt pedig az újonnan képződő vérerek oxigénnel és tápanyagokkal látják el a gyulladásos területen jelen levő sejteket, valamint újabb immunsejteket „toboroznak” a gyulladás helyszínére. A továbbiakban néhány konkrét patológias mechanizmus példáján keresztül mutatom be a két jelenség kapcsolatát.

A **reumatoid arthritisz** (RA) egy autoimmun betegség, amely a népesség nagyjából 1%-át érinti, de a pontos kiváltó okát a mai napig nem ismerjük [75]. A reumás elváltozás során kezdetben a gyulladás jelei figyelhetőek meg, amit az ízületi hártya (synovium) sejteinek elburjánzása követ, és ennek következtében hipoxiás állapot alakul ki [76]. Ebben az állapotban angiogenikus faktorok termelődése indul be, és megkezdődik az érképződés. Kimutatták, hogy a RA-ben szenvedő betegek ízületi folyadékában az angiogenezis egyik kulcsszereplőjének, a VEGF-nek a mennyisége megemelkedett, valamint, hogy a vérerek mennyisége jól korrelál a synoviumot borító elburjánzott sejtek mennyiségével [77-79]. Ezen kívül a gyulladt állapotú synovium területén más angiogenikus faktorokat is kimutattak, amelyek szintén nagyobb mennyiségben voltak jelen (Ang1, Ang2, MMP) [80-82]. Az új erek képződése újabb fehérvérsejtek beáramlását idézte elő. Terápia tekintetében a gyulladásos folyamatok megcélzásán kívül (pl.: a TNF $\alpha$ -ellenanyag Infliximab) felmerült az érképződés folyamatának gátlása is [83]. E tekintetben RA állatmodellekben biztató eredményeket értek el különböző angiogenezis gátló szerekkel, mint például a fumagillin analóg TN-470-nel [84].

**Tumороk** mikro-környezetében szintén jelen vannak gyulladásért felelős immunsejtek, amelyek gyulladásos citokineket termelnek, továbbá a fehérvérsejtek szuperoxid és nitrogén-monoxid termelése révén tovább fokozzák a karcinogén hatást [74, 85]. A

tumorerok folyamatos növekedéséhez, egy bizonyos méretet – 1 mm átmérő – meghaladva saját érrendszer kifejlesztése szükséges [86]. Ezt a tumor, illetve mikro-környezete (beleértve az immunsejteket is) angiogenikus faktorok termelésével (VEGF, TNF $\alpha$ , COX-2) éri el [74, 87, 88]. Több klinikai tanulmány leírta, hogy a tumor környezetében jelen levő fehérvérsejtek mennyisége egyenesen arányos az újonnan képződött vérerek mennyiségével, tehát a két folyamat valóban szoros kapcsolatban áll egymással [89, 90].

## **2.4.2 A PKD1 szerepe az angiogenesis folyamatában**

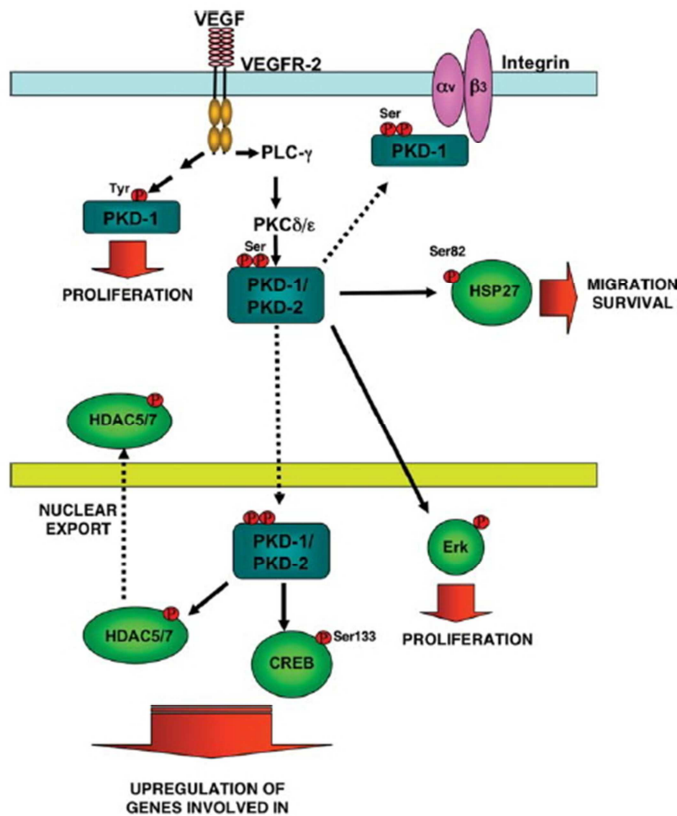
### *Az angiogenesis általános jellemzése*

Embrionális korban az érrendszer kialakulásának folyamatát vaszkulogenesisnek, míg felnőttkorban a már meglévő erekből történő újabb érhálózat kialakulását angiogenesisnek nevezzük [91]. Az angiogenesis folyamata sok esetben esszenciális szerepet tölt be a szervezet egészséges működésében, például a sérüléseket követő szövetmegújulásában. Azonban az angiogenesis több patológias folyamat velejárója is lehet, mint például tumoros vagy autoimmun megbetegedések esetében, ahol a szövet burjánzásának következtében hipoxias állapot alakul ki és ez angiogenikus faktorok termelését idézi elő. Daganatok esetében ismert, hogy amint a tumor eléri az 1 mm átmérőt, nem képes további növekedésre. Ugyanis eddig az állapotig a tumor sejtjei diffúzió útján jutottak tápanyaghoz és oxigénhez, azonban 1 mm átmérőjű tumorok esetében a tumor belső sejtjei, az erősen korlátozott diffúzió miatt nem kapják meg a további növekedéshez szükséges tápanyagot. Az így kialakult hipoxia következtében termelt angiogenikus faktorok érhálózat fejlesztését stimulálják, amely elősegíti a tumor további növekedését. Az angiogenesis molekuláris mechanizmusában több növekedési faktor is szerepet játszik (FGF, PDGF, EGF, MET), azonban a VEGF-et és a hozzá kapcsolódó VEGFR2 jelátviteli útvonalat tartja a szakirodalom domináns szerepűnek [92, 93]. A VEGFR kináz család három ismert tagot számlál, amelyek a következők: VEGFR1, VEGFR2 és VEGFR3. A VEGFR1 szerepéről keveset tudunk, viszont azt leírták, hogy a VEGFR1 negatívan befolyásolja az angiogenesiszt, méghozzá azért, hogy ugyanazt a ligandokat köti meg, mint VEGFR2, azonban kináz aktivitással csak kis mértékben rendelkezik. A VEGFR2, mint az angiogenesis kulcsszereplője, érendotél sejteken nagy mennyiségben expresszálódik. A harmadik izoforma, a VEGFR3 pedig a

limfoid szövetek angiogenikus folyamatában játszik döntő szerepet. A receptor ligandok tekintetében ötfélet ismerünk: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D és PlGF. Az angiogenesis szempontjából mindközül a legfontosabb a VEGF-A, amely a VEGFR2 ligandja, és kötődése aktiválja a VEGFR2-ből kiinduló jelpályát. A patológiás angiogenesis célzott gátlása egy jelenleg is használt és hatékony stratégia a tumorelles terápiaiban, és a jövőben más betegségek esetében is az lehet [94-96].

### A PKD1 szerepe az angiogenesis folyamatában

Érendotél sejtekben a PKD1 és 2 izoforma expresszálódik nagy mennyiségben. Mindkét izoforma része a VEGFR2 jelátviteli útvonalnak, ugyanis érendotél sejteket VEGF-fel kezelve rövid időn belül PKD1 és 2 foszforiláció és aktiváció figyelhető meg (8. ábra) [97]. Részletesen azonban a PKD1 szerepét ismerjük ebben a folyamatban. A PKD1



8. ábra PKD1 szerepe a VEGFR2 jelátviteli útvonalban érendotél sejtekben. A folyamatos vonalak foszforilációt és/vagy aktivációt, a szaggatott vonalak fehérje transzlokációt jelentenek. Forrás:[26]

aktiváció mechanizmusa két útvonalon keresztül valósul meg. Az egyik lehetőség, amikor a VEGFR2 951-es tirozin oldalláncának foszforilációján keresztül, a PLCγ PIP<sub>2</sub>-ből DAG-ot és IP<sub>3</sub>-ot generál. Ennek hatására, a már korábban tárgyalt módon, a DAG-on keresztül a sejtmembránhoz kihorgonyzott PKD1 és különböző PKC izoformák, például a PKCδ vagy PKCε, aktiválják a PKD1-et. 2. A másik aktivációs mechanizmushoz a VEGFR2 1059-es tirozin oldalláncának foszforilációja szükséges, és a

szempontjából, ugyanis a Hsp27 gén csendesítése csökkenti VEGF-indukált érendotélsejt migrációt [99, 100]. Bebizonyították továbbá, hogy a PKD1 stimulálja az  $\alpha v\beta 3$  integrinek sejtfelszínre való kihelyeződését, valamint gátolja azok endocitózisát [101]. Ezek az integrin molekulák fontos pozitív szabályozó szerepet játszanak az angiogenezis folyamatában [102]. Ahogyan a 8. ábrán is látható a PKD1 befolyásolja még a sejtproliferációért felelős **Erk** jelpályát is, ugyanis a PKD1 géncsökkentése csökkenti a VEGF indukált Erk1/2 foszforilációt, és gátolja a DNS szintézist [97]. A PKD1 fontos szabályozó szerepet tölt be az angiogenezis folyamatában fontos gének transzkripciójában is. Az egyik ismert mechanizmus során a PKD1 a **CREB** transzkripciós faktort foszforilálja, és bekapcsolja az angiogenezis szempontjából fontos Nurr1 gén expresszióját [103]. Másfelől, ahogyan már volt róla szó, a PKD1 képes szabályozni a transzkripciót a 2a típusú hiszton deacetilázok csoportjába tartozó **HDAC5** és **HDAC7** regulációján keresztül, ugyanis egy inaktiváló foszforiláció révén, előidézi azok sejtmagból való kiáramlását, ezáltal az angiogenezisben fontos szabályozó gének expresszióját indítja be [34, 35]. Leírták, hogy a működésképtelen PKD1-et, vagy konstitutívan aktív HDAC5-öt expresszáló sejtekben az angiogenezisben szintén fontos Nurr77 és Egr3 gén expressziója jelentősen csökken, mindez tovább bizonyítja a PKD1-HDAC5 között fennálló transzkripciót szabályozó kapcsolatot [103].

Láthatjuk tehát, hogy a PKD1, a VEGFR2 jelpálya tagjaként, több szinten is képes beavatkozni az angiogenezis mechanizmusába.

### 2.4.3 A PKD1 szerepe gyulladási folyamatokban

#### *A gyulladásról röviden*

A gyulladás, mint szervezetünk alapvető védekezési mechanizmusa, egy rendkívül bonyolult és összetett folyamat, amelyről a következőkben csak néhány fontosabb, az értekezés témájához kapcsolódó gondolatot említek meg. A folyamat során egy komplex, sok faktorból álló (citokinek, kemokinek, stb.) kémiai hálózat aktiválódik, amely immunsejtek aktivációját és vándorlását idézi elő a sérült területre. A védelmi rendszerben elsőként a neutrofil granulociták jelennek meg a gyulladási területen, őket követik az monocitákból differenciálódó szöveti makrofágok, és eozinofil granulociták, később pedig megjelennek a B- és T-limfociták is [104]. A gyulladások, alapvetően

védekező funkciójuk ellenére, számos esetben a szervezetet károsító hatással is rendelkezhetnek. Ennek megfelelően a gyulladások két fő típusát ma már elkülönítik, beszélnek ún. terápiás és patológiás gyulladásokról, melyekhez például a makrofágok különböző (M1-M2 típusú) aktivációja, valamint eltérő jelátviteli utak, citokin-profil és metabolikus folyamatok tartoznak [105]. A patológiás gyulladások közé tartoznak a krónikus gyulladással járó folyamatok is. Ezeknek egy nagy csoportját képezik az autoimmun megbetegedések, amelyek a nyugati országok népességének 5%-át érintik [106]. A leggyakoribb autoimmun megbetegedések közé tartozik például az ízületi szövetek megnagyobbodásával, később pedig porc és csont leépüléssel járó rheumatoid artritisz, a krónikus bélgyulladással, kellemetlen tünetekkel és fájdalommal járó Crohn betegség, vagy például a hasnyálmirigy inzulintermelő béta sejtjeinek fokozatos elhalásával járó 1-es típusú diabétesz. Ezen kívül krónikus, patológiás gyulladással járó folyamatok jelenléte figyelhető meg több tumoros megbetegedés esetében is [104, 107, 108]. Az ilyen gyulladások növelik bizonyos tumortípusok kialakulásának kockázatát, ilyenek például: a gyomor, húgyhólyag, nyelőcső, pajzsmirigy, petefészek, prosztata, illetve vékonybél tumorok [109]. Azonban, nem szteroid gyulladáscsökkentőkkel csökkenthető például emlő és vastagbél tumorok kialakulásának és mortalitásának gyakorisága [109, 110]. A tumorok közvetlen környezetében már a tumor kifejlődésének korai fázisában emberi, illetve állatmodellekből vett mintákból egyaránt kimutathatók immunsejtek, gyulladással járó citokinek és kemokinek [109]. Az autoimmun betegségekhez hasonlóan, bizonyos gyulladással járó citokinek (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), transzkripciós faktorok NF- $\kappa$ B, STAT3), vagy egyes immunsejttípusok farmakológiai gátlása csökkenti a tumorok további növekedését [111-114]. A helyzet komplexitását mutatja, hogy például NSCLC esetében, magában a tumorban megemelkedett TNF- $\alpha$  szint növeli a túlélést, a tumor mikro-környezetében jelen levő nagy mennyiségű TNF- $\alpha$  azonban csökkenti azt [115]. Ezen kívül a tumorokban legnagyobb gyakorisággal előforduló onkogének (MYC, RAS, RET) olyan fehérjék expresszióját aktiválják és olyan jelátviteli mechanizmusokat indítanak be, amelyek a gyulladással járó folyamatokra jellemzőek, megteremtve ezzel a gyulladás folyamatához szükséges körülményeket [116-118].

A gyulladás folyamatának farmakológiai gátlása, ahogyan a későbbiekben látni fogjuk, hatékony és bevett módszer a klinikumban több megbetegedés esetében, továbbá ígéretes stratégia lehet a jövőben más patológiás mechanizmusok kezelésére is.

### ***A PKD1 szerepe neutrofil granulocitákban***

A jelenlegi munka egyik fókuszpontját a neutrofil granulociták képezik, ezért erről a sejttípusról írok bővebben a PKD1 szerepét illetően. A neutrofil granulociták az immunrendszer elsődleges védelmi vonalának részeként, főként a bakteriális és gombás fertőzések elleni védekezésben vesznek részt, azonban bizonyítottan szerepet játszanak több autoimmun megbetegedésben is. A neutrofilek nyugalmi állapotban az érrendszerben keringenek, azonban valamely gyulladási stimuláns hatására egy többlépcsős folyamatnak köszönhetően, a sérült rész közelében kilépnek az érpályából, és a kritikus területre vándorolnak. A neutrofil granulociták egyik fontos védekező válaszreakciója a NADPH-oxidáz enzimeken keresztül történő szuperoxid gyökök termelése. 2002-ben Davidson-Moncada és munkatársai mutatták ki először a PKD1 jelenlétét neutrofil granulocitákban. Az általuk végzett kísérletekben a PKD1 genetikai és farmakológiai gátlása képes volt csökkenteni az Fc $\gamma$ -receptor aktiváción keresztül megvalósuló szuperoxid termelést, bizonyítva ezzel azt, hogy a PKD1 egy kulcsszereplője a Fc $\gamma$ -receptor jelpályának [119]. Egy másik tanulmányban kimutatták, hogy a (*Saccharopolyspora rectivirgula*) túlérzékenységi tüdőgyulladásos állatmodellben, neutrofil granulocitákban a PKD1 is aktivált állapotban van, és szerepet játszik a MAP kinázok aktivációjában, a NF- $\kappa$ B regulációjában és gyulladási citokinek termelésében [27]. A PKD1 szerepét bakteriális fertőzés mellett gombás fertőzéseket kísérő neutrofil aktivációban is bizonyították. *Cryptococcus neoformans* fertőzés hatására PKD1 aktiváció következik be a neutrofil granulocitákban szfingolipid jelátviteli útvonalon keresztül, ahol a szfingomielin szintáz közreműködésével DAG keletkezik és megtörténik a PKD1 aktiváció [120]. Érdekes módon azonban akut tüdőkárosodásos állatmodelleken végzett kísérletekben azt találták, hogy a PKD1 gátlása idézi elő a neutrofil granulociták tüdő alveolusokba való bevándorlását. Ebben a leírt mechanizmusban a neutrofil válaszreakcióban kulcsfontosságú p38 $\delta$  közvetlenül képes gátolni a PKD1 működését [121]. Láthatjuk tehát, hogy neutrofil granulocitákban a PKD1 több sejtfunkció fontos részvevője, azonban pontos szerepe még korántsem tekinthető teljesen felderítettnek.



***PKD1 szerepe egyéb immunsejtekben***

A PKD1 szerepét leírták **hízósejtek** különböző faktorokkal indukált sejtválaszaiban is. PKD1 aktiváció történik mind a természetes (Pam3CSK4 - TLR2) és adaptív (Fc $\epsilon$ RI) immunválasszal kapcsolatos jelpályák, mind pedig növekedési faktor receptor (SCF – Kit) aktiváció következtében hízósejtekben [122]. Különösen érdekes volt az, hogy ez a PKD1 aktiváció PKC-től független, azonban a pontos mechanizmus feltérképezése még várat magára. A fenti stimulusk hatására bekövetkező gyulladáshoz citokintermelés közül a CCL2 termelésre volt hatással a PKD1 [123].

**Makrofágokban** a PKD1 expresszálódik, és a TLR indukált citokintermelésben játszik szerepet [124]. Ezen kívül egyelőre keveset tudunk a PKD1 (vagy bármely más izoforma) szerepéről ezekben a sejtekben.

**B-limfocitákban** a B-sejt receptor (BCR) aktivációjában írták le a PKD1 szerepét. Egyrészt a BCR és a CD19 aktivációt követő keresztkötődése PKD1 aktivációhoz vezet. Ez az aktiváció negatív visszacsatolást eredményez a BCR által működésbe hozott enzimkaszkádkra, ugyanis kimutatták, hogy a PKD1, foszforiláció révén gátolja a Syk-kinázt [125]. Másrészt viszont, a BCR általi PKD1 aktiváció nem csak negatív szabályozást tesz lehetővé, ugyanis a B-sejt aktiváció során a BCR és a CD40 között lejátszódó interakció során bekövetkező jeltovábbításnak egy nélkülözhetetlen eleme a PKD1 [126, 127]. A BCR aktivációt követően a PKD1 a már jól ismert módon szabályozza a génextpressziót, vagyis a HDAC5 és HDAC7 foszforilációján keresztül [128].

**T-limfocitákban** nem mutatható ki PKD1 sem fehérje, sem pedig mRNS szinten, azonban ezekben a sejtekben azt találták, hogy a PKD2 a domináns forma [129].

## **2.5 Kináz inhibitorok**

### **2.5.1 A kináz inhibitorok terápiás alkalmazása**

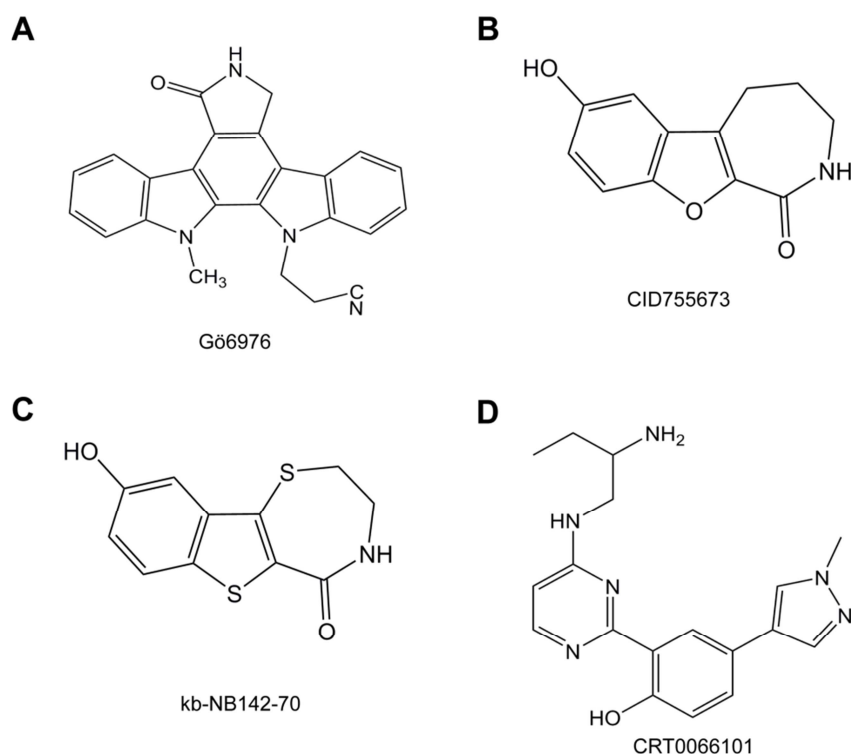
A legtöbb megbetegedés a sejtek kommunikációs zavarára vezethető vissza, amit molekuláris szinten a sejtek közötti vagy sejten belüli jelátviteli folyamatok abnormális működése okoz. A kináz inhibitorok terápiás alkalmazásával ezeket a rendellenesen funkcionáló jelátviteli útvonalakat tudjuk megcélozni. Az első ilyen terápiás célra kifejlesztett kináz inhibitor az imatinib (Glivec<sup>®</sup>) volt, amelynek célpontja a krónikus mieloid leukémiában (angol rövidítéssel CML) szenvedő betegekben megtalálható fúziós fehérje a Bcr-Abl [130, 131]. Az imatinib a CML-ben szenvedő betegek több mint 90%-ában ért el teljes javulást, sajnos azonban később az esetek nagy részében imatinib rezisztencia alakult ki [132]. Ezért olyan második generációs gátlószerek kifejlesztésére volt szükség, amelyek hatékonyan képesek gátolni a rezisztencia mutációt hordozó Bcr-Abl-t. Ilyen gátlószerek voltak a Dasatinib és a Nilotinib, amelyekkel sikeresen lehetett kezelni az imatinib rezisztens betegeket [133, 134]. Később fény derült arra, hogy egy betegségben – főként tumorokban végzett tanulmányok alapján – nem csupán egy, hanem több jelátviteli útvonal is részt vesz a patológias folyamatok kialakulásában és fenntartásában [135]. Ehhez hozzájárul még az a tény, hogy a kináz inhibitorok a célfehérjén kívül még több más kinázt is gátolnak, tehát bizonyos kináz inhibitorok azért hatékonyak a terápiában, mert hatásukat nem csak a célkinázon, hanem más kinázok gátlásán keresztül is kifejtik. Így felmerült annak a lehetősége, ami a mai elfogadott koncepció, hogy a kináz inhibitorok fejlesztése során ne csupán egy célpontra fókuszáljunk, hanem az adott rendellenes mechanizmus szempontjából releváns több kinázra, így ezekkel a gátlószerekkel egyidejűleg több célpontot is tudunk támadni [136, 137].

### **2.5.2 A PKD1 inhibitorok**

A kereskedelmi forgalomban elérhető PKD1 inhibitorok száma igen csekély, nem izoforma specifikusak, szelektivitásuk terén sem mutatnak kimagasló eredményt, és sok esetben nem túl hatékonyak. Meglátásunk szerint szükség van tehát újabb PKD

inhibitorok kifejlesztésére, azonosítására. Az alábbiakban a kereskedelemben kapható PKD inhibitorokat mutatom be röviden.

Az első PKD-inhibitor az indolokarbazol alapszerkezetű **Gö6976** volt, amely mindhárom PKD-izofórmát gátolja (9. ábra/A) [138]. Ezt a gátlószert igen sok tanulmányban használták a PKD1 funkciójának felderítésére, később azonban kiderült, hogy a PKD-kat gátló koncentrációtartományban egyéb protein kinázokat is gátol a vegyület [139].



9. ábra A kereskedelmi forgalomban kapható PKD inhibitorok kémiai szerkezete A: Gö6976, B: CID755673, C: kb-NB147-70, D: CRT0066101

A következő PKD1 inhibitor felfedezésére több mint 10 évet kellett várni. Ekkor megjelent egy közlemény, amelyben a benzoxoloazepinolon származék **CID755673**, mint potenciális PKD gátló, hatását vizsgálták prosztata tumor sejtvonalakon (9. ábra/B) [140]. A vegyület egyik hátránya, hogy relatíve magas koncentrációtartományban kell használni ahhoz, hogy a kívánt hatást elérjük, azonban itt már felmerül a kérdés, hogy a kapott kísérleti eredményeket a kinázgátló „off-target” hatása miatt látjuk vagy sem. Továbbá az inhibitor használata ellen szól - főként

esetleges terápiás felhasználása esetén - hogy sejtproliferáció indukáló hatása van egy PKD1-től teljesen független útvonalon keresztül [141].

A következő PKD1 gátlószer a CID755673 analóg vegyülete, a **kb-NB142-70**, amelyet szintén prosztata tumor sejtvonalakon teszteltek jó eredménnyel (9. ábra/C). A kb-NB142-70 sokkal hatékonyabban gátolja a PKD1-et mind *in vitro*, mind pedig sejtes körülmények között, az előd CID755673-mal összehasonlítva [142]. A kb-NB142-70 szintén gátolja mindhárom PKD izoformát, azonban egyéb szelektivitási adat nem áll a rendelkezésünkre.

Az eddigi leghatékonyabb, és kereskedelmi forgalomban is kapható PKD1 inhibitor a **CRT0066101**, ami szintén pan-PKD inhibitor (9.D ábra) [66]. Ez a gátlószer jó eredményeket mutatott hasnyálmirigy tumor sejteken, ahol gátolta a PKD1 szubsztrát Hsp27 foszforilációt, és csökkentette a sejttúlélésben is fontos szerepet játszó NF-κB működését. Ez volt az első PKD inhibitor, amelyet *in vivo* körülmények között is vizsgáltak hasnyálmirigy tumor xenograftokban pozitív eredménnyel, ugyanis a CRT0066101 szignifikáns mértékben csökkentette a tumor növekedést [66].

Ezen kívül publikáltak még további PKD inhibitorokat, amelyek azonban kereskedelmi forgalomban nem érhetőek el [143-148].

### 2.5.3 Az angiogenezist célzó kináz inhibitorok

Folkman 1971-ben írta le, hogy a tumor ellenes terápiában az angiogenezis folyamatának gátlása egy hatékony stratégia lehet, azonban elég hosszú idő telt el mire klinikai felhasználásban megjelent az első angiogenezist gátló gyógyszer [149-151]. Ezek a vegyületek főleg a VEGF, a VEGFR2 és a hozzá kapcsolódó jelátviteli útvonal gátlására fókuszálnak [152]. A klinikán levő egyik gátlószer a **Bevacizumab** (Avastin<sup>®</sup>), amely egy VEGF-A elleni antitest, és hatását azáltal fejt ki, hogy megköti a VEGF-A ligandokat, amelyek így nem tudnak a receptorukhoz, például a VEGFR2-höz kapcsolódni, vagyis annak aktivációja elmarad [153]. A Bevacizumabot sikeresen használják vastagbélrák kezelésére kombinálva kemoterápiával, miután az FDA jóváhagyta annak használatát a pozitív eredményekkel záruló *in vivo* állatkísérleteket követően [154]. A másik stratégia a VEGF receptorok, főként a VEGFR2 működésének a gátlása tirozin kináz inhibitorokkal. Ilyen klinikai használatban levő VEGFR

gátlószerek a Sunitinib (Sutent<sup>®</sup>) és a Sorafenib (Nexavar<sup>®</sup>). A **Sunitinib** egy multi-kináz inhibitor, több célponttal, amelyek közül a legfontosabbak a három VEGFR izoforma, a PDGFR és a c-Kit [155, 156]. A Sunitinibet sikeresen használják a klinikumban vese illetve gastrointestinális stromális tumorok kezelésére. A **Sorafenib** szintén egy multi-kináz inhibitor, amelynek legfőbb célpontjai a VEGFR2, VEGFR3, Raf és ERK kinázok. A Sorafenib felhasználási területe is a vese, pajzsmirigy és máj tumorok elleni terápia [157]. Az **Axitinib** (Inlyta<sup>®</sup>) is a vese tumorok kezelésében használják sikeres eredménnyel, amelynek fő célpontja, a három VEGFR izoforma mellett a c-Kit és PDGFR tirozin kinázok [158].

Az angiogenezist célzó inhibitorok felhasználása a tumorokon kívül más területekre is kiterjed, ilyen például a Bevacizumab felhasználása időskori macula degeneráció kezelésére [159].

#### 2.5.4 Kináz inhibitorok a gyulladás elleni terápiában

A tumorelles terápiahoz hasonlóan a gyulladás elleni terápiában is egyre több kinázgátló jelenik meg biztató eredményekkel, azonban ezeknek a vegyületeknek a száma elmarad a tumorterápiában használt gátlószerektől. Itt alapvetően négy fő célpontról beszélhetünk, amelyekre a gyógyszertervezés jelenleg fókuszál: 1. JAK-kinázok, 2. MAPK kinázok, 3. Syk kináz, 4. Src család kinázok [160].

Az első csoport a JAK nem receptor tirozin kinázok ellen fejlesztett gátlószerek. A JAK enzimek a kinázfunkcióval nem rendelkező citokinreceptorokhoz kapcsolódnak, és továbbítják a jelet a STAT fehérjék felé, amelyek különböző gének transzkripcióját indítják el [161]. Több tanulmány is kimutatta, hogy a reumatoid artritiszben szenvedő betegek ízületi nedvéből izolált mintákban a különböző JAK izoformák expressziója megemelkedett, így a JAK kinázok egy jó terápiás célpontot képeznek a gyulladáselleni terápiában. Az első FDA által elfogadott JAK gátlószert a **Tofacitinib** volt, amit azóta is sikeresen alkalmaznak reumatoid artritisz kezelésére [162]. A következő terápiás célra elfogadott JAK inhibitor a **Ruxolitinib** volt, amelyet az FDA mielofibrózis kezelésére engedélyezett [163]. Jelenleg zajlanak a Ruxolitinib reumatoid artritisz kezelésében folytatott klinika II fázis tanulmányai pozitív eredményekkel. Ezen kívül több JAK inhibitor is van klinikai fázisvizsgálatban, ilyen például a GLPG-0634 vagy a VX-509

[160]. A következő gyógyszercélpont a MAPK kinázok csoportja, amelyek közül a p38 működésének gátlása bizonyult hatékonynak a gyulladás elleni terápiában, ugyanis számos citokinreceptor jelpályájában szerepel, és további gyulladásos citokinek termelését idézi elő [164]. A p38 inhibitorok közül reumatoid arthritisz kezelésére az SB 220025 (Sigma-Aldrich) preklinikai fázisban van, míg a **VX-702** (Vertex) sikeresen teljesítette a II-es klinikai fázist [160, 165]. A harmadik fontos célpont a Syk kináz, amely jól ismert tagja különböző immunsejt receptorok jelpályáinak, úgymint a B- és T-sejt receptorok vagy Fc receptorok [166]. Rheumatoid arthritisben szenvedő betegek synoviális folyadékából nyert mintákban azt találták, hogy a Syk expresszió megemelkedett a kontroll mintákhoz képest, továbbá a Syk felelős a gyulladásos citokinek termeléséért ezekben az esetekben [167]. Az első klinikai vizsgálatokban is felhasznált Syk inhibitor a **Fostamatinib** (Astrazeneca – Rigel) volt, amely hatékonynak bizonyult a reumatoid arthritisz elleni terápiában klinika II vizsgálatokban, azonban a III. klinikai fázis vizsgálatokat felfüggesztették [160, 168]. A negyedik célpontot a Src családba tartozó tirozin kinázok (Src, Fgr, Lyn, Hck) képezik, amelyek az utóbbi években egyre inkább előtérbe kerülnek, mint gyulladásos folyamatok fontos célpontjai [169]. Gyulladással kapcsolatos terápiában még nincsen Src inhibitor klinikai fázis vizsgálatban, azonban a CML kezelésében használt **Dasatinib** például biztató eredményeket ért el gyulladásos modelleken végzett első kísérletek alapján [170].

### 3. 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 céljával azt tűztük ki, hogy a Vichem Chemie Kutató Kft. kinázgátló vegyülettárát felhasználva, olyan új kináz inhibitor, 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:

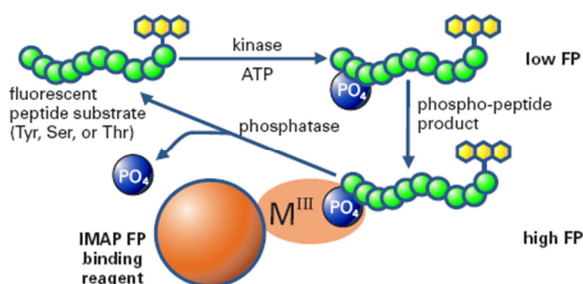
- A Vichem Kft. tulajdonában lévő kinázokra optimalizált vegyülettár nagy áteresztőképességű előszűrése *in vitro* módszerrel rekombináns PKD1 enzimre.
- Az előszűrés során kiválogatott PKD1 gátló vegyületek további karakterizálása, szerkezet-hatás összefüggésének vizsgálata, továbbá a gátlószerek szelektivitás 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 gátlószerek karakterizálása a munka során beállított patológiás sejtmodelleken, ahol vizsgálni kívántuk a gátlószerek sejten belüli hatásmechanizmusát és egyéb, a PKD1 szempontjából releváns, sejtfunkciókra gyakorolt hatását.

## 4. Módszerek

### 4.1 Rekombináns kináz vizsgálatok

#### 4.1.1 IMAP<sup>®</sup> módszer

A kináz inhibitorok PKD1 gátló hatását a Molecular Devices által kifejlesztett IMAP<sup>®</sup> módszerrel vizsgáltuk. A módszer lényege, hogy a rekombináns kináz és ATP-t tartalmazó reakcióelegyhez egy fluoreszcens festéssel konjugált peptid szubsztrátot adunk, ami foszforilálatlan állapotában alacsony fluoreszcencia polarizáció értéket



**10. ábra** Az *IMAP-reakció*: IMAP FP binding reagent: IMAP kötő reagens (nanogyöngy), FP: fluoreszcencia polarizáció Forrás: [www.moleculardevices.com](http://www.moleculardevices.com)

produkál. Azonban ha az enzim foszforilálja ezt a szubsztrátot, az először egy háromértékű fémionhoz kötődik, ezután az egész komplex egy nanogyöngyöz kapcsolódik, lecsökken a mobilitása, ami magas fluoreszcencia polarizáció jelet eredményez, ez pedig a kináz aktivitására utal (10. ábra). A

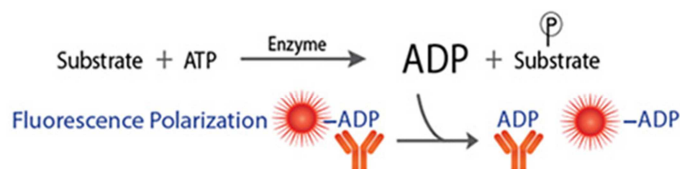
kísérletet fekete 384-lyukú lemezekon végeztük a következő összetételű reakció pufferben: 20 mM HEPES (pH: 8,0), 1 mM DTT, 0,4 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,01% (v/v) Brij-35, a K<sub>M</sub> értéknek megfelelő 0,41 μM ATP, amit korábbi kísérletek során határoztunk meg. Ehhez adtuk hozzá a DMSO-ban feloldott és kihígított inhibitorokat (a végső DMSO koncentráció 2% volt), a PKD1 specifikus peptid szubsztrátot, amely aminosav szekvenciája a következő volt: KKLNRTLVA. A peptidszubsztrát TAMRA fluoreszcens festéssel konjugált, aminek segítségével detektálni tudtuk a kináz aktivitását. Ezek után a reakcióelegyhez adtunk 20 nM rekombináns PKD1 enzimet (ProKinase), amivel elindítottuk a kináz reakciót. A reakció 30 percig futott szobahőmérsékleten, fénytől védett helyen, majd leállítottuk 10 μl IMAP-kötő reagenset 1:400 arányban tartalmazó IMAP-Binding puffer hozzáadásával és tovább inkubáltuk 60 percig szobahőmérsékleten fénytől védett helyen. Ekkor történt meg a foszforilált peptid szubsztrát fémion-nanogyöngy komplexhez való kötődése. Az inkubációs idő



letelte után mértük az egyes reakciók fluoreszcencia polarizációját Analyst GT (Molecular Devices) többfunkciós olvasókészülék segítségével 530 nm-en történő gerjesztés, és 570 nm-en történő emisszió mellett.

#### 4.1.2 Transcreener<sup>®</sup> módszer

A rekombináns *in vitro* VEGFR2 inhibitor tesztelést a BellBrook Labs által kifejlesztett Transcreener<sup>®</sup> módszerrel végeztük el. A módszer lényege, hogy a reakcióelegyhez fluoreszcens festékkel konjugált (Alexa633) ADP-t, és anti-ADP ellenanyagot adunk. Az 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 (11. ábra).



11. ábra Transcreener<sup>®</sup>-módszer Forrás: [www.mobitec.com](http://www.mobitec.com)

A méréseket 384-lyukú fekete lemezekon végeztük el a következő összetételű reakciópufferben: 20 mM HEPES (pH: 7,5), 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% (v/v) Tween-20, 32 μM ATP (korábban meghatározott K<sub>M[ATP]</sub> érték), amihez hozzáadtuk a vizsgálni kívánt gátlószereket. Peptid szubsztrátként Poly Glu-Tyr (4:1) peptidet, azaz glutaminsavat és tirozint 4:1 arányban tartalmazó peptidet használtunk 0,04 mg/ml koncentrációban, míg a rekombináns VEGFR2 (ProQinase) végső koncentrációja 6 nM volt. Az enzimreakció 1 órán keresztül futott szobahőmérsékleten, fénytől elzárt helyen. A reakciót Stop&Detect puffer hozzáadásával állítottuk le, amelyhez hozzáadtuk az Alexa633-mal jelölt ADP-t és az anti-ADP ellenanyagot, majd további 1 órát inkubáltuk szobahőmérsékleten, fénytől elzárva. Végül 630 nm hullámhosszon való gerjesztés mellett, 670 nm-en detektáltuk a fluoreszcencia polarizációt Analyst GT (Molecular Devices) többfunkciós olvasókészülék segítségével.

### 4.3 Sejtenyésztés

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. Az EA.hy926 sejteket 10 % magzati borjú szérumot (FBS - Lonza) és 1% MycoZap (Lonza) antibiotikum keveréket tartalmazó DMEM (Lonza) médiumban tartottuk 37 °C-on 5 % CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó termosztátban. A sejteket passzálás során illetve a különböző kísérletekhez történő felhasználás előtt 0,1 %-os tripszin-EDTA (Lonza) oldattal vettük fel majd 150g-vel 4 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk, és számoltuk Countess (Invitrogen) sejtszámoló készülék segítségével, tripánkék festést követően, hogy kizárjuk az elpusztult sejteket. A tripánkék festéshez a sejtuszpenziót 1:1 arányban elegyítettük 0,4% tripánkék tartalmú oldattal (Sigma –Aldrich).

### 4.4 MTT-módszer

Az EA.hy926 sejteket 96 lyukú sejtenyésztő lemezre helyeztük ki 10% FBS-t és 1% antibiotikumot tartalmazó DMEM médiumban, lyukanként 10<sup>4</sup> db sejtet, majd 37 °C-on inkubáltuk CO<sub>2</sub>-termosztátban. 24 óra letapadás után a sejteket kezeltük az inhibitorokkal állandó 0,5% DMSO koncentráció mellett és 37 °C-on inkubáltuk CO<sub>2</sub>-termosztátban. A kezelési idő lejártát követően a médiumot óvatosan leszívtuk a sejtekről, majd 2:3 arányban elegyített PBS-DMEM médium keverékében feloldott 1 mg/ml végkoncentrációjú MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid) -oldatot (Sigma-Aldrich) adtunk a sejtekhez és 1,5-2 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Ez idő alatt az élő sejtek mitokondriumaiban az MTT lila színű formazán kristályokká redukálódik. Ezt követően az MTT-oldatot óvatosan leszívtuk, majd a képződött formazán kristályokat 10% (v/v) Triton X-100-at, 1% (v/v) 0,1N HCl-ot tartalmazó izopropanol oldatban oldottuk fel, az mértük abszorbanciát 570 nm-en, 690 nm referencia hullámhossz mellett Synergy 2 többfunkciós olvasókészülékkel (BioTek). Az eredmények kiértékeléséhez az 570 nm-en mért adatokat használtuk fel, amelyeket előzőleg korrigáltunk a 690 nm-en mért értékekkel.

## 4.5 Membrán permeabilitás vizsgálata PAMPA módszerrel

A PAMPA vizsgálathoz a BD Biosciences által erre a célra gyártott, foszfolipidekkel előkezelt mesterséges membránt tartalmazó 96 lyukú plate rendszert használtuk. Ez a módszer kiválóan modellezi a különböző hatóanyagok sejtmembránon keresztül történő passzív transzportját *in vitro* körülmények között. A plate rendszer alapvetően két részből áll: egy felső, inzerteket tartalmazó akceptor lemezből, amelyen a mesterséges membránok is helyet foglalnak, valamint egy alsó donor lemezből, amibe a felső akceptor lemezt helyezük a mérés során. A gyártó előírása szerint a vegyületekből 200  $\mu\text{M}$  töménységű oldatokat készítettünk PBS-ben. Ezekből az oldatokból az alsó donor lemez lyukaiba 0,3 ml-t mértünk. A felső inzertes akceptor lemez lyukaiba 0,2 ml 4% DMSO tartalmú PBS-t tettünk, majd ezt a felső akceptor lemezt óvatosan az alsó donor lemezbe helyeztük, és szobahőmérsékleten a gyártó előírásának megfelelően 5 órán keresztül inkubáltuk. Ezután az akceptor lyukakból, és az alsó donor lemez lyukaiból, illetve a kiindulási 200  $\mu\text{M}$  koncentrációjú oldatokból 0,2-0,2 ml-t pipettázunk át egy UV méréshez kompatibilis 96 lyukú lemezre. A méréshez használt vegyületeknek a mérést megelőzően felvettük a fényelnyelési spektrumát, ahol mindhárom vegyület esetében (VCC251801, koffein, amilorid) ugyanazt a fényelnyelési maximum értéket, azaz 280 nm-t kaptunk. Ennek megfelelően az UV lemezre kimért oldatok abszorbanciáját is ezen a hullámhosszon határoztuk meg, és a penetráció értékét a következő lépések alapján számoltuk ki:

1. Először kiszámoltuk a kapott abszorbancia adatok alapján a donor ( $C_d$ ) és akceptor ( $C_a$ ) lyukakban levő oldatok inhibitor koncentrációját:

$$C_d = C_0 \times (A_d - A_p / A_0 - A_p) \text{ illetve } C_a = C_0 \times (A_a - A_p / A_0 - A_p)$$

ahol  $C_0$  a kiindulási koncentráció,  $A_d$  a donor minta,  $A_a$  az akceptor minta,  $A_0$  a kiindulási minta, és  $A_p$  a tiszta puffer – jelen esetben a 4% DMSO tartalmú PBS – abszorbancia értéke.

2. A koncentrációk ismeretében meghatároztuk az egyensúlyi koncentrációt ( $C_{eq}$ ):

$$C_{eq} = (C_d \times V_d + C_a \times V_a) / (V_d + V_a)$$

ahol  $V_d$  a donor, és  $V_a$  az akceptor lyukba mért térfogat, mintánként.

3. Az egyensúlyi koncentráció meghatározásával pedig meg a következő képlet segítségével ki tudtuk számolni a permeabilitás (penetrancia) ( $P_e$ ) értékét:

$$P_e = -\ln(1 - C_a / C_{eq}) / S \times (1 / V_d + 1 / V_a) \times t$$

ahol  $S$  a mesterséges membrán felülete négyzetcentiméterben, és  $t$  az inkubációs idő.

## 4.6 Sejtprolifерáció vizsgálat

Az EA.hy926 sejteket 24 lyukú sejttenyésztő lemezre raktuk ki - lyukanként 50 000 db sejtet - 10% FBS-t és 1% antibiotikumot tartalmazó DMEM médiumban és egy éjszakán keresztül hagytuk őket letapadni 37 °C-os CO<sub>2</sub> inkubátorban. A következő napon megkezeltük a sejteket a gátlószerekkel, konstans 0,5% DMSO koncentráció mellett, majd a megadott ideig inkubáltuk CO<sub>2</sub> inkubátorban. A kezelési idő lejártá a médiumot eltávolítottuk, a sejteket PBS-sel mostuk, hogy eltávolítsuk az elpusztult sejteket, majd 1%-os tripszin-EDTA oldattal felvettük az élő sejteket és tripánkékes festést követően Countess (Invitrogen) sejtszámoló készülékkel meghatároztuk a sejtszámot.

## 4.7 SDS-PAGE és Western blot

Az EA.hy926 sejteket 6 cm átmérőjű Petri csészékbe ültettük ki, 10% FBS és 1% antibiotikum tartalmú DMEM médiumban, majd addig növesztettük, amíg elérték a 90-95%-os konfluenciaszintet. A kezelés előtt 4 órával a médiumot lecseréltük szérummentes médiumra, amelyben később a sejtek inhibitorokkal való előkezelése is megtörtént, ez további 1 óra volt. A kezelési idő lejártá után a sejteket 25 nM PMA-val, vagy 25 ng/ml VEGF-fel indukáltuk 20 percig. Ezt követően a médiumot eltávolítottuk, és jégen dolgoztunk tovább. Kétszer mostuk a sejteket jéghideg PBS-sel, majd 150 µl jéghideg, proteáz és foszfatáz inhibitorokkal kiegészített RIPA pufferben lizáltuk. A RIPA puffer összetétele a következő volt: 50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0.5% (m/v) Na-dezoxikolat, 0.1% (m/v) SDS, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, amelyhez frissen adtunk hozzá 50 mM NaF-ot, 1 mM DTT-t, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-ot és 0,5 % (v/v) proteáz inhibitor koktélt (Calbiochem). A sejteket gumikaparóval felkapartuk, a szuszpenziót eppendorf csövekbe mértük, majd jégen 4 x 10 másodpercig szonikáltuk,

és további 20 percig jégen tartottuk. Ezután a lizátumokat 4 °C-on 10 000g-vel 15 percig lecentrifugáltuk, a felülúszót megtartottuk, és ezzel dolgoztunk tovább. A fehérjekoncentrációt Bradford módszerrel határoztuk meg, a maradék mintához pedig 5x töménységű Laemmli puffert adtunk és a fehérjéket 97 °C-on 5 percig denaturáltuk. A mintákból a detektálandó fehérjétől függően 20-80 µg-ot vittünk fel az SDS tartalmú poliakrilamid gélek zsebeibe, majd konstans 130 V feszültség mellett futtattuk. A gélek akrilamid tartalmát tekintve 8, illetve 10%-os géleket használtunk. Ezt követően a gélből a fehérjéket PVDF membránokra transzferáltuk 400 mA áramerősség mellett, jégben hűtve. A transzferálás után a PVDF membrán szabadon maradt kötőhelyeit 5% (m/v) tejpor tartalmú TBST-ben blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az elsődleges ellenanyagokat 1% (m/v) BSA és 0,1% (m/v) Na-azid tartalmú TBST-ben hígítottuk ki és ebben a membránokat egy éjszakán keresztül 4 °C-on inkubáltuk. A felhasznált elsődleges ellenanyagok a következők voltak: pTyr951-VEGFR2, VEGFR2, pSer744/748-PKD1, pSer916-PKD1, PKD1, pSer473-Akt, Akt és β-actin, amelyeket a Cell Signaling-től szereztünk be, illetve pSer498-HDAC5 és HDAC5, amelyeket a Santa Cruz gyártott. A következő napon a membránokat háromszor 5-10 percig mostuk TBST-ben, majd 1% (m/v) tejport tartalmazó TBST-ben kihígított másodlagos ellenanyag oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A másodlagos ellenanyagok a következők voltak: anti-nyúl, és anti-egér ellenanyag, amelyeket egyaránt a Cell Signalingtől vásároltunk. Végül háromszor 5-10 percig mostuk a membránokat TBST-vel és az eredményt ECL - módszer segítségével detektáltuk.

#### **4.8 Sejtmigráció vizsgálat wound healing módszerrel**

A wound healing módszer lényege, hogy a szinte teljesen konfluens sejtréteget megkarcoljuk például egy pipetta hegygel, és követjük a sejtek vándorlását erre a karcolt, sejtmentes felületre. A jelenlegi kísérletben az EA.hy926 sejteket 6-lyukú sejtenyésztő lemezekben növesztettük teljes DMEM médiumban közel 90%-os konfluencia szintig. A kezelést megelőzően a médiumot szérumentesre cseréltük, és egy éjszakán át a sejteket ebben tartottuk, ugyanis korábbi kísérleteink szerint ez lelassítja az EA.hy926 sejtek osztódását. Közvetlenül a kezelés előtt a médiumot leszívtuk, a sejtréteget 200 µl-es pipetta hegygel megkarcoltuk, lyukanként 3 karcolást ejtettünk, majd a sejteket 3-szor mostuk PBS-sel, hogy eltávolítsuk a karcolás során

felúszott sejteket, sejtörmelékét. A kezelőszereket tartalmazó médiumot hozzáadtuk a sejtekhez, majd ezt követően mikroszkóp segítségével fotókat készítettünk, amit a kiértékelés során 0, azaz kezdeti időpontnak tekintettünk. Ezt követően a sejteket 37 °C-os CO<sub>2</sub> termosztátban inkubáltuk 18 órán keresztül, amit a kísérlet végpontjaként definiáltunk, és ismét fotókat készítettünk a különböző kezelésekről, karcolási helyekről. 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 képiértékelő szoftvert használtuk.

#### **4.9 *In vitro* angiogenesis vizsgálat**

Az *in vitro* angiogenesis 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.

A kísérlet kezdetén az extracelluláris mátrixként szolgáló, 4 °C-os folyékony halmazállapotú Matrigel-t (BD Biosciences) 96 lyukú sejttenyésztő lemez lyukaiba adtuk, lyukanként 50 µl-t majd a Matrigel-t tartalmazó sejttenyésztő lemezt 37 °C-on inkubáltuk 30 percig, hogy a Matrigel polimerizálódjon. Ezt követően minden Matrigel-t tartalmazó lyukba 30 000 db EA.hy926 sejtet raktunk a kezelőszerekkel együtt 100 µl végtérfogatban. A sejteket tartalmazó sejttenyésztő lemezt 18 órán keresztül 37 °C-on tartottuk CO<sub>2</sub>-termosztátban, majd minden egyes kezelésről fotókat készítettünk fáziskontraszt mikroszkóp segítségével. Az eredmények kiértékelését az ImageJ program Angiogenesis Analyzer Plugin szoftverének segítségével végeztük. Három különböző paramétert határoztunk meg: a képződött csövek számát, a csövek hosszának összegét, illetve a csövek által borított terület nagyságát. A 25. ábrán a folyamat különböző lépéseit bemutató fotókat az Essen BioScience által forgalmazott IncuCyte ZOOM<sup>®</sup> készülékkel készítettük.

#### 4.10 Szuperoxid termelés vizsgálata Amplex<sup>®</sup> Red módszerrel

Az érendotél EA.hy926 sejtek szuperoxid termelését Amplex<sup>®</sup> Red módszer segítségével határoztuk meg. A módszer lényege, hogy az Amplex<sup>®</sup> Red reagens hidrogén-peroxid jelenlétében 1:1 arányban piros színű, fluoreszcens rezorufinná alakul, amit detektálni tudunk. A sejteket steril, fekete, sima aljú 96 lyukú sejttenyésztő lemezre raktuk ki –  $3 \times 10^4$  sejtet lyukanként – és egy éjszakát hagytuk őket letapadni. A szuperoxid meghatározást KRPG pufferben (pH: 7,35) végeztük el, amelynek összetétele a következő volt: 145 mM NaCl, 5,7 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 4,86 mM KCl, 0,54 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,22 mM MgSO<sub>4</sub>, 5,5 mM glükóz. Az inhibitorokat KRPG pufferben hígítottuk ki, és adtuk a sejtekhez 100 µl végtérfogatban, majd 37°C-on 30 percig inkubáltuk. Ezt követően 50 µM Amplex<sup>®</sup> Red festéket és 0,1 U/ml torna-peroxidázt adtunk a rendszerhez, és további 60 percig 37°C-on inkubáltuk fénytől elzárt helyen. Ezután 570 nm-en megmértük az egyes kezelések fluoreszcenciáját 530 nm gerjesztési hullámhossz mellett Synergy Multimode Reader (BioTek) készülék segítségével.

#### 4.11 Neutrofil granulociták izolálása

A neutrofil granulocitákat egészséges önkéntes donorok perifériás véréből izoláltuk. A vért heparin tartalmú 50 ml-es csőbe gyűjtöttük, amihez hozzáadtunk 6%-os dextransz tartalmazó oldatot. A 30 percig történő dextransz ülepítést követően, 30 percig centrifugáltuk a felülúszót Ficoll (GE Healthcare) grádiensen keresztül. A maradék vörösvértesteket 0,2 % (m/v) hipotóniás NaCl-oldattal lizáltuk 40 másodpercig, majd 1,6 % (m/v) hipertóniás NaCl-oldattal a tonicitást fiziológiásra állítottuk. A neutrofil granulocitákat 20 mM HEPES tartalmú, kalcium és magnéziummentes HBSS-oldatban vettük fel, és dolgoztunk velük tovább az alábbi kísérleteknek megfelelően.

#### 4.12 Neutrofil granulociták szuperoxid termelésének vizsgálata

A szuperoxid termelésének mérését 96 lyukú ELISA sejttenyésztő lemezekken (Nunc Maxisorp) végeztük el. Az immobilizált **immunkomplex** aktiváláshoz humán szérumban albumint (HSA) és anti-humán szérumban albumint (anti-HSA) használtunk. Először a HSA-t (Sigma-Aldrich) karbonát-pufferben (pH: 9,6) hígítottuk ki 20 µg/ml

végkoncentrációban, majd vittük fel a sejtenyésző lemezekre, és 40 percig, lefedve, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően az oldatot leöntöttük, és 10% FCS tartalmú PBS-t (pH: 7,4) adtunk a lyukakhoz, hogy blokkoljuk a szabad fehérjekötő helyeket és szintén 40 percig, lefedve, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Végül az oldatot leöntöttük, és azokba a lyukakba, ahol neutrofil aktivációt kívántunk elérni, 1:200 arányban PBS-ben (pH: 7,4) kihígított anti-HSA oldatot tettünk, a többi lyukba 10% FCS tartalmú PBS-t, majd szintén 40 perc inkubáció következett a már fent említett körülmények között. Közvetlenül a sejtek lemezre való kihelyezése előtt az oldatot leöntöttük, és a lyukakat kétszer átöblítettük  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -mentes HBSS-Hepes oldattal.

Az **adhézió-függő** aktivációhoz a már fent említett típusú sejtenyésző lemez lyukait 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fibrinogén tartalmú PBS oldattal kezeltük elő, 1 órán keresztül, lefedve, szobahőmérsékleten. A sejtek kihelyezését megelőzően a lemezeket kétszer mostuk  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -mentes HBSS-Hepes oldattal, és stimulánsként az aktivációs lyukakba humán  $\text{TNF}\alpha$ -át (Preprotech) adtunk 20  $\text{ng}/\text{ml}$  végkoncentrációban.

A **PMA**-val történő aktiválás során a lyukakat 10% FCS-tartalmú PBS-sel kezeltük elő, 1 órán keresztül, lefedve, szobahőmérsékleten, majd a lemezeket kétszer átmostuk  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -mentes HBSS-Hepes oldattal, és a sejtek kihelyezése előtt 100 nM PMA-t (Sigma-Aldrich) adtunk a lyukakhoz.

A neutrofil granulocitákat a lemezekre történő kihelyezést megelőzően 30 percig  $37^{\circ}\text{C}$ -on előinkubáltuk a gátlószerekkel 0,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  tartalmú,  $\text{Mg}^{2+}$ -mentes HBSS/Hepes pufferben. Közvetlenül a kihelyezés és aktiváció előtt 1 mM  $\text{MgCl}_2$ -ot és 100  $\mu\text{M}$  ferricitokróm c-t adtunk a sejtuszpenzióhoz, és lyukanként  $10^5$  db sejtet raktunk ki a lemezre. A mérés során az abszorbanciát mértük 550 nm hullámhosszon, 540 nm referencia hullámhossz mellett  $37^{\circ}\text{C}$ -on 1 órán keresztül 2 percenként Thermo Labsystems Fluoroskan Ascent FL típusú olvasókészülékkel. A detektálás alapja az a megfigyelés, hogy a neutrofil granulociták által termelt szuperoxid gyökök a ferricitokróm c-t redukálják, így 550 nm hullámhosszon egy jól mérhető elnyelési csúcs jelenik meg (Dr. Mócsai Attila mérése alapján). A kapott abszorbancia értékekből levontunk a referencia hullámhosszon mért értékeket, valamint az első mérés, azaz a 0 időpont értékét. A mért értékekből számoltuk a szuperoxid mennyiséget  $10^6$  sejtre vonatkoztatva.



### 4.13 Neutrofil granulociták migrációjának vizsgálata

A neutrofil granulociták migrációjának vizsgálatához 24 lyukú Transwell-migrációs lemezeket (Corning) használtunk. A Transwell inzerterek alja polikarbonát filterrel borított, amin 3  $\mu\text{m}$  átmérőjű pórusok találhatóak. Ezt a filtert a kísérlet megkezdése előtt fibrinogénnel vontuk be felül és alul egyaránt, még hozzá úgy, hogy 150  $\mu\text{g/ml}$  fibrinogén tartalmú PBS oldatot adtunk az inzerterbe és a lyukba is egyaránt, majd ezt 1 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on, és az inzertereket kétszer mostuk  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -mentes HBSS-Hepes oldattal. A neutrofil granulocitákat az izolációt követően  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -mentes HBSS-Hepes oldatban kihígítottuk  $10^6$  sejt/ml koncentrációra. Ebből a sejtszuszpenzióból elkészítettük a különböző inhibitor kezeléseket, amihez 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot adtunk és 30 percig 37°C-on előinkubáltuk. Az inzerterbe történő kihelyezést megelőzően a sejtekhez 1 mM  $\text{MgCl}_2$ -ot adtunk, és az inzerterekbe 0,2 ml sejtszuszpenziót, azaz  $2 \times 10^5$  db neutrofil tettünk. Az inzerterek alatti lyukakba 37°C-ra előmelegített 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot és 1 mM  $\text{MgCl}_2$ -ot tartalmazó HBSS/Hepes-t tettünk, amelyek közül az aktivációs lyukak tartalmazták a kemoattraktánsként használt 100 nM fMLP-t. A sejteket 3 órán keresztül hagytuk vándorolni 37°C-on, majd a lemezt lecentrifugáltuk 4°C-on 5000 rpm-en 3 percig, hogy minden filteren átjutott sejtet a lyuk alá juttassunk. Az átjutott sejtmennyiséget pNPP (para-nitrofenil-foszfát) módszer segítségével határoztuk meg, amely során jégen dolgoztunk tovább. Az inzertereket kidobtuk, és a lyukakból a puffert óvatosan leszívtuk, majd 0,7 ml 10 mM pNPP tartalmú savas foszfátáz puffert adtunk a lyukakhoz, felszuszpendáltuk, és 96 lyukú ELISA lemezre pipettáztuk, és 37°C-on 90 percig inkubáltuk. Az enzimreakciót jégen, 5N NaOH hozzáadásával állítottuk le, majd az abszorbanciát 405 nm-en mértük. A fenti eljárás alapján a kiértékeléshez öttagú kalibrációs sort készítettünk, ahol a teljes, inzerterre kihelyezett sejtmennyiséget ( $2 \times 10^5$ ) tekintettük 100% sejt vándorlásnak, a sejteket nem tartalmazót pedig 0%-nak. A kalibrációs sorból határoztuk meg végül az átjutott sejtmennyiséget.

### 4.14 Statisztikai analízis

Minden kísérletet legalább három alkalommal ismételtünk meg, kivéve a PMA és VEGF időfüggését EA.hy926 sejteken tanulmányozó vizsgálatokat, ahol egy kísérletet

végeztünk. 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. A rekombináns kináz vizsgálatoknál, a western blot analízisnél és az *in vitro* angiogenezisnél a kísérleteken belül nem voltak párhuzamosok, itt tehát az egyes kísérletek átlagát, és azok szórását ábrázoltuk (átlag $\pm$ SD). A sejtproliferáció, a wound healing, az érendotél illetve neutrofil szuperoxid termelésnél, a neutrofil transzmigrációnál, a citotoxicitás és PAMPA vizsgálatoknál egy kísérleten belül legalább 2 párhuzamossal dolgoztunk. Így ezeknél a módszereknél az egyes kísérletek eredménye a kísérleten belüli párhuzamosok átlaga, tehát itt ezeket az értékeket átlagoltuk, és az átlagok szórását ábrázoltuk (átlag $\pm$ SEM). Az *in vitro* rekombináns kináz vizsgálatoknál meghatároztuk az ún. Z' értéket, amely a mérés megbízhatóságáról ad információt, és kiszámítása a következő módon történik:

$$Z' = 1 - ((3SD_{\max} + 3SD_{\min}) / (AV_{\max} - AV_{\min}))$$

ahol  $SD_{\max}$  a pozitív,  $SD_{\min}$  a negatív kontroll szórása, míg  $AV_{\max}$  a pozitív,  $AV_{\min}$  a negatív kontroll átlaga. Abban az esetben, ha a Z' érték  $\geq 0,5$ , a mérés megbízhatónak tekinthető. Azokat az eredményeket, ahol a mérés Z' értéke  $< 0,5$  volt, nem fogadtuk el megbízhatónak.

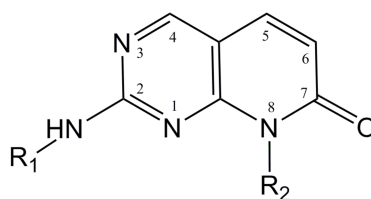
Az  $IC_{50}$  értékeket nem-lineáris regresszió módszerével határoztuk meg. A statisztikai analízist egymintás ANOVA, és Dunett teszttel végeztük el, és szignifikancia határnak  $p=0,05$  értéket tekintettük.

## 5. Eredmények

### 5.1 *In vitro* rekombináns kináz vizsgálat

#### 5.1.1 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<sup>®</sup> módszer segítségével. A mintegy 2000 molekulát tartalmazó EVL, egy kinázokra optimalizált, ATP-analógokat tartalmazó vegyülettár része. Az előszűrő tesztelés során minden kinázgátló vegyületet egy koncentrációban, 10  $\mu$ M-ban vizsgáltunk. A 2000 vegyület letesztelését követően a 75%-nál nagyobb gátlási értéket mutató vegyületeket válogattuk ki, ami 72 db vegyületet jelentett. Szintén IMAP<sup>®</sup> módszerrel megvizsgáltuk a kiválogatott molekulák koncentrációfüggését rekombináns PKD1 enzimen, 8 különböző koncentrációban és meghatároztuk a vegyületek IC<sub>50</sub>-értékeit (1. táblázat). Ezt követően azokat a molekulákat válogattuk ki, amelyek 1  $\mu$ M alatti IC<sub>50</sub> 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 (12. ábra). A további vizsgálatokban ezekre a vegyületekre helyeztük a hangsúlyt.



**12. ábra** A pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-on alapszerkezet. Az ábra ChemDraw Professional (CambridgeSoft) 15.0 szoftverrel készült.

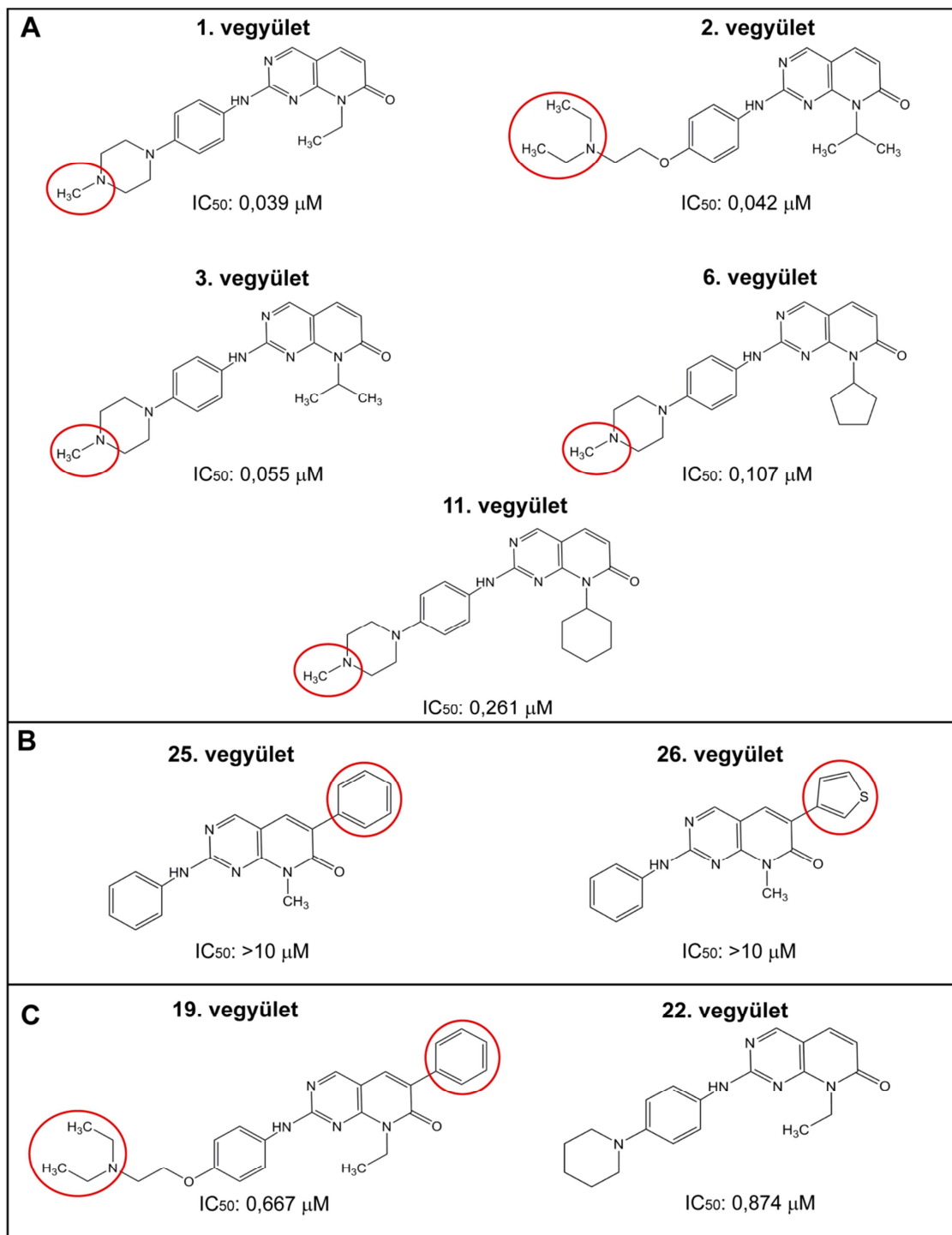
**1. táblázat** Az előszűrés során kiválogatott, 1  $\mu\text{M}$  alatti  $\text{IC}_{50}$  értékkel rendelkező PKD1 gátló vegyületek listája. A kinázgátló vegyülettár előszűrését IMAP<sup>®</sup> módszerrel végeztük el ( $n=3$ ).

Vegyület sorszáma	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) Átlag
<i>1</i>	0.039
<i>2</i>	0.042
<i>3</i>	0.055
<i>4</i>	0.078
<i>5</i>	0.092
<i>6</i>	0.107
<i>7</i>	0.156
<i>8</i>	0.184
<i>9</i>	0.2
<i>10</i>	0.255
<i>11</i>	0.261
<i>12</i>	0.29

Vegyület sorszáma	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) Átlag
<i>13</i>	0.355
<i>14</i>	0.383
<i>15</i>	0.524
<i>16</i>	0.613
<i>17</i>	0.631
<i>18</i>	0.647
<i>19</i>	0.667
<i>20</i>	0.79
<i>21</i>	0.859
<i>22</i>	0.874
<i>23</i>	0.892
<i>24</i>	0.936

### 5.1.2 Szerkezet-hatás összefüggés

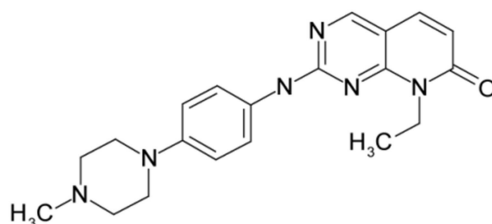
A következőkben megvizsgáltuk, hogy találunk-e összefüggést a pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-on alapszerkezetű vegyületek szerkezete és PKD1 gátló hatása között. Ehhez az EVL könyvtárból olyan molekulákat is kiválogattunk, amelyek szintén pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-on alapszerkezettel rendelkeznek, azonban 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, az alapváztól adott távolságban 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 (*13.ábra/A*). A PKD1-et gyengén gátló vegyületek a 2-es pozícióban nem tartalmaznak bázikus amin csoporttal rendelkező molekularészt, továbbá a gátlás csökkenését okozzák a 6-os pozícióhoz kapcsolódó aril vagy tienil csoportok (*13.ábra/B*). A feltárt szerkezet-hatás összefüggés szempontjából megvizsgáltuk a 19-es és 22-es vegyületeket is. A 19-es vegyület az előnyös 2-es és a hátrányos 6-os pozícióban egyaránt hordozza a már fent említett releváns funkciós csoportokat. A 22-es molekula a 6-os pozícióban nem tartalmaz szubsztituenst, és a 2-es pozícióban sem tartalmaz megfelelő bázikus csoportot. Ezen két vegyület tehát a várakozások szerint gátolta ugyan a rekombináns PKD1 működését, de sokkal kisebb mértékben, mint az optimális szerkezettel rendelkező vegyületek (*13.ábra/C*).



**13. ábra** A *pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-on* alapszerkezettel rendelkező PKD1 inhibitorok szerkezet-hatás összefüggésének vizsgálata A: a PKD1-et hatékonyan gátló vegyületek, B: a PKD1-et nem gátló vegyületek, C: a PKD1-et gyengébb mértékben gátló vegyületek. A kísérleteket IMAP<sup>®</sup> módszerrel végeztük el ( $n=3$ ). A szerkezeti képletek ChemDraw Professional (CambridgeSoft) 15.0 szoftverrel készültek.

### 5.1.3 Szelektivitás vizsgálat

A következőkben kíváncsiak voltunk az előző fejezetben bemutatott hatékony PKD1 gátlók – azaz az 1-es, 2-es, 3-as, 6-os és 11-es vegyület - szelektivására más kinázokkal szemben, ezért elvégeztettünk egy szelektivitási vizsgálatot a SignalChem céggel. A vizsgálatához olyan kinázokat válogattunk össze, amelyek funkció, illetve szerkezet szempontjából nagy hasonlóságot mutatnak a PKD1 enzimmel. A különböző kinázok egységesen 5  $\mu$ M inhibitor koncentrációval szemben lettek letesztelve (*Mellékletek - 1. táblázat*). Az eredmények alapján a 2-es és 11-es vegyület volt a legkevésbé szelektív, ugyanis kisebb-nagyobb mértékben az összes vizsgált kinázt gátolta. Az 1-es, 3-as és 6-os vegyületek közül az 1-es molekula volt a legszelektívebb. Ez a vegyület nem gátolta szignifikáns mértékben a PKD1-et fiziológiásan sok esetben aktiváló újszerű PKC izoformákat, úgymint a PKC $\epsilon$  és PKC $\delta$  vagy a klasszikus PKC izoformákat (PKC $\alpha$  és PKC $\gamma$ ). Szintén nem volt tapasztalható jelentős gátlás a PKD1-gyel szerkezetileg homológ kinázok, a CAMK1 és MLCK esetében sem, valamint meglepetésünkre a másik PKD izoforma, a PKD2 gátlása is csak mérsékelt volt (67%). A szelektivitási adatok alapján az 1-es vegyületet választottuk ki a további kísérletekhez, amely a Vichem Kft. hivatalos elnevezése szerint a VCC251801 azonosítóval rendelkezik (*14. ábra*). Mivel ez a vegyület a doktori munkám alapjául szolgáló elsőszerzős közleményben is a VCC251801 néven szerepel, ezen a néven fogok rá hivatkozni a továbbiakban.

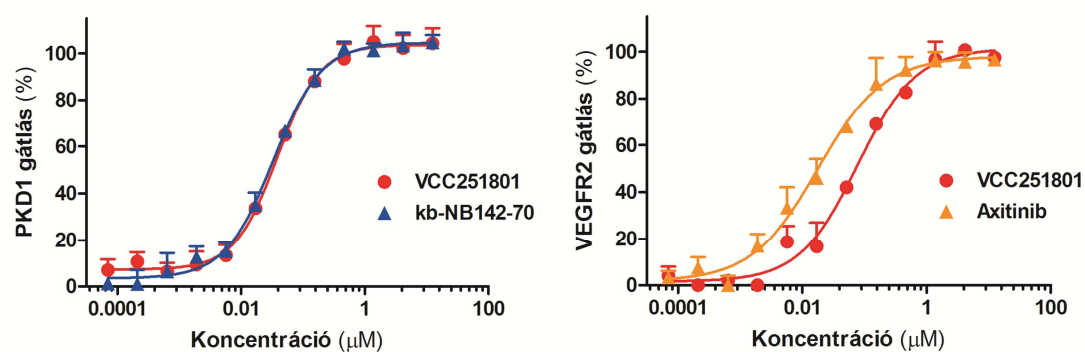


**14. ábra** A VCC251801 kémiai szerkezete. Az ábra ChemDraw Professional (CambridgeSoft) 15.0 szoftverrel készült.

További *in vitro* kináz vizsgálatok során kiderült, hogy a VCC251801 másik fontos célpontja a VEGFR2. Ezért, hogy jobban körbejárjuk ezt a területet, a ProQinase cég segítségével megvizsgáltuk, hogy a VEGFR család másik két tagjára, a VEGFR1-re és VEGFR3-ra milyen hatással van a gátló szerünk (*Mellékletek – 2. táblázat*). Ahogyan láthatjuk a VCC251801 a VEGFR2-n kívül gátolta a másik két izoforma működését is *in vitro* kináz vizsgálatban 1  $\mu$ M inhibitor koncentráció mellett.

Mivel a VEGFR izoformák 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. Részletesebben megvizsgáltuk a VCC251801 koncentrációfüggését a VEGFR2 és a PKD1 enzimeken egyaránt, ezúttal azonban 12 különböző dózist használtunk. A kísérlet eredményeit referencia inhibitorok eredményeivel hasonlítottuk össze (*15. ábra*). PKD1 referencia vegyületként a jelenlegi kereskedelmi forgalomban kapható egyik legjobb PKD gátló szer, a kb-NB142-70-et használtuk [142]. VEGFR2 referencia vegyületként pedig a klinikai használatban levő VEGFR gátló szer, az Axitinibet használtuk [158]. (Ezeket a gátló szereket a későbbi sejtes kísérletekben is referencia inhibitorokként alkalmaztuk.) A VCC251801 PKD1 gátló hatását vizsgálva azt figyeltük meg, hogy a kb-NB142-70-nel azonos mértékben gátolta az enzim működését, valamint a kb-NB142-70 esetében is a szakirodalomban közölt  $IC_{50}$  értéket kaptuk (26 nM). A VCC251801 szintén hatékony volt a VEGFR2 gátlásában, még hozzá alacsony (69 nM)  $IC_{50}$  érték mellett. Az Axitinib szintén blokkolta a VEGFR2 működését, ami alátámasztja mérési módszerünk megbízhatóságát. Fontos még megjegyezni azt, hogy kísérleteink alapján, a kb-NB142-70-nek nem volt hatása a VEGFR2 funkciójára, illetve az Axitinib sem gátolta a PKD1 működését.





Gátlószer	IC <sub>50</sub> (μM)	
	PKD1	VEGFR2
VCC251801	0.028 ± 0.002	0.069 ± 0.013
kb-NB142-70	0.026 ± 0.006	8.142 ± 3.527
Axitinib	≥ 12.5	0.020 ± 0.013

**15. ábra** A VCC251801 dózisfüggése és az ebből számolt IC<sub>50</sub> értékek rekombináns PKD1 és VEGFR2 enzimeken. A PKD1 vizsgálatát IMAP<sup>®</sup>, a VEGFR2 mérést Transcreener<sup>®</sup> módszerrel végeztük 0,005 – 10 μM-ig terjedő koncentráció tartományban. PKD1 mérés esetében a referencia vegyület a kb-NB142-70, illetve VEGFR2 esetében az Axitinib volt (n=3).

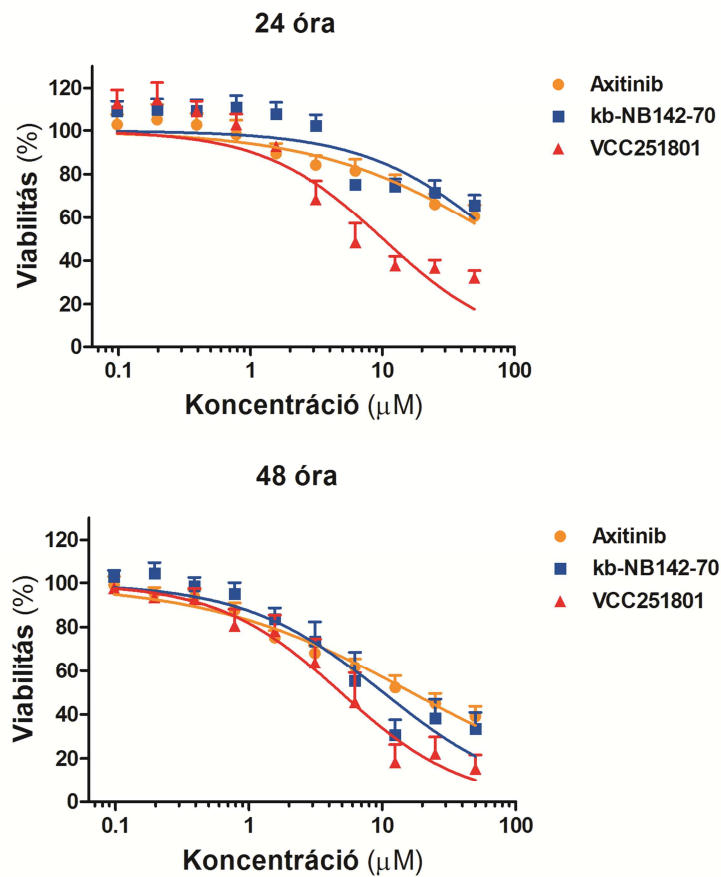
Mivel a PKD1 és VEGFR2 bizonyítottan szerepet játszik patológiás angiogenesis, valamint különböző gyulladásos folyamatok kialakulásában és fenntartásában, a további vizsgálatokhoz az angiogenesis és a gyulladás folyamatában szerepet játszó sejtes modelleket választottunk.

## 5.2 Korai ADME-Tox paraméterek meghatározása

A gyógyszerfejlesztés folyamatának egy fontos része az ADME-Tox paraméterek meghatározása. Az ADME az Abszorpció, Disztribúció, Metabolizmus és Exkréciónak a rövidítésére, a Tox pedig a citotoxicitásra utal. Jelen esetben a korai ADME-Tox paraméterek közül megvizsgáltuk a VCC251801 citotoxicitását az EA.hy926 érendotél sejtvonalon, illetve meghatároztuk a mesterséges lipid membránon való penetrációját.

### 5.2.1 Citotoxicitás vizsgálat

A citotoxicitás vizsgálatához az erre a célra széles körben használt MTT módszert alkalmaztuk. Jelen esetben a sejteket 10 különböző koncentrációban - 0,4  $\mu\text{M}$ -tól 50  $\mu\text{M}$ -ig terjedő koncentráció tartományban - kezeltük az inhibitorokkal állandó 0,5%-os DMSO tartalom mellett 24 és 48 óra inkubációs időket alkalmazva (16. ábra). A VCC251801-gyel történő kezelés 24 óra elteltével a legnagyobb, azaz 50  $\mu\text{M}$  koncentrációban sem okozott teljes sejtpusztulást, ugyanis az életképes sejtek száma nem csökkent 40% alá a kezeletlen kontroll mintához képest, és az  $\text{IC}_{50}$  érték is relatíve magas volt: 10,12  $\mu\text{M}$ . 24 órás kezelést követően a referencia inhibitorok sem okoztak drasztikus sejtvitalitás csökkenést. Ez esetben, a legnagyobb koncentrációkban sem csökkent az élő sejtek száma 60% alá. A 48 órás kezelés esetében a sejtvitalitás még nagyobb mértékben csökkent. Az Axitinib nagyjából 30%-ra csökkentette az életképes sejtek számát, míg a kb-NB142-70 és VCC251801 kb. 20%-ra, azonban egyik vegyület sem okozott 100%-os sejtpusztulást 48 óra elteltével sem.



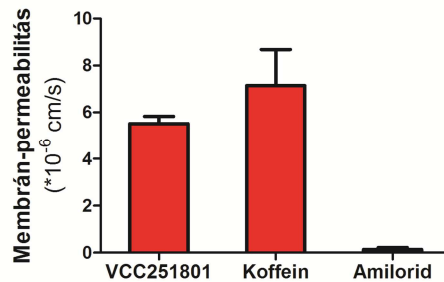
Gátlószer	IC <sub>50</sub>	
	24 óra	48 óra
VCC251801	10.12 μM	4.89 μM
kb-NB142-70	77.97 μM	10.17 μM
Axitinib	78.85 μM	16.61 μM

**16. ábra** A VCC251801 érendotélsejtek viabilitására gyakorolt hatása. A citotoxicitás vizsgálatot MTT módszerrel végeztük el 0,4-50 μM koncentráció tartományban, állandó 0,5% DMSO tartalom mellett ( $n \geq 3$ ).

## 5.2.2 PAMPA

Ezek közül először a VCC251801 lipid membránon történő passzív átjutását vizsgáltuk. A módszer során speciális inzerteket tartalmazó 96-lyukú lemezeket használtunk. Az inzertek egy sejtmembránt modellező réteget tartalmaznak, amelyen keresztül megtörténhet a gyógyszerjelölt molekulák transzportja. A kísérlethez a szakirodalomból

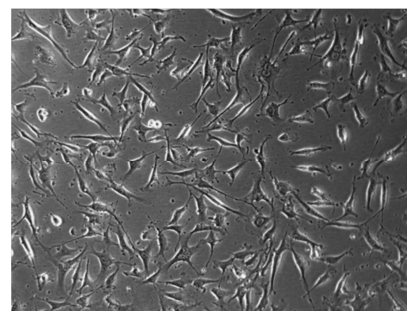
ismert referencia vegyületeket használtunk, amelyek közül egy jól és egy kevésbé jól penetráló vegyületet választottunk. A jól penetráló a koffein, míg a kevésbé jól penetráló az amilorid volt [171]. A PAMPA vizsgálat eredményét a 'Módszerek' fejezetben tárgyalt képlet alapján határoztuk meg cm/s egységekben a 17. ábrán. A szakirodalmi adatoknak megfelelően, azokat a vegyületeket tekintjük jól penetrálóknak, amelyek penetráció értéke  $1,5 \times 10^{-6}$  cm/s felett van [171]. Ahogyan 17. ábrán is látható a koffein, mint jól penetráló referencia vegyület magas,  $7 \times 10^{-6}$  cm/s értéket ért el, míg a kevésbé penetráló vegyület, az amilorid igen alacsony,  $10^{-7}$  cm/s értéket produkált. Azonban ebben a rendszerben a VCC251801 szintén magas,  $5,5 \times 10^{-6}$  cm/s penetráció értéket mutatott, ami igen jó eredménynek számít a membránon történő passzív transzport szempontjából.



**17. ábra** A VCC251801 hatékonyan képes passzív transzporttal átjutni a mesterséges lipid membránon. A membrán penetráció vizsgálatot a BD Biosciences PAMPA-plate rendszer segítségével végeztük el 200  $\mu$ M kiindulási inhibitor, illetve referencia vegyület koncentráció, és 4% DMSO tartalom mellett ( $n=3$ ).

## 5.3 Angiogenesis modellen végzett vizsgálatok

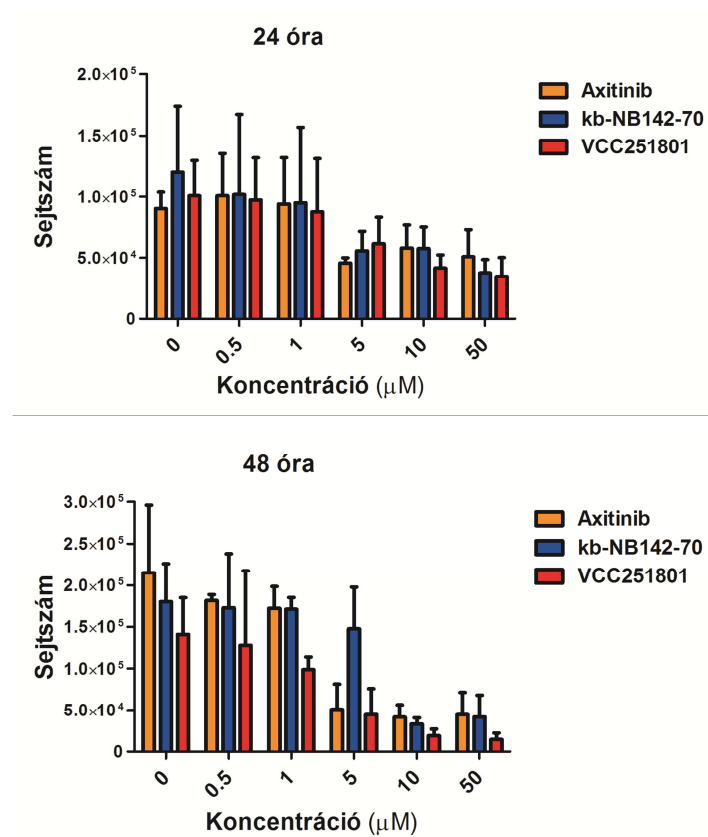
Érendotél sejtes modellnek a széles körben használt endotél eredetű, immortalizált EA.hy926 sejt vonalat választottuk (18. ábra). A sejt vonalat 1983-ban a primer érendotél HUVEC és a tüdő adenokarcinóma A549 sejt vonalak fúziójából állították elő [172].



18. ábra Az EA.hy926 sejtek morfológiája

### 5.3.1 Érendotélsejt proliferáció vizsgálat

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a VCC251801 hogyan befolyásolja az érendotél sejtek proliferációját, amit tripánkék festéses sejtszámolással végeztünk el. A VCC251801-et és a referencia inhibitorokat 5 különböző koncentrációban adtuk a sejtekhez 0,5  $\mu\text{M}$ -tól 50  $\mu\text{M}$ -ig terjedő tartományban, 24 és 48 óra kezelési időtartamban (19. ábra). A 0,5 és 1  $\mu\text{M}$ -os kezelések nem okoztak szignifikáns sejtproliferáció csökkenést 24 illetve 48 óra elteltével egyik inhibitor esetében sem. A 24 órás kezeléseknél a sejtproliferáció mértéke egyaránt kb. 50%-kal csökkent 5, 10 és 50  $\mu\text{M}$  koncentráció mellett mindhárom gátlószer esetében. 48 óra elteltével az Axitinib és a VCC251801 5  $\mu\text{M}$  dózisban közel 75%-kal csökkentette a sejtproliferáció mértékét, azonban a kbNB-142-70 proliferáció gátló hatása nem volt számottevő ebben a koncentrációban. Azonban, 10 illetve 50  $\mu\text{M}$  mellett már mindhárom gátlószer jelentős mértékben, legalább 80%-kal csökkentette a sejtek proliferációját. Az  $\text{IC}_{50}$  értékeket tekintve elmondható, hogy mindhárom gátlószer 24 és 48 óra elteltével szignifikáns sejtproliferáció csökkenést okozott 5, 10 és 50  $\mu\text{M}$  koncentrációban, viszont ez alól kivételt képez az 5  $\mu\text{M}$  kbNB142-70 kezelés 48 óra után, ugyanis a kísérleteink szerint ennek nincs hatása az érendotél sejtek proliferációjára.



Gátlószer	IC <sub>50</sub>	
	24 óra	48 óra
<i>VCC251801</i>	12.35 μM	1.11 μM
<i>kb-NB142-70</i>	17.04 μM	6.88 μM
<i>Axitinib</i>	21.98 μM	3.51 μM

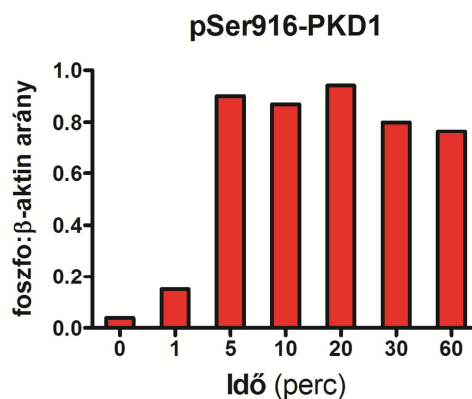
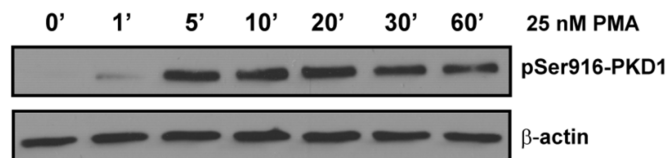
**19. ábra** A *VCC251801* koncentrációfüggő módon csökkentette az érendotél sejtek proliferációját. A kísérletet tripánkék festést követő sejtszámolással végeztük ( $n=4$ ).

A további kísérleteinkhez a fenti eredmények figyelembevételével választottuk ki a kezelési koncentrációtartományokat.

### 5.3.2 Érendotél sejten belüli hatásmechanizmus

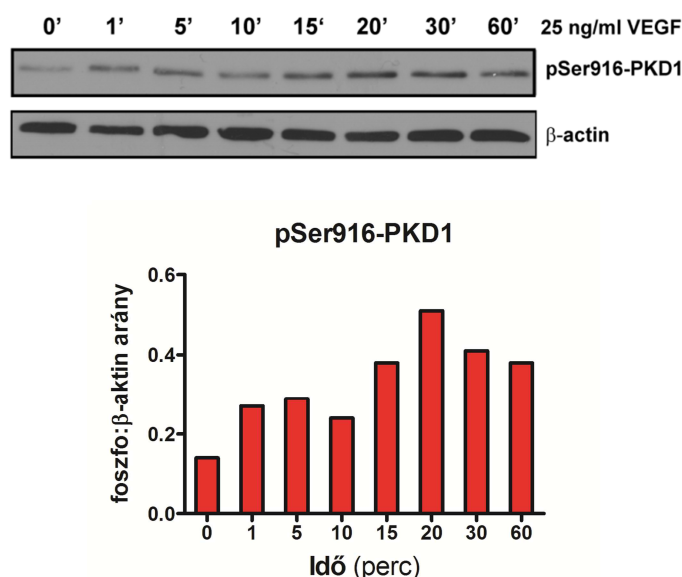
A következő kísérletekben megvizsgáltuk, hogy a VCC251801 képes-e gátolni érendotél sejtekben az endogén PKD1-et illetve VEGFR2-t, valamint az általuk szabályozott jelpályákat. Ehhez a vizsgálathoz kétféle aktivációs stimulánst választottunk, amelyekkel a VEGFR2 és PKD1 aktivitása együtt és külön-külön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

Először a PKD1 sejten belüli aktivitására fókuszáltunk. Ehhez a DAG analóg forbolészter **PMA**-t használtuk, ami minden DAG-ra érzékeny kinázt, köztük PKC izoformákat, és így rajtuk keresztül a PKD1-et is képes aktiválni. A PMA egy igen markáns, nem-specifikus kináz aktivációt hoz létre. Ahhoz, hogy meghatározzuk az optimális időtartományt az EA.hy926 sejtek PMA-val való kezeléséhez, több inkubációs időpontot választottunk, melyek a következők voltak: 0, 1, 5, 10, 20, 30, illetve 60 perc. A kísérlet során a PKD1 C-terminális autofoszforylációs helyének, a 916-os szerin oldallánc foszforylációját követtük, amelyet a szakirodalom igen gyakran használ az enzim aktivációs állapotának jellemzésére (20. ábra). A PMA kezelés 5 perc elteltével már igen erős foszforylációt okozott, ami 60 perc elteltével is megmaradt.



**20. ábra** PMA kezelés időfüggésének vizsgálata PKD1 aktivitására érendotél sejtekben. Az EA.hy926 sejteket 25 nM PMA-val kezeltük az ábrán megadott időintervallumokkal.

A PMA kezeléssel ellentétben, a **VEGF** által történő PKD1 aktiváció már egy specifikus, a VEGFR2 jelátviteli útvonalon megvalósuló aktivációs mechanizmus. Először ebben az esetben is egy időfüggés vizsgálatot végeztünk el, 0, 1, 5, 10, 15, 20, 30, illetve 60 perces inkubációs időket alkalmazva. Aktivációs markernek szintén a PKD1 916-os oldallánc foszforiláltsági állapotát vizsgáltuk (21. ábra). Látható, hogy a VEGF kezelés nem okoz olyan markáns foszforilációs szint emelkedést, mint a PMA. Ebben az esetben a 916-os szerin oldallánc foszforilációja enyhe emelkedést mutat az idő függvényében, amely 20 percnél éri el a csúcst, majd lassan kezd lecsengeni, azonban még 60 percnél is jelentős értéket mutat.



**21. ábra VEGF időfüggésének vizsgálata PKD1 aktivációjára érendotél sejtekben.** Az EA.hy926 sejteket 25 nM PMA-val kezeltük az ábrán megadott időintervallumokkal.

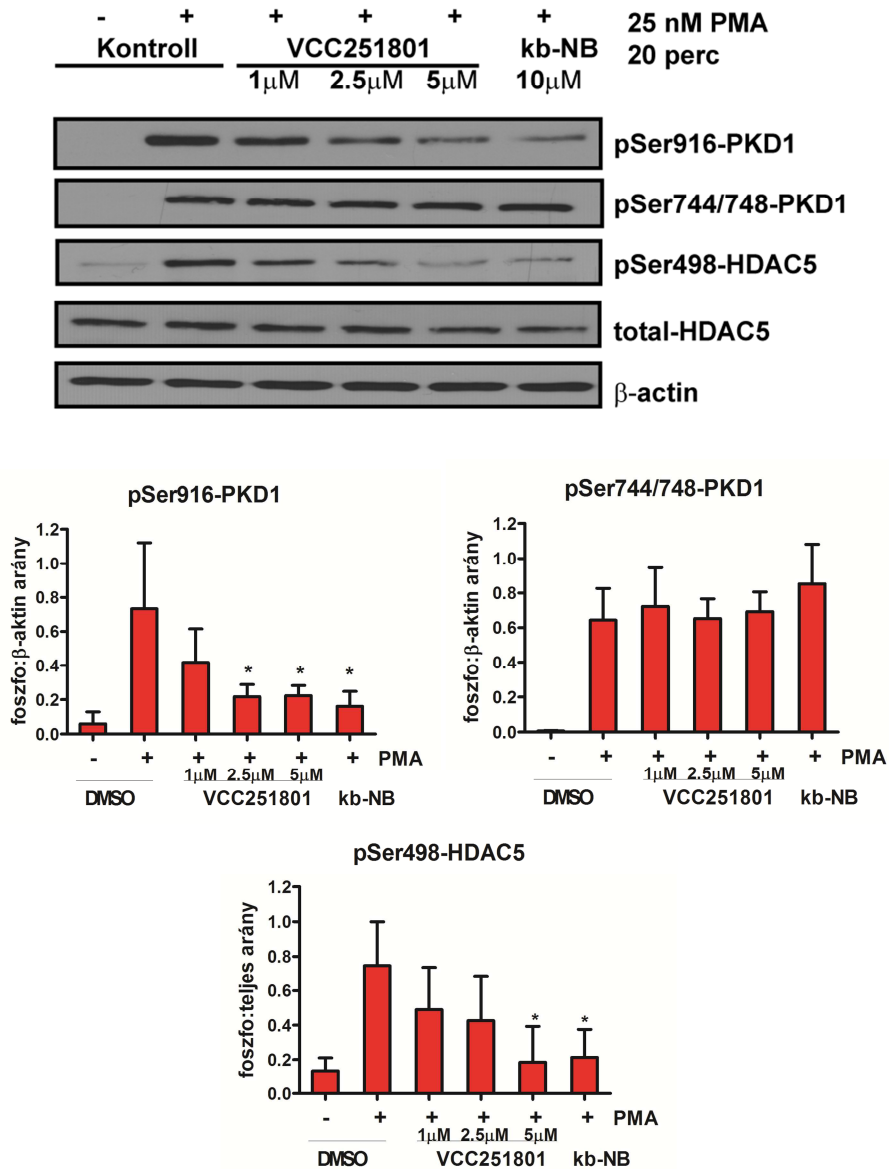
A fenti eredmények alapján optimális kezelési időnek a 20 percet választottuk mind a PMA, mind pedig a VEGF esetében.

#### ***A VCC251801 hatása a PMA indukált PKD1 aktivációra***

Ezekben a kísérletekben western blot módszerrel a PKD1 két foszforilációs helyét vizsgáltuk: a már imént említett 916-os pozícióban helyet foglaló szerin oldalláncot, illetve a PKD1 katalitikus doménjében, a 744-es és 748-as pozícióban elhelyezkedő szerin oldalláncokat, amelyeket a PKD1-et aktiváló PKC izoformák foszforilálnak.



Érendotél sejtek esetében is a HDAC5 a PKD1 endogén szubsztrátja, amit a 498-as szerint oldalláncon képes foszforilálni, és ennek vizsgálata további megerősítést ad az enzim aktivitásáról. A 22. ábra 2. oszlopában jól látható, hogy az alkalmazott 25 nM, 20 perces PMA kezelés egy markáns foszforilációs szint emelkedést okoz az összes vizsgált foszforilációs helyen, mind a PKD1, mind a HDAC5 esetében egyaránt, tehát elmondhatjuk, hogy a PKD1 aktiválódott a PMA kezelés hatására.

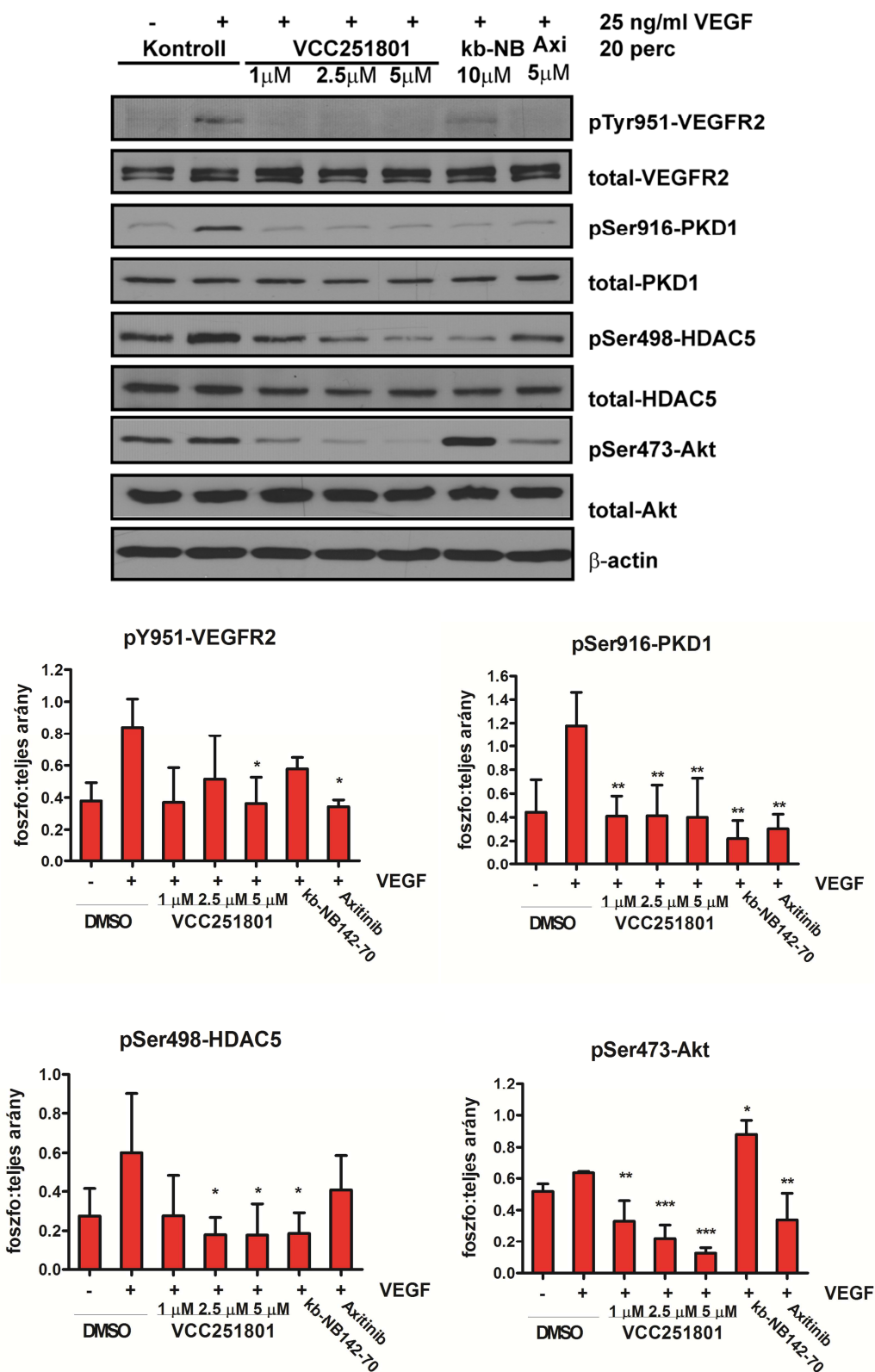


**22. ábra** A VCC251801 csökkentette a PMA indukált PKD1 aktivációt érendotél sejtekben. Az EA.hy926 sejteket 1 órán keresztül kezeltük az inhibitorokkal, majd 25 nM PMA-val 20 percig indukáltuk. Western blot-tal határoztuk meg a PKD1 aktivációs állapotát. Az állandó DMSO koncentráció 0,2% volt. A denzitometrálist ImageJ program segítségével végeztük el ( $n=3$ ), \*  $p < 0.05$ .

A PMA indukálást megelőzően, az érendotél sejteket emelkedő koncentrációtartományban – 1, 2,5, és 5  $\mu\text{M}$  - előkezeltük a VCC251801-gyel, valamint a már korábban is használt PKD referencia inhibitor kb-NB142-70-nel 1 órán keresztül. Jól látható, hogy a VCC251801 koncentrációfüggő módon csökkentette a PKD1 autofoszforilációs helyének illetve a HDAC5 498-as szerin oldalláncának a foszforilációját, tehát a PKD1 működése is csökkent. Az enzimaktivitás gátlásának mértéke a HDAC5 foszforiláltságából következően, 5  $\mu\text{M}$  esetében szignifikáns volt, 1  $\mu\text{M}$  illetve 2.5  $\mu\text{M}$  koncentrációval kezelve azonban nem. 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 PKC $\delta$  vagy PKC $\epsilon$ , érendotél sejtekben.

***A VCC251801 kezelés hatása a VEGFR2 jelpályára érendotél sejtekben***

Az EA.hy926 sejteket a VCC251801-gyel kezeltük különböző koncentrációban, valamint referencia vegyületként a PKD-inhibitor kb-NB142-70 mellett a VEGFR2 inhibitor Axitinibet is használtuk. A VEGF stimulációt megelőzően, a sejteket 1 órán keresztül előkezeltük az inhibitorokkal. A kísérletben a VEGFR2 jelátviteli útvonalban szerepet játszó enzimek aminosav oldalláncainak foszforiláltsági állapotát követtük nyomon, melyek a következők voltak: VEGFR2 951-es tirozin oldallánca, amely a PKD1 aktiváció szempontjából releváns, a PMA indukálás során is vizsgált PKD1 916-os szerin, illetve HDAC5 498-as szerin oldalláncok, valamint a VEGFR2 jelpályában fontos szerepet játszó Akt kináz 473-as szerin oldallancát (23. ábra). A VEGF-kezelés önmagában markáns foszforilációs szint növekedést okozott az összes vizsgált fehérje esetében. A VCC251801-gyel történő 1 órás előkezelés következtében minden vizsgált enzimeről - VEGFR2, PKD1, HDAC5 és Akt - elmondható, hogy a foszforiláció szintje koncentrációfüggő módon csökkent. Azonban a párhuzamos kísérletek alapján elkészített statisztikai analízist követően azt mondhatjuk el, hogy a hatás csak 5  $\mu$ M koncentráció mellett volt szignifikáns az összes vizsgált enzimen. A kb-NB142-70 kezelés esetében a VEGFR2 foszforiláció csökkent ugyan, de a kiértékeléseink szerint nem szignifikáns mértékben. Ugyanakkor, a PKD1 916-os szerin, illetve HDAC5 498-as szerin oldallancának foszforilációja szignifikáns mértékben csökkent. 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 [173]. 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.

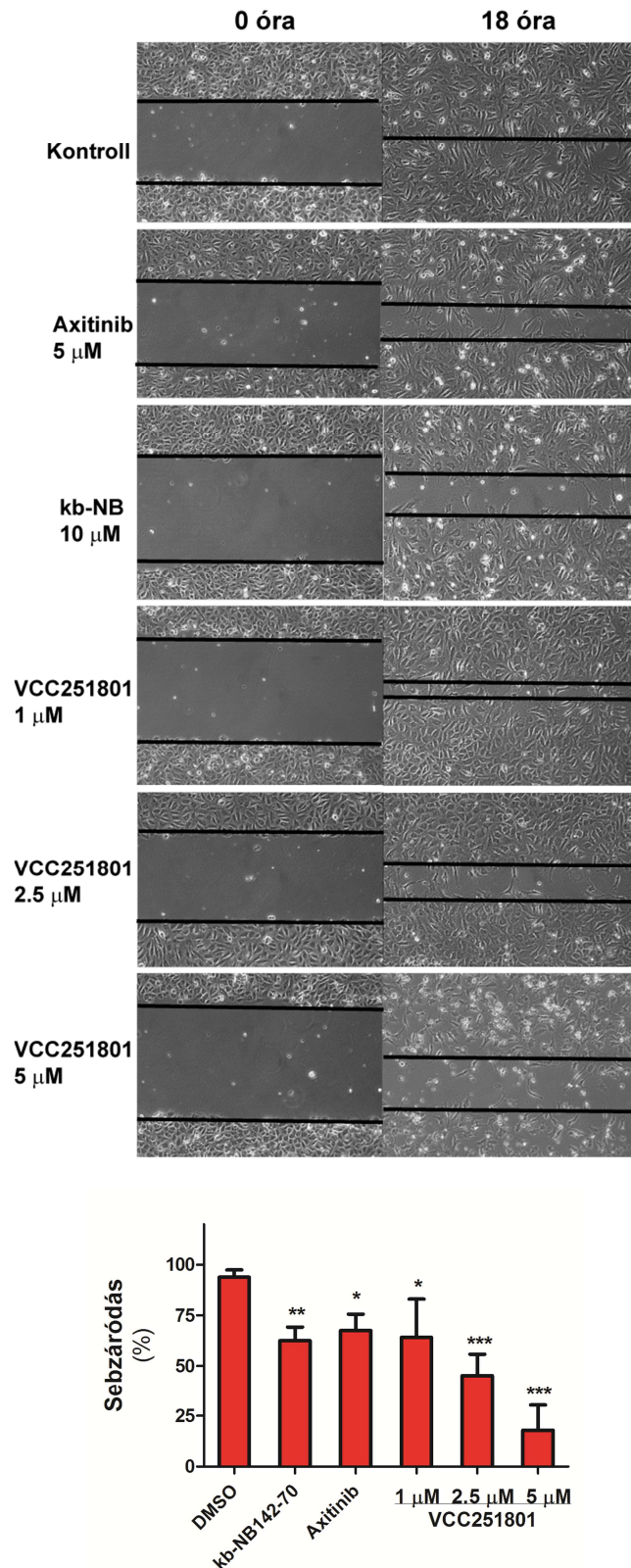


**23. ábra** A VCC251801 gátolta a VEGFR2 jelpálya aktivációját érendotél sejtekben. Az EA.hy926 sejteket 1 órán keresztül kezeltük az inhibitorokkal, majd 25 ng/ml VEGF-fel 20 percig indukáltuk. Western blot-tal határoztuk meg a VEGFR2 jelpálya különböző elemeinek foszforilációs/aktivációs állapotát. Az állandó DMSO koncentráció 0,2% volt. A denzitometrálist ImageJ program segítségével végeztük el (n=3). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Elmondható tehát, hogy a VCC251801 koncentrációfüggő módon képes volt gátolni a PMA indukált PKD1 aktivációt, valamint a VEGFR2 jelpályát EA.hy926 érendotél sejtekben.

### 5.3.3 Érendotél sejt migráció

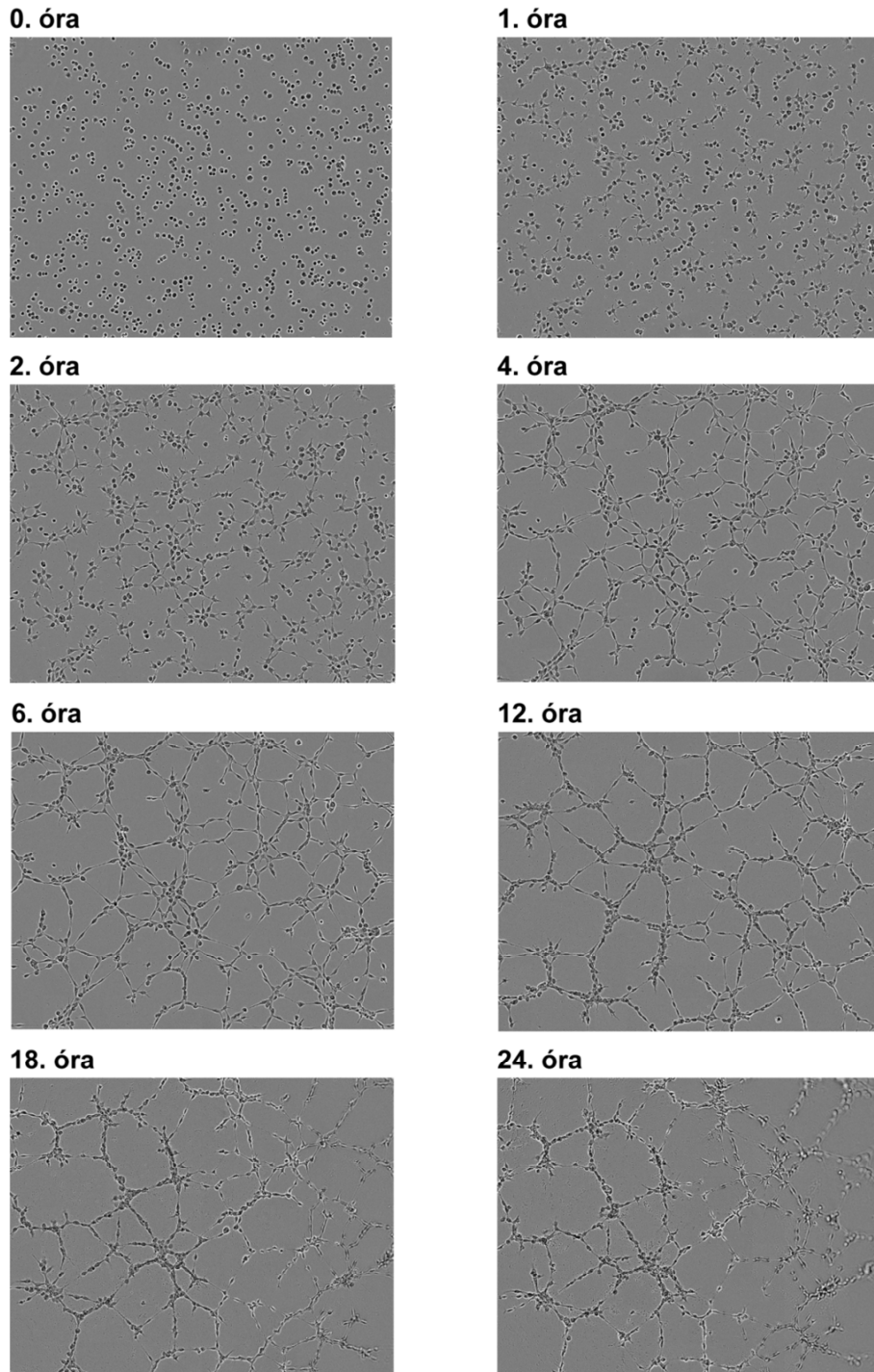
A következő kísérletekben már a VCC251801 endotélsejt funkcióra kifejtett hatásait vizsgáltuk. Először az érendotél sejtek migrációjára fókuszáltunk, amelyet a sejt migráció vizsgálatára széles körben használt ún. wound-healing vagy „sebgyógyulás” technika segítségével követtünk nyomon. A sejt migrációs kísérletekben az inhibitorokat a már korábban használt, azaz 1, 2,5 és 5  $\mu\text{M}$  koncentrációkban alkalmaztuk. A referenciavegyületek sikeresen csökkentették az érendotél sejt migrációt abban a koncentráció tartományban, amelyben a western blot-os kísérletek során is hatékonyan gátolták a VEGFR2 és PKD1 kinázokat, vagyis az Axitinib 5  $\mu\text{M}$  illetve a kbNB142-70 10  $\mu\text{M}$  koncentráció mellett. A VCC251801 esetében jól megfigyelhetően koncentrációfüggő a hatás (24. ábra). 1  $\mu\text{M}$  mellett 35%-kal csökkent a sejt migráció mértéke, ami a statisztikai analízisünk alapján már szignifikánsnak mondható. Ez a hatás 2,5  $\mu\text{M}$ -ban még erősebb volt: 55%. Az 5  $\mu\text{M}$  koncentrációval történő VCC251801 kezelés esetében a sejt migráció gátlása szintén markáns volt, viszont ekkor a sejtek kezdtek felúszni, ami valószínűleg sejtpusztulás miatt következhetett be.



**24. ábra** A VCC251801 csökkentette az érendotél sejtek migrációját. A sejt migrációs vizsgálatot wound healing módszerrel végeztük el. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet mikroszkópos fotói láthatóak. A kísérlet 0,2% DMSO koncentráció mellett zajlott. A fotók kiértékelését ImageJ program segítségével végeztük el. (n=4), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 5.3.4 *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 kapilláriszerű, hálózatos struktúrákat hoznak létre [174]. Ezt a módszert széles körben alkalmazzák az érképződés vizsgálatára *in vitro* körülmények között. A sejtek a kihelyezést követő első órákban nyúlványokat, lamellopódiumokat növesztenek, és elkezdnek vándorolni egymás felé. Ekkor kis csomópontok alakulnak ki, amelyek az endotélsejtek segítségével összekapcsolódnak. Ezek a kapcsolatok kezdetben csak egy, később több sejtből alakulnak ki, és 3-4 vagy több sejtből álló kapilláriszerű csövek jönnek létre. A folyamat végeredménye egy olyan hálózat, amelynek csomópontjait endotélsejtekből álló kapillárisok kötik össze. 24 óra elteltével azonban a sejtek apoptózison esnek keresztül és elpusztulnak. A folyamat különböző fázisait szemlélteti a 25. *ábra*.

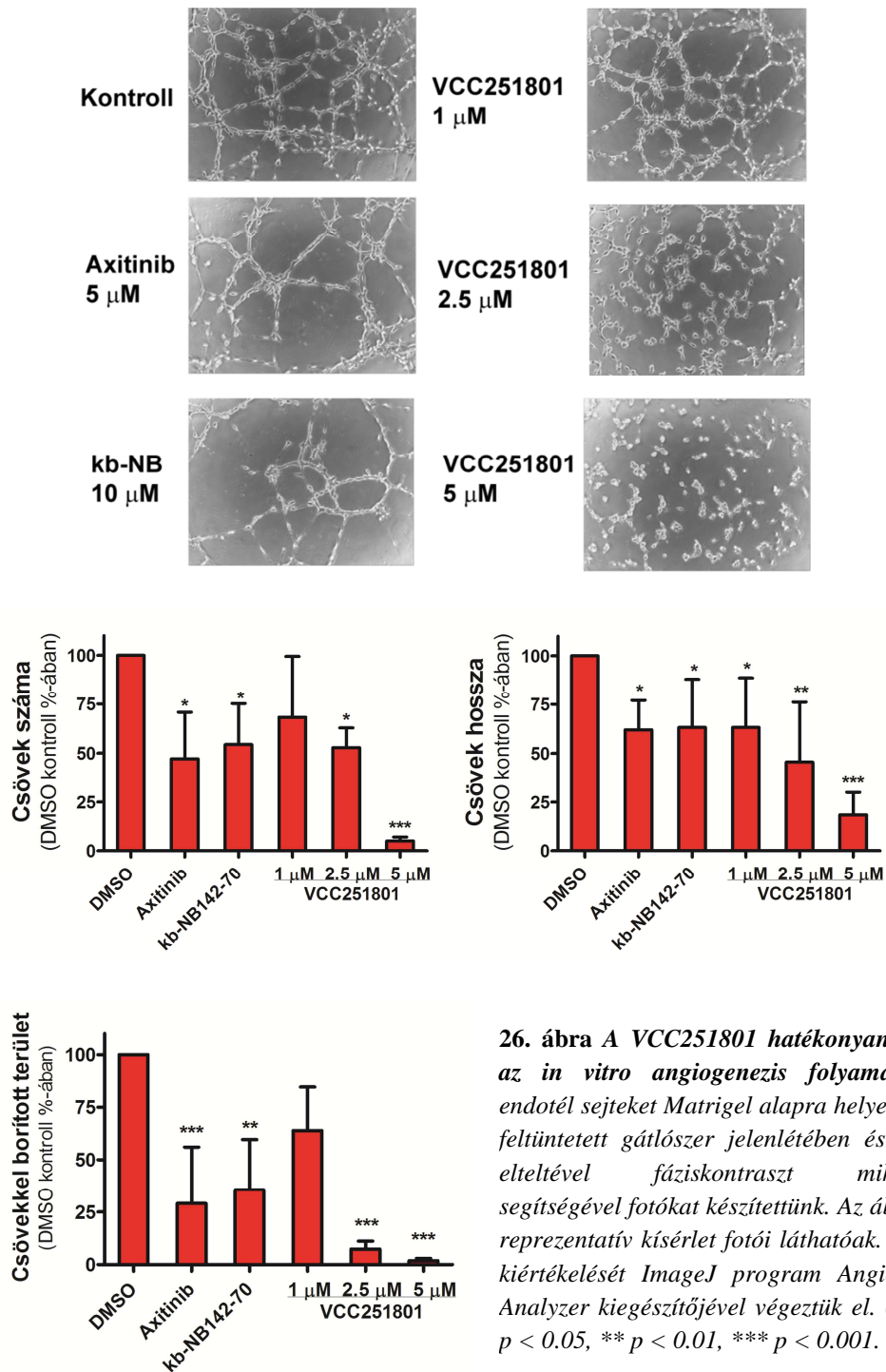


**25. ábra** Az *in vitro* angiogenezis különböző fázisai. A fotókat IncuCyte ZOOM<sup>®</sup> készülékkel készítettük.

Az inhibitorokkal történő kezeléshez a 18 óra inkubációs időt választottuk, ugyanis ekkor már szépen kialakulnak a több sejtből álló kapillárisok. Az inhibitorokat a sejtek kihelyezésével egy időben adtuk a rendszerhez. 18 óra elteltével, mikroszkóp



segítségével fotókat készítettünk az egyes kezelésekről, amelyeket az ImageJ program Angiogenesis Analyser kiegészítőjével értékeltünk ki. Itt a szakirodalomban is használt három paramétert határoztuk meg: a csövek száma, a csövek hosszának összegét és a csövek által borított terület nagysága. A 26. ábrán jól látható, hogy a VCC251801 koncentrációfüggő módon csökkentette a csövek számát, hosszát és az általuk borított terület nagyságát.



**26. ábra** A VCC251801 hatékonyan gátolta az *in vitro* angiogenesis folyamatát. Az endotél sejteket Matrigel alagra helyeztük ki a feltüntetett gátlószer jelenlétében és 18 óra elteltével fáziskontraszt mikroszkóp segítségével fotókat készítettünk. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet fotói láthatóak. A képek kiértékelését ImageJ program Angiogenesis Analyser kiegészítőjével végeztük el. ( $n=5$ ), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

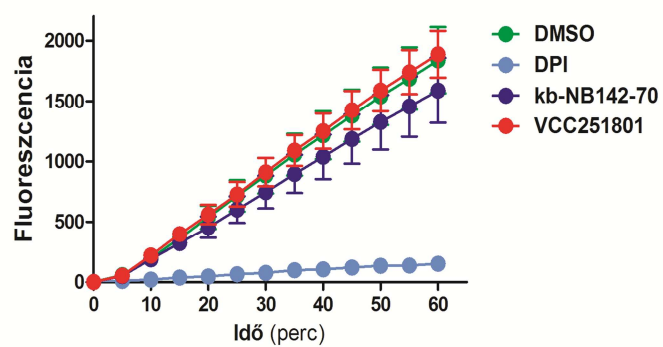
A hatás 1  $\mu\text{M}$  esetében kevésbé volt markáns, a statisztikai analízis alapján is csak a csövek hosszának összege csökkent szignifikáns mértékben, a csövek száma illetve a csövekkel borított terület nagysága nem. Azonban 2,5 és 5  $\mu\text{M}$  VCC251801 koncentráció mellett már mindhárom vizsgált paraméter szignifikáns mértékben lecsökkent. Ez a gátlás 5  $\mu\text{M}$  koncentráció esetében igen drasztikus volt, amiben valószínűleg közrejátszik a már az előző, sejt migrációt tárgyaló fejezetben említett potenciálisan bekövetkező sejtpusztulás. Az Axitinib és a kb-NB142-70 szintén szignifikánsan csökkentette mindhárom vizsgált paramétert.

Összességében elmondható, hogy a VCC251801 hatékonyan bizonyult az angiogenezis folyamatának csökkentésében *in vitro* körülmények között.

### 5.3.5 Érendotél sejtek szuperoxid termelése

A szakirodalomban bizonyított tény, hogy az érendotél sejtek által patológiásan termelt szuperoxid több betegség velejárója illetve kiváltó tényezője lehet [175]. Érendotél sejtekben a szuperoxid termelésért felelős dominánsan expresszálandó NADPH-oxidáz izoforma a NOX4 [176]. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a VCC251801-nek van-e hatása az érendotél sejtek szuperoxid termelésére, vagyis a PKD1-nek van-e szerepe ebben a folyamatban ugyanis erről még nincsen adat a szakirodalomban.

Ehhez a vizsgálathoz az Amplex<sup>®</sup> Red módszert használtuk, amellyel a sejtek által termelt, szuperoxidból átalakult hidrogén-peroxidot detektáltuk. A kísérletekhez az általános NADPH-oxidáz gátló DPI-t használtuk referencia inhibitornak [177]. A kísérlet során az érendotél sejteket 30 percig előinkubáltuk a gátlószerekkel, mindegyikkel egységesen 10  $\mu\text{M}$  koncentrációban, majd az Amplex Red reagens hozzáadásával mértük a termelt peroxid mennyiségét. A 27. ábrán jól látható, hogy a DPI jelentős mértékű, azaz közel 90%-os gátlást fejtett ki az érendotél sejtek szuperoxid termelésére, ami bizonyítja kísérleti rendszerünk megbízhatóságát. Azonban a sejtek VCC251801-gyel illetve kb-NB142-70 PKD gátlószerekkel történő kezelése sem okozott jelentős csökkenést a hidrogén-peroxid termelésben 1 óra elteltével.



**27. ábra** A VCC251801 nem volt hatással az érendotél sejtek szuperoxid termelésére. Az inhibitorokat 10  $\mu\text{M}$  koncentrációban alkalmaztuk, amelyekkel 30 percig előkezeltük a sejteket. A termelt szuperoxidból képződött hidrogén-peroxidot Amplex<sup>®</sup> Red módszer segítségével határoztuk meg. Az állandó DMSO koncentráció 0,2% volt ( $n=3$ ).

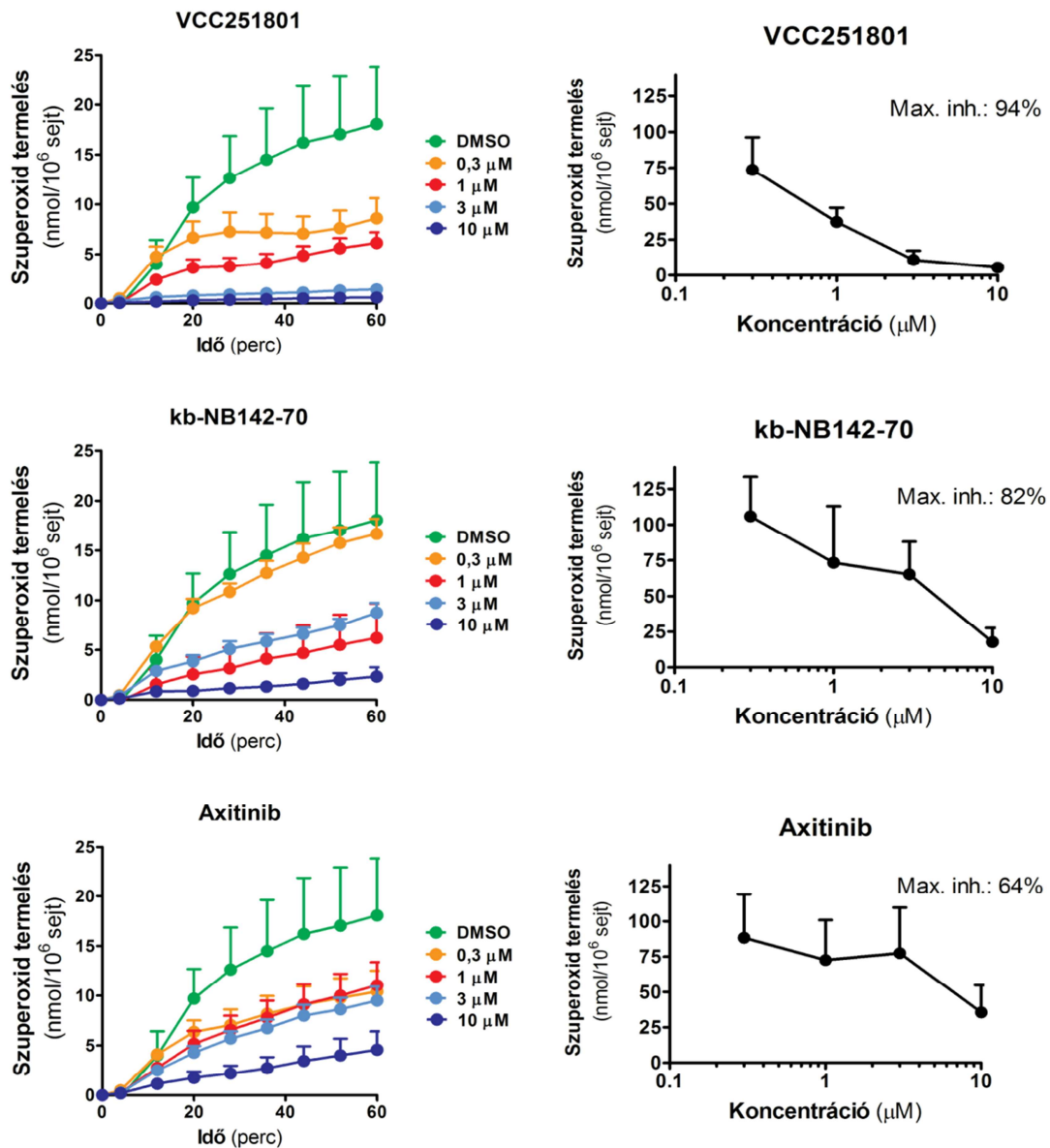
## 5.4 Gyulladásos sejtmodellen végzett vizsgálatok

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 patológias folyamatnak is fontos résztvevői.

### 5.4.1 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. A kísérletekhez a VCC251801-en kívül a korábbi kísérletekhez is használt referencia inhibitorokat használtuk, vagyis a kbNB142-70-et és az Axitinibet.

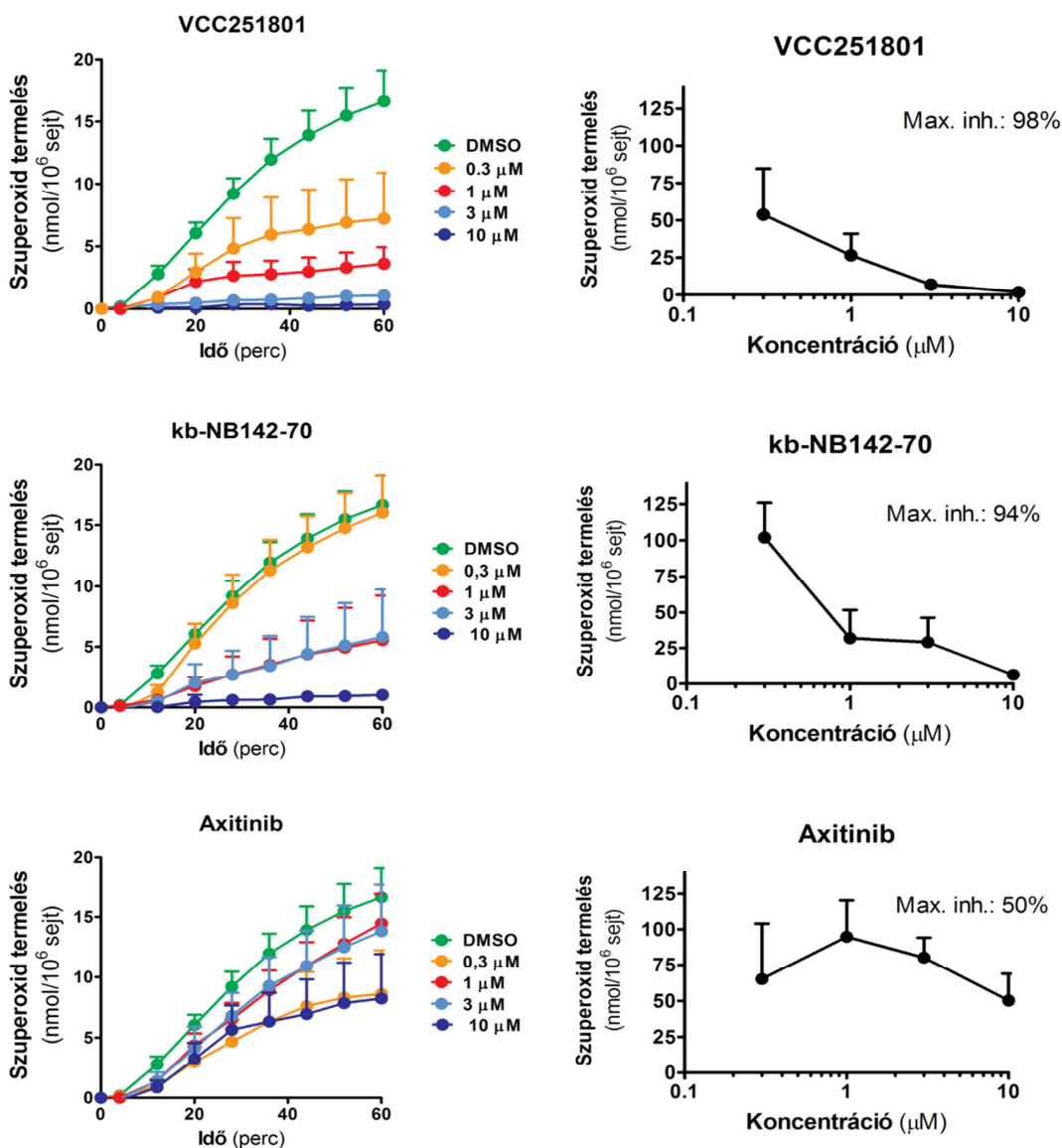
Először az Fc $\gamma$ -receptoron keresztül történő **immunkomplex** mediált autoimmun gyulladás folyamatát modelleztük [178]. Ehhez az aktivációhoz HSA és anti-HSA által képzett immobilizált immunkomplexeket használtunk. A neutrofileket 30 percig előinkubáltuk az inhibitorokkal 0,3, 1, 3 és 10  $\mu$ M koncentrációban, majd a szuperoxid termelést 1 órán keresztül monitoroztuk (28. ábra). A VCC251801 az összes koncentrációban képes volt csökkenteni a neutrofilek szuperoxid termelését, ami 0,3 és 1  $\mu$ M esetében nagyjából 50% volt, viszont a 3 illetve 10  $\mu$ M dózis közel 100%-os gátlást idézett elő. A PKD-inhibitor kb-NB142-70 gyengébb mértékben, de szintén szignifikánsan csökkentette a szuperoxid termelést. A legalacsonyabb 0,3  $\mu$ M dózis nem okozott változást, az 1 illetve 3  $\mu$ M mérsékelt csökkenést idézett elő, a 10  $\mu$ M azonban igen erős, közel teljes sejtválasz csökkenést produkált. Az Axitinib esetében volt a legkisebb a szuperoxid termelésre gyakorolt hatás: a 0,3, 1 és 3  $\mu$ M koncentrációval történt kezelések esetében a neutrofil sejtválasz gátlása részleges, nagyjából 30% volt, azonban még a legnagyobb, azaz 10  $\mu$ M-os dózis sem okozott teljes gátlást.



**28. ábra** A VCC251801 sikeresen csökkentette a neutrofilek immunkomplex által indukált szuperoxid termelését. A neutrofileket 30 percig előinkubáltuk az inhibitorokkal, majd az aktivációt követően mértük a szuperoxid termelést ferricitokróm-c módszerrel ( $n=3$ ). Az állandó DMSO koncentráció 0,1% volt.

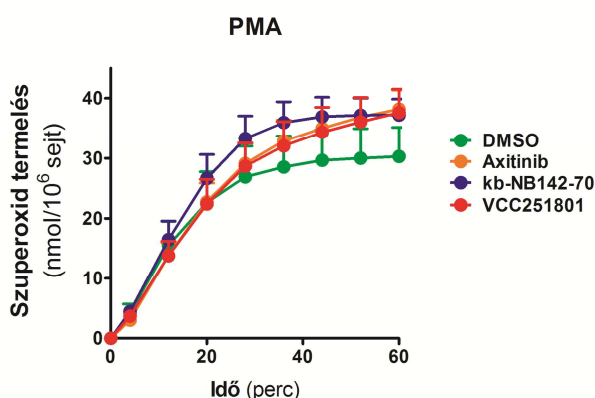
A következő kísérleti körülmény a **fibrinogén** aljzathoz, mint integrin ligandhoz kitapadó neutrofil granulociták **TNF $\alpha$** -val történő stimulálása volt. Ez a módszer a gyulladásos környezetben történő neutrofil aktivációt modellezi [179]. Az inhibitorokat ismét a fent említett koncentrációban alkalmaztuk (29. ábra). A VCC251801 ebben az esetben is 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 teljes volt. A kbNB-142-70-nel történő kezelés során 0,3  $\mu\text{M}$  esetében nem történt változás, azonban 1 és 3  $\mu\text{M}$  koncentráció mellett a gátlás már jelentős, nagyjából 70%, míg 10  $\mu\text{M}$  esetében a hatást közel 100% volt. Az Axitinib ezt az aktiváció típusát még kevésbé gátolta, ugyanis 50%-nál nagyobb csökkenést a szuperoxid termelésben még 10  $\mu\text{M}$  koncentráció mellett sem okozott.



29. ábra A VCC251801 hatékonyan csökkentette a neutrofil granulociták adhéziófüggő, TNF- $\alpha$  indukált szuperoxid termelését. Az inhibitorokkal való 30 perces előinkubációt követően a fibrinogénhez kitapadt, TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) által aktivált neutrofilek szuperoxid termelést mértük ferricitokróm-c módszerrel ( $n=3$ ). Az állandó DMSO koncentráció 0,1% volt.

A harmadik szuperoxid termelést indukáló módszerünk a **PMA** aktiváció volt. Ahogyan azt már az endotél sejt kísérletek során említettem, a PMA és más forbol-észterek minden DAG-ra érzékeny kinázt, főleg PKC izoformákat aktiválnak, aminek eredménye egy igen markáns, kináz aktiváció a különböző sejt felszíni receptorok aktivációja nélkül [180]. Ebben a kísérletben a három inhibitorot egységesen 10  $\mu$ M koncentrációban vizsgáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy egyik gátlószer sem volt hatással a PMA indukált szuperoxid termelésre (30. ábra).

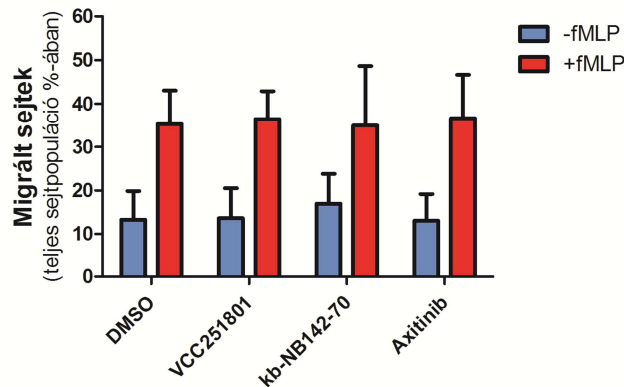


**30. ábra** A VCC251801 nem gátolta a neutrofilek PMA indukált szuperoxid termelését. A neutrofileket 30 percig előinkubáltuk az inhibitorokkal, majd az aktivációt követően mértük a szuperoxid termelést ferricitokró-m-c ( $n=3$ ). Az állandó DMSO koncentráció 0,1% volt.

#### 5.4.2 Neutrofil granulociták transzmigrációja

A következő sejt funkció amit neutrofil granulocitákon vizsgáltunk, a mesterséges membránon keresztül történő sejt vándorlás. Ez a módszer a neutrofilek granulociták véráramból az érfalon keresztül történő kilépését tehát az extravazáció folyamatát modellezi *in vitro* körülmények között. A neutrofilek érpályából való kilépése a gyulladás területén felszabaduló kemoattraktánsok hatására valósul meg. Ekkor a neutrofilek és az érendotél sejtek felszínén kifejeződő sejt kapcsoló fehérjék expressziója is megváltozik, aminek hatására a neutrofilek ki tudnak tapadni az érendotél sejtek felszínéhez, majd megtörténik az érpályából való kilépés egy többlépéses folyamat során. A kísérletünkben kemoattraktánsként 100 nM fMLP-t használtunk, ami például bakteriális fertőzések során szabadul fel. A transzmigrációs lemez inzertjeinek

membránjait mindkét oldalon fibrinogénnel fedtük, ami  $\beta_2$ -integrin ligand, így ennek köszönhetően a sejtek ki tudnak tapadni a membrán felületéhez. (31. ábra). Az inhibitorral nem kezelt sejtek esetében az fMLP szignifikánsan megnövelte a neutrofil granulociták transzmigrációját, az fMLP-t nem tartalmazó mintához képest. Azonban az inhibitorok egyike sem okozott változást az fMLP által stimulált neutrofil transzmigrációban.



**31. ábra** A VCC251801 nem gátolta neutrofil granulociták transzmigrációját. A gátlószerekkel előkezelt neutrofileket fibrinogénnel fedett polikarbonát membránon keresztül 60 percig hagytuk vándorolni 100 nM fMLP kemoattraktáns irányába. A kísérletek során használt állandó DMSO koncentráció 0,2% volt ( $n=3$ ).



## 6. Megbeszélés

A PhD munkám fő témáját képező protein kináz D1 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 a génexpresszió szabályozásában, az oxidatív stressz kivédésére aktiválódó sejt túlélési folyamatokban, a sejt migráció szabályozásában, illetve a Golgi-rendszerben elősegíti a vezikulák lefűződését és transzportját. A normál fiziológiai funkció mellett a PKD1 szerepét leírták több patológiai mechanizmusban is [30]. Részt vesz a patológiai angiogenezis folyamatában, mint az angiogenezisben domináns szerepet betöltő VEGFR2 jelpálya egyik kulcsszereplője [26]. Ismert még a PKD1 funkciója gyulladással kapcsolatos folyamatokban, illetve az ezekhez kapcsolódó sejt típusokban, mint például neutrofil granulocitákban, hízósejtekben, makrofágokban, vagy B-limfocitákban.

Egyre több kísérleti adat támasztja alá, hogy a PKD1 bizonyos betegségekben egy potenciális gyógyszercélpont lehet. Azonban a klinikumban, illetve klinikai fázis vizsgálatokban jelenleg nincsen PKD1 inhibitor, valamint a kísérleti célra felhasználható, kereskedelmi forgalomban kapható PKD1 inhibitorok száma is igen csekély. Ebből kifolyólag azt tűztük ki a PhD munkám céljául, hogy a Vichem Kft-vel együttműködve azonosítsunk új PKD1 inhibitorokat, és ezeket tovább karakterizáljuk olyan patológiai sejtmodelleken, amelyek esetében a PKD1 egy potenciális gyógyszercélpont lehet.

A PhD munkám első lépéseként leteszteltük rekombináns PKD1 kinázra a nagyhatékonyságú molekulaszűrésre alkalmas IMAP<sup>®</sup>-módszerrel a Vichem Kft. tulajdonában levő kináz specifikus vegyülettár EVL (Extended Validation Library) részét. Az EVL ismert szerkezetű kináz inhibitorokat, és azok különböző analóg vegyületeit tartalmazza, ami nagyjából 2000 vegyületet jelent. Az előszűrés során kiválogattuk azokat a vegyületeket, amelyek 75 % felett gátolták a PKD1 aktivációját, ez 72 db vegyület volt. Ez nagyjából 4%-os ún. találati-rátának felel meg, ami egy jó értéknek számít. A találati-ráta azt az arányt fejezi ki, hogy egy vegyülettár szűrése során a letesztelt vegyületek közül mennyi gátolta a célfehérjét. Ez az érték általában 1-

2% szokott lenni más molekulakönyvtárak esetében, azonban a mi esetünkben annak köszönhető a magasabb érték, hogy a letesztelt vegyülettár kinázokra optimalizált. A rekombináns kináz vizsgálatok során a vegyületek szerkezetét illetően azt figyeltük meg, hogy a PKD1 gátló molekulák többsége ugyanolyan pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-on alapvázal rendelkezik. Ilyen alapszerkezettel rendelkező vegyületeket Barvian és munkatársai már korábban publikálták, mint CDK2/4 gátlószereket [181]. Ezek után a szerkezet és hatás összefüggésének vizsgálata során azt állapítottuk meg, hogy a PKD1 gátló hatás szempontjából kritikus egy bázikus tercier (vagy szekunder) amin csoport jelenléte a pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-on alapváz 2-es pozíciójában. Továbbá az is fontos, hogy a molekula az alapváz 6-os pozíciójában ne tartalmazzon funkciós csoportot. Ehhez a vizsgálathoz olyan, szintén pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-on alapszerkezettel rendelkező vegyületeket is kiválasztottunk, amelyek nem gátolták a PKD1-et a rekombináns kináz tesztelésben, és ezek a 6-os pozícióban aril vagy tienil csoportot hordoztak. Érdekes volt megfigyelni azt is, hogy két olyan vegyület, amelyek közül az egyik a 2-es és 6-os pozícióban egyaránt, míg a másik egyik pozícióban sem hordozta a fent említett releváns funkciós csoportokat, csökkent PKD1 gátló hatással rendelkeztek.

Az általunk leghatékonyabbnak ítélt 5 darab pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-on alapszerkezetű PKD1 gátló vegyületnek megvizsgáltattuk a szelektivitási profilját különböző kinázokkal szemben, amellyel egy külső céget, a SignalChem Ltd-t bíztuk meg. Ehhez a vizsgálathoz olyan kinázokat válogattunk ki, amelyek a PKD1-hez funkció (PKC-izofomák) vagy szerkezet (CAMK) szempontjából hasonlóak. A szelektivitási vizsgálat eredménye alapján kiválasztottuk az 5 vegyületből a legszelektívebbet, ami a VCC251801 volt. Ez a molekula nem gátolta szignifikáns módon a fent említett kinázokat. Ez az eredmény azért is fontos, mert a forgalomban levő PKD1 inhibitorok közül a Gö6976 például hatékony gátlószere különböző, PKD1-et is aktiváló és egyéb PKC izofomáknak [182]. A kb-NB142-70-ről és a CRT0066101-ről nem áll rendelkezésünkre szelektivitási adat, a CID755673 esetében pedig a szelektivitási adatok nem összemérhetőek a PKD1 gátló hatással, ugyanis azok 10 µM inhibitor koncentráció mellett készültek, azonban a CID755673 sejtekben 50 µM dózisban gátolja a PKD1 működését. Elmondhatjuk tehát, hogy a VCC251801 szelektívnek bizonyult a letesztelt PKC izofomákkal szemben, így kísérleti célra való felhasználása esetében azok gátlása kizárható. Fontos tény még a szelektivitási vizsgálatot illetően az,

hogy a VCC251801 a másik PKD izoformát, a PKD2-t gátolta ugyan, azonban ez a hatás mérsékeltnak mondható, ugyanis 5  $\mu\text{M}$  VCC251801 koncentráció mellett az inhibíció mindössze 67% volt, ami rekombináns kináz vizsgálatban nem tekinthető hatékony gátlásnak. Ez az eredmény fontos lehet egy PKD izoforma specifikus inhibitor kifejlesztésének szempontjából. Azonban meg kell jegyezni, hogy ez az eredmény egy olyan mérésből származik, amelyet egy külső céggel (SignalChem) végeztünk egy megbízás keretén belül, tehát egyelőre óvatosan kell kezelni. Ahhoz, hogy a feltételezésünket be tudjuk igazolni, további részletes kísérletek szükségesek. A kereskedelemben elérhető, illetve eddig publikált inhibitorok nem PKD izoforma specifikusak, ugyanis mindhárom izoformát körülbelül egyforma mértékben gátolják [66, 140, 142]. A három PKD izoforma nagyfokú hasonlósága miatt véleményünk szerint egy PKD izoforma specifikus gátlószer kifejlesztése egy igazán komoly kihívásnak ígérkezik.

A VCC251801 további, *in vitro* kináz vizsgálatban történő karakterizálása során azt figyeltük meg, hogy a VCC251801 és a referencia inhibitoroként használt kb-NB142-70 szinte azonos mértékben gátolta a PKD1-et ( $\text{IC}_{50}$  értékek: VCC251801 – 28 nM, kb-NB142-70 – 26 nM). Az általunk mért  $\text{IC}_{50}$  érték a kb-NB142-70 esetében szinte teljesen megegyezik a szakirodalomban közölt, LaValle és munkatársai által mért értékkel [142]. Továbbá, szintén *in vitro* kináz vizsgálatokból, fény derült arra, hogy a VCC251801 egy másik fontos célpontja a VEGFR2 receptor tirozin kináz. Ahhoz, hogy a témát alaposabban körüljárjuk, a ProQinase céget bíztuk meg azzal, hogy a VEGFR család másik két izoformájára, a VEGFR1-re és VEGFR3-ra is leteszteljék a vegyületünket. A mérés eredménye alapján a VCC251801 mindhárom VEGFR izoformát gátolta, ami talán nem meglepő, hiszen a klinikai felhasználásban lévő VEGFR inhibitorok sem izoforma specifikusak [92, 157, 183]. A VCC251801 dózisfüggését vizsgáló kísérleteink alapján azt állapítottuk meg, hogy a gátlószerünk a klinikai használatban vese tumor kezelésére használt Axitinibbel összemérhető módon gátolta a rekombináns VEGFR2 enzimet ( $\text{IC}_{50}$  értékek: VCC251801 – 69 nM, Axitinib – 20 nM). Itt meg kell jegyezni azt, hogy az Axitinib is mindhárom VEGFR izoformának gátlószere [183]. Az Axitinibre vonatkozóan a Hu-Lowe és munkatársai alacsonyabb  $\text{IC}_{50}$  értéket (0,2 nM) mértek rekombináns kináz vizsgálatban, mint az általunk mért érték [183]. Véleményünk szerint ez a különbség a mérési módszerek

eltérésének köszönhető, azonban az Axitinib VEGFR2 gátló hatása így sem vonható kétségbe a mi rendszerünkben. Továbbá fontos még megemlíteni, hogy a két referencia inhibitor nem gátolta a másik célkinázt, vagyis az Axitinib nem volt hatással a PKD1-re, és a kb-NB142-70 pedig nem gátolta a VEGFR2 működését. Elmondhatjuk tehát, hogy az *in vitro* kináz vizsgálatok eredményei alapján a rendelkezésünkre állt egy olyan inhibitor, amely igen hatékony mértékben volt képes gátolni egyidejűleg a PKD1 és VEGFR2 kinázokat. Ahogyan arra az elmúlt években fény derült a klinikumban használt kináz inhibitorok is több célponton keresztül fejtik ki hatásukat, vagyis a célfehérje gátlásán kívül, ún. „off target” hatással is rendelkeznek [137]. Továbbá főleg tumoros megbetegedések esetében végzett számos kutatási adat bizonyítja, hogy a rendellenes sejtműködésért nem csupán egy hibásan működő fehérje tehető felelőssé [135, 136]. Ennek megfelelően a mai elfogadott és alkalmazott elv az, hogy a gyógyszerfejlesztés során több, a megbetegedés szempontjából releváns célpontra is fókuszálnak, és több célpontot egyidejűleg gátló vegyületeket hoznak létre. Ennek a koncepciónak további előnye lehet az, hogy a kináz inhibitorok ellen kialakuló rezisztencia kialakulásának esélye is csökkenhet, ugyanis a vegyület olyan kinázok működését is gátolja, amelyek egy esetleges rezisztencia kialakulásakor aktiválódó útvonal vagy útvonalak részesei. Továbbá nem mellékes szempont az, hogy egy darab, több célponton ható gátlószer kifejlesztési költsége alacsonyabb, mint több darab, egy célpontra fókuszáló vegyületé. A VCC251801 esetében mi is ezt az elvet követtük a PKD1 és VEGFR2 kapcsán, és ez alapján választottuk meg a kísérleti sejtes modelljeinket. A VEGFR2 gátlása már egy bevett stratégia az angiogenezis elleni terápiában, tehát a jelenlegi munkában is egy fontos célpontja volt az inhibitorunknak. Annak ellenére, hogy a PKD1 egy potenciális gyógyszer-célpont lehet, PKD1 inhibitor jelenleg még nincsen klinikai fázisvizsgálatban. Ahogyan a szakirodalmi bevezetőben is láthattuk, érendotél sejtekben a PKD1 az angiogenezisben esszenciális VEGFR2 jelátviteli útvonal egyik effektoraként funkcionál, továbbá gyulladós folyamatokban résztvevő sejtek fontos regulátora is, szabályozza például neutrofil granulociták szuperoxid termelését, valamint hízósejtek degranulációját [26, 119, 122]. A két folyamat, vagyis az angiogenezis és a gyulladás, több patomechanizmusban is együtt van jelen, és kapcsolatban áll egymással, például emlő és vastagbél tumorok, reumatoid artritisz, Crohn-betegség, érlemeszesedés esetében, így a két folyamat regulátorainak a

gátlása egy hatékony terápiás stratégia lehet a jövőben [74]. A fent leírtakból és a lehetőségeinkből kiindulva, az angiogenezissel és gyulladással kapcsolatos sejtmodelleknek választottunk a VCC251801 további karakterizálásához.

Az érendotél sejtes modellünk az immortalizált EA.hy926 sejtvonal volt, amely a primer endotél HUVEC és a tüdő adenokarcinóma A549 fuzionálásával hoztak létre, és amit elterjedt körben használnak endotél sejtes kísérletekhez [172].

Első lépésként a gyógyszerkutatás szempontjából fontos ADME-Tox paramétereket határoztunk meg. Az ADME-Tox vizsgálatok közé a vizsgált hatóanyag felszívódásával, szervezeten belüli eloszlásával, metabolizmusával, szervezetből való kiürülésével, és esetleges citotoxikus hatásával kapcsolatos kísérletek tartoznak. A VCC251801 esetében két paramétert vizsgáltunk: a citotoxicitást és a membránon passzív transzporttal történő átjutást.

A citotoxicitás vizsgálatot az angiogenezis modellnek választott EA.hy926 sejteken végeztük el. A VCC251801 csak a nagyobb dózisok esetében csökkentette jelentősen az érendotél sejtek életképességét csakúgy, mint a referencia inhibitorok, és ahogyan ez általánosan megfigyelhető a kináz inhibitorok esetében. Azonban a sejtpusztulás mértéke még a legnagyobb alkalmazott dózis (50  $\mu\text{M}$ ) mellett sem volt teljes. A laborunkban korábbi kísérletek alapján azokat a vegyületeket nyilvánítottuk citotoxikusnak, amelyek drasztikus sejtpusztulást idéztek elő 24 órán belül. Ezek a vegyületek rendszerint 5  $\mu\text{M}$  alatti  $\text{IC}_{50}$  értékkel rendelkeztek a citotoxicitás vizsgálatra használt MTT módszerben. Ezen eredmények figyelembe vételével választottuk meg a további kísérletekben használatos koncentráció tartományokat, annak érdekében, hogy elkerüljük a nem kívánt sejtpusztulást. A második ADME-Tox vizsgálat a VCC251801 sejtmembránon keresztül történő penetrációjára irányult. Ehhez a kísérlethez PAMPA módszert használtunk, amely a gyógyszerjelölt molekulák egy mesterséges, foszfolipid réteggel bevont membránon keresztül történő passzív transzportjának vizsgálatára alkalmas. Az eredmények alapján a VCC251801 a PAMPA vizsgálatban egy jól penetráló vegyületnek bizonyult, ugyanis az  $5,5 \times 10^{-6}$  cm/s penetrancia értékével meghaladta a gyártó által megadott  $1,5 \times 10^{-6}$  cm/s határértéket, ami felett egy vegyületet jól penetrálónak tekintünk [171]. Az eredményekből arra következtettünk, hogy a VCC251801 passzív transzporttal képes átjutni a sejtmembránon.

A következő kísérleteket az angiogenezis modellként használt EA.hy926 érendotél sejtvonalon végeztük el. Először megvizsgáltuk az inhibitorok sejtproliferációra gyakorolt hatását, ahol azt figyeltük meg, hogy a VCC251801 már 5  $\mu\text{M}$  koncentrációban szignifikánsan csökkentette az érendotél sejtek proliferációját 24 illetve 48 óra elteltével, ami még a citotoxikus érték alatt marad. Ez az eredmény teljes mértékben összemérhető a két referencia inhibitor által mutatott értékekkel, amelyek közül az egyik a már klinikai használatban levő Axitinib [158].

Miután láttuk, hogy *in vitro* kináz tesztekben a VCC251801 a PKD1 és VEGFR2 hatékony gátlószerének bizonyult, megvizsgáltuk a gátló hatást erre a két enzimre, és a velük kapcsolatos jelátviteli útvonalakra fókuszálva. Kétféle aktivációs mechanizmust választottunk. Az első esetében egy fiziológiásnak nem tekinthető, általános PKC aktivációt idéztünk elő a forbol-észter PMA segítségével. A másik módszerrel pedig specifikusan az angiogenezis folyamatában esszenciális szerepet játszó VEGFR2 jelpályára fókuszáltunk, amit sejtek VEGF-A-val történő kezelésével aktiváltunk. A PMA indukálta PKD1 aktivációt a VCC251801 hatékonyan, koncentrációfüggő módon csökkentette, amit a PKD1 autofoszforilációs helyének – 916-os szerin oldallánc, illetve a PKD1 endogén szubsztrátjának, a HDAC5-nek a foszforilációjának monitorozásával követtünk nyomon. A VCC251801 még alacsonyabb koncentrációban volt képes gátolni a PMA által indukált PKD1 aktivációt, mint a PKD1 referencia vegyület kb-NB142-70, ugyanis a VCC251801 már 5  $\mu\text{M}$ -ban szignifikáns mértékben csökkentette a PKD1 aktivitását, míg a kb-NB142-70 10  $\mu\text{M}$  dózis estében érte el ugyanezt a hatást. (Korábbi kísérletekben már vizsgáltuk a kb-NB142-70 PKD1 gátló hatását 5  $\mu\text{M}$  dózis mellett, azonban ez hatástalan volt.) További fontos megfigyelés volt, hogy a PKD1 transzfoszforilációs helyének foszforiláltsági állapota nem változott a gátlószer kezelés hatására, ami arra enged következtetni, hogy a VCC251801 nem gátolta a PKD1-t aktiváló PKC izoformákat. Ez a megfigyelés tovább erősíti a szelektivitás vizsgálat eredményét is, miszerint a VCC251801 nem gátolta a PKC $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  enzimek működését. A következő aktivációs mechanizmus a VEGF-A volt, amely a VEGFR1 és VEGFR2 receptor tirozin kinázok liganduma. Közülük a VEGFR2- t és az általa aktivált jelpályát tartják kulcsfontosságúnak az angiogenezis folyamatában, ezért mi is erre a jelpályára fókuszáltunk [93, 152]. A VCC251801 5  $\mu\text{M}$  dózisban szignifikáns csökkenést ért el a VEGFR2 jelpálya különböző vizsgált komponenseinek az aktivációs

állapotában, vagyis a VEGFR2, PKD1, HDAC5 és Akt kinázok esetében. A kb-NB142-70 esetében érdekes volt azt megfigyelni, hogy az Akt foszforilációja felerősödött. Ez a jelenség annak köszönhető, hogy a PKD1 és Akt között egy negatív visszacsatolás áll fenn, amit Ni és munkatársai írtak le [173]. További érdekessége a dolognak, hogy ezt a jelenséget G-fehérjékhez kapcsolt receptorok esetében írták le, azonban eredményeink szerint ez a negatív szabályozás receptor tirozin kinázok esetében is működik. Egy másik érdekes eredmény volt, hogy a HDAC5 foszforilációját csak a VCC251801 és kb-NB142-70 kezelés csökkentette szignifikáns mértékben, míg az Axitinib nem. Véleményünk szerint ez annak köszönhető, hogy a PKD1 a jelpályában, „downstream” pozícióban helyezkedik el, és mint effektor játszik szerepet. Így tehát a PKD1 felé a VEGFR2 jelpályán kívül további jelutaktól is érkehetnek aktiváló jelek, vagyis ez esetben a PKD1 effektor funkciója – a HDAC5 inaktiváció – a PKD1 közvetlen gátlásával szüntethető csak meg. Tehát az angiogenezis esetében a PKD1 kizárólagos blokkolása az Akt kináz működésének felerősödése miatt nem szerencsés, ehhez kell jelen esetben a VEGFR2 gátlása. Viszont a VEGFR2 gátlása önmagában nem képes szignifikáns mértékben blokkolni a HDAC5 inaktiváló foszforilációját, és így feltételezhetően az angiogenezisben fontos gének transzkripcióját sem, ehhez már kell a PKD1 gátlása is. A jelenlegi esetben tehát ahhoz, hogy megszüntessük a génexpressziót a HDAC5-ön keresztül, és kikapcsoljuk a túlélésért felelős jel utat az Akt kinázon keresztül, a PKD1 és a VEGFR2 szimultán gátlása szükséges. Tehát ez egy jó példa arra, hogy mi is lehet a jelentősége annak, ha egy inhibitor több célpontot képes blokkolni egyszerre egy adott mechanizmusban.

A következő kísérletekben a VCC251801 különböző érendotél sejtfunciókra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Az angiogenezis első lépéseinek egyike az érendotélsejtek kemoattraktánsokat kibocsájtó sejtek irányába történő migrációja. Ennek megfelelően elsőként ezt a sejtfunciót tanulmányoztuk. A sejt migrációs kísérletekben a VCC251801 alacsonyabb koncentráció tartományban gátolta a sejt migrációt, a referencia gátlószerekkel összehasonlítva. Elképzelhető, hogy ez a hatékonyabb gátlás annak köszönhető, hogy egy gátlószerelemmel célzunk meg az érendotél sejt migráció szempontjából több fontos kinázt. Mivel azonban, ahogyan már említettem a VCC251801 egy publikált CDK2/4 gátlószerelem, valószínűleg ez a hatás is közrejátszik a kapott eredményekben, ezt azonban további kísérletekkel nem vizsgáltuk. Mivel a CDK

enzimek a sejtosztódásban játszanak szerepet, annak érdekében, hogy kiküszöböljük a CDK2/4 gátló hatást, a sejteket a kísérlet megkezdése előtt egy éjszakán keresztül éhezettük. Korábbi kísérleteink szerint ez jelentősen lelassította a sejtosztódást, és feltételezhetően a CDK-k működését is, azonban ezt közvetlenül nem vizsgáltuk. Terápiás oldalról nézve, véleményünk szerint ez a CDK2/4 gátló hatás az inhibitorunk egy további előnye is lehet.

A következő vizsgálati módszerünk – a tube formation módszer – alkalmas arra, hogy egyszerre vizsgáljuk az angiogenezis folyamatának több lépését *in vitro* körülmények között, úgymint a sejt migrációt, proliferációt és inváziót, aminek eredményeképpen a sejtek kapilláriszerű szerkezeteket hoznak létre. Ebben a kísérletben több paramétert vizsgáltunk a kiértékelések során: a képződött csövek számát, hosszát és a csövekkel borított terület nagyságát. A VCC251801 jelentős mértékben csökkentette mindhárom vizsgált paramétert, azonban a 2,5  $\mu$ M koncentráció esetében figyelhetjük meg azt a jelenséget, hogy a csövekkel borított terület nagysága sokkal nagyobb mértékben csökkent, mint a csövek száma illetve hossza. Ez véleményünk szerint annak köszönhető, hogy a VCC251801 kezelés hatására kialakulnak ugyan kapilláriszerű struktúrák, de ezek nem annyira komplex szerkezetűek, mint mondjuk a kezeletlen mintában. Tehát a csövek száma lehet nagyobb, azonban ezek rövidebbek, így az általuk borított terület is kisebb lesz. Összességében azonban elmondhatjuk, hogy a VCC251801 hatékony gátlószere volt az *in vitro* angiogenezisnek.

Érendotél sejtek egy szintén fontos funkciója a szuperoxid termelés, amelynek rendellenes működése oxidatív stressz állapotát idézi elő, elősegítve több érrendszeri rendellenesség kialakulását, mint például az endotél diszfunkció, az érlemezésedés vagy a magas vérnyomás [175, 184]. A szakirodalmi adatok alapján érendotélsejtekben a NOX4 tekinthető a domináns NADPH-oxidáz izoformának [176]. A PKD1 szerepe még nem ismert az érendotél sejtek szuperoxid termelésének folyamatában, így kíváncsiak voltunk arra, hogy vajon részt vesz-e a NOX4 általi szuperoxid termelésben. Azonban kísérleteink alapján a PKD1 inhibitorok – sem a VCC251801, sem pedig a kb-NB142-70 - nem befolyásolták a szuperoxid termelést, így az első eredmények alapján azt feltételezhetjük, hogy érendotél sejtekben a PKD1 nem tagja a NOX4-en keresztül történő szuperoxid termelés mechanizmusának.



A másik sejtmmodellünk a neutrofil granulociták voltak. Ezek a sejtek a veleszületett immunrendszer részeként fontos szerepet töltenek be szervezetünk különböző patogénekkal szemben való védelmében. Azonban különböző patológiás folyamatokban, például tumoros elváltozások vagy autoimmun megbetegedések esetében túlzott működésük figyelhető meg, ami viszont káros a szervezet számára. Davidson-Moncada és munkatársai kimutatták neutrofil granulocitákban a PKD1 jelenlétét, és fontos szabályozó szerepét az Fc $\gamma$ -receptor aktivált szuperoxid termelésben [119]. Ezen az eredményen elindulva, kísérleteink során mi is megvizsgáltuk, hogy a VCC251801 milyen hatással van a neutrofilek Fc $\gamma$ -receptor indukált szuperoxid termelésére. A kapott eredményeink szerint a VCC251801 igen hatékony módon, alacsony koncentrációtartományban jelentősen csökkentette a neutrofilek válaszreakcióját (0,3  $\mu$ M esetén kb. 50%-kal, 3  $\mu$ M-ban majdnem 100%-os volt a gátlás). A PKD1 szerepét az Fc $\gamma$ R útvonalban a kb-NB142-70 által mutatott eredmény is tovább erősítette, ugyanis ez a gátlószer is markáns gátlást okozott. A következő neutrofileket aktiváló módszer a letapadás-függő, TNF $\alpha$ , mint gyulladáscitokin általi stimuláció integrin ligand (fibrinogén) felszínen [179]. Ebben az útvonalban, illetve ebben a neutrofil sejtválaszban még nem vizsgálták a PKD1 szerepét korábban. Meglepetésünkre azt tapasztaltuk, hogy a VCC251801 ebben az esetben is, az immunkomplex aktivációval megegyező mértékű, igazán markáns gátlást okozott a szuperoxid termelésben (0,3  $\mu$ M koncentrációban nagyjából 50%, 3  $\mu$ M dózisban közel 100% gátlás). A kb-NB142-70 szintén jelentős sejtválasz csökkenést okozott. Ezek az eredmények felvetik a PKD1 potenciális szerepét a letapadás-függő, TNF $\alpha$  indukált neutrofil granulocita aktivációban, azonban ennek bizonyítására még további kísérletek szükségesek. Érdekes volt továbbá, hogy egy másik projekt keretein belül végzett kísérletek alapján, a VCC251801 nem gátolta szignifikáns mértékben, a neutrofilekben is jelen levő, és az aktivációjukban döntő szerepet játszó Src család kinázokat (c-Src, Fgr, Lyn, Hck) rekombináns kináz vizsgálatban. Ezek az eredmények szintén tovább erősítik azt az elképzelést, hogy a PKD1 egy potenciális célpont lehet a gyulladás elleni terápiában. Az Axitinib ezekben a kísérletekben nem befolyásolta a neutrofilek válaszreakcióját, feltételezhetően azért, mert a VEGFR izoformáknak ezekben az útvonalakban nincsen leírt szerepe. A magasabb dózisban látható csökkenés pedig valószínűleg „off-target” hatás eredménye. Neutrofil granulociták esetében is igaz, hogy

a forbol-észterek a sejtfelszíni receptorok aktivációja nélkül képesek egy markáns kináz aktivációt elindítani [180]. Egy olyan vegyület, ami a forbol-észterek által indukált neutrofil aktivációt gátolja, az feltehetőleg a gátlószer széles célpont spektrumára vezethető vissza, és emiatt kedvezőtlen hatással lehet a sejtek életképességére. Ezt a PMA aktivációt azonban sem a VCC251801, sem pedig a referencia inhibitorok nem csökkentették a kísérletekben alkalmazott legmagasabb dózisban (10  $\mu$ M).

Ittner és munkatársai akut légúti distressz szindrómás állatmodelleken végzett kísérletek alapján azt állapították meg, hogy a PKD1 negatívan szabályozza a neutrofil granulociták tüdőbe történő extravazációját [121]. Ebből kifolyólag egy *in vitro* extravazációt modellező rendszerben megvizsgáltuk a VCC251801 hatását a neutrofilek transzmigrációjára, ahol a kapott eredmények várakozásainknak megfelelően, azt mutatták, hogy sem a VCC251801, sem pedig a referencia inhibitorok nem gátolták a neutrofil transzmigrációt.

## 7. 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 terciér 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 (úgy mint immobilizált immunkomplex, illetve adhéziófüggő TNF $\alpha$  indukált aktiváció) kiváltott válaszreakcióját. Azonban az immunkomplex aktivációval ellentétben, a PKD1 szerepét még nem írták le az adhéziófüggő TNF $\alpha$  aktivációs útvonalban, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a PKD1 részt vesz ebben a mechanizmusban.

## 8. Összefoglalás

A PKD1 fontos szerepet játszik számos sejtfunció szabályozásában, továbbá több rendellenes folyamat szereplője is, mint például a patológiás angiogenesis vagy különböző gyulladással kapcsolatos folyamatok. A PKD1 tehát egy potenciális gyógyszer-célpont lehet, ezért PhD munkám céljával új PKD1 inhibitorok azonosítását és karakterizálását tűztük ki célul.

A Vichem Kft-vel együttműködésben 2000 db kinázgátló vegyület rekombináns PKD1-re való letesztelése során, pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-on alapszerkezettel rendelkező PKD1 gátlószereket azonosítottunk. Megállapítottuk továbbá, hogy az alapváz 2-es és 6-os pozíciójában található funkciós csoportok jelenléte és minősége kulcsfontosságú a PKD1 gátlás szempontjából. Az általunk leghatékonyabbnak ítélt vegyület, a VCC251801 szelektívnek bizonyult a PKD1-hez működésben és szerkezetben hasonló kinázokkal szemben. További vizsgálatok fényt derítettek arra, hogy a VCC251801 egy másik fontos célpontja a VEGFR2. A szakirodalom alapján a PKD1 és a VEGFR2 fontos szereplői az angiogenesisnek és különböző gyulladással kapcsolatos folyamatoknak, ezért sejtmodellnek érendotél sejteket, illetve neutrofil granulocitákat választottunk. ADME-Tox vizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy az érendotél sejtek relatíve magas dózisban is tolerálták a VCC251801-et, valamint, hogy a gátlószert képes passzív transzporttal átjutni mesterséges lipid membránra. Érendotél sejtekben az inhibitorunk a PKD1 és VEGFR2 egyidejű inhibíciójával képes volt a VEGFR2 jelátvitel hatékony gátlására. Csökkentette továbbá az érendotél sejtek proliferációját, migrációját és az *in vitro* angiogenesiset, azonban nem volt hatással az érendotél sejtek szuperoxid termelésére. Az VCC251801 gátolta neutrofil granulociták specifikus aktivációs mechanizmusait, mint például az Fc-receptoron keresztüli, és az adhéziófüggő TNF $\alpha$  indukált válaszreakcióját, azonban a sejtek transzmigrációjára nem volt hatással.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy sikerült azonosítanunk egy olyan inhibitorot, amely hatékonyan gátolja a PKD1 és VEGFR2 kinázok működését, illetve az általuk szabályozott jelátviteli útvonalakat és funkciókat érendotél sejtekben és neutrofil granulocitákban.

## 9. Summary

PKD1 is involved in many cellular functions and it is implicated in several pathological disorders as well, such as angiogenesis and inflammation related processes. Thus, PKD1 could be a potential target in drug development, therefore the aim of my PhD study was to identify and characterize novel PKD1 inhibitor molecules.

In collaboration with Vichem Chemie Ltd., 2000 kinase inhibitory compounds were tested and pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one moiety based PKD1 inhibitors were identified. Regarding the PKD1 inhibitory effect, the presence of certain functional groups at the 2- and 6- positions on the basic structure is critical. The most effective compound, the VCC251801 was proved to be specific for PKD1 among other kinases with high sequence homology or functional similarity. Further studies revealed VEGFR2 as another important target of VCC251801. According to the literature, PKD1 and VEGFR2 are important players in angiogenesis and inflammation related processes, therefore our chosen cellular models were endothelial cells and neutrophil granulocytes. In early ADME-Tox studies, VCC251801 was well tolerated by endothelial cells, furthermore our inhibitor could penetrate through the artificial lipid membrane by passive transport. In endothelial cells, VCC251801 could block effectively the VEGFR2 pathway by the simultaneous inhibition of PKD1 and VEGFR2. Moreover, it reduced the endothelial cell proliferation, migration and *in vitro* angiogenesis. However, the endothelial superoxide production remained unaffected after the treatment of our inhibitor. In neutrophils, VCC251801 could block specific activation mechanisms, such as the Fc-receptor induced-, and the adhesion dependent TNF $\alpha$  activated cell response. However, the neutrophil transmigration was not affected after the treatment of VCC251801.

In summary, we have identified a small molecular inhibitor which could effectively reduce the activity of PKD1 and VEGFR2 kinases in their specific signaling pathways in endothelial cells and neutrophils, eventually negatively influencing certain cellular functions.

## 10. Irodalomjegyzék

- [1] Valverde AM, Sinnett-Smith J, Van Lint J, Rozengurt E. (1994) Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 8572-8576.
- [2] Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, Pfizenmaier K. (1994) PKC $\alpha$  is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem*, 269: 6140-6148.
- [3] Rozengurt E, Sinnett-Smith J, Van Lint J, Valverde AM. (1995) Protein kinase D (PKD): a novel target for diacylglycerol and phorbol esters. *Mutat Res*, 333: 153-160.
- [4] Hayashi A, Seki N, Hattori A, Kozuma S, Saito T. (1999) PKC $\nu$ , a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKC $\mu$ . *Biochim Biophys Acta*, 1450: 99-106.
- [5] Sturany S, Van Lint J, Muller F, Wilda M, Hameister H, Hocker M, Brey A, Gern U, Vandenheede J, Gress T, Adler G, Seufferlein T. (2001) Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2. A novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases. *J Biol Chem*, 276: 3310-3318.
- [6] Iglesias T, Matthews S, Rozengurt E. (1998) Dissimilar phorbol ester binding properties of the individual cysteine-rich motifs of protein kinase D. *FEBS Lett*, 437: 19-23.
- [7] Storz P, Doppler H, Johannes FJ, Toker A. (2003) Tyrosine phosphorylation of protein kinase D in the pleckstrin homology domain leads to activation. *J Biol Chem*, 278: 17969-17976.
- [8] Lint JV, Rykx A, Vantus T, Vandenheede JR. (2002) Getting to know protein kinase D. *Int J Biochem Cell Biol*, 34: 577-581.
- [9] Iglesias T, Rozengurt E. (1998) Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*, 273: 410-416.
- [10] Iglesias T, Rozengurt E. (1999) Protein kinase D activation by deletion of its cysteine-rich motifs. *FEBS Lett*, 454: 53-56.

- [11] Nishikawa K, Toker A, Johannes FJ, Songyang Z, Cantley LC. (1997) Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J Biol Chem*, 272: 952-960.
- [12] Waldron RT, Rey O, Iglesias T, Tugal T, Cantrell D, Rozengurt E. (2001) Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo. *J Biol Chem*, 276: 32606-32615.
- [13] Storz P, Doppler H, Toker A. (2004) Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling. *Mol Cell Biol*, 24: 2614-2626.
- [14] Rey O, Young SH, Cantrell D, Rozengurt E. (2001) Rapid protein kinase D translocation in response to G protein-coupled receptor activation. Dependence on protein kinase C. *J Biol Chem*, 276: 32616-32626.
- [15] Iglesias T, Waldron RT, Rozengurt E. (1998) Identification of in vivo phosphorylation sites required for protein kinase D activation. *J Biol Chem*, 273: 27662-27667.
- [16] Matthews SA, Iglesias T, Rozengurt E, Cantrell D. (2000) Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD). *EMBO J*, 19: 2935-2945.
- [17] Jacamo R, Sinnott-Smith J, Rey O, Waldron RT, Rozengurt E. (2008) Sequential protein kinase C (PKC)-dependent and PKC-independent protein kinase D catalytic activation via Gq-coupled receptors: differential regulation of activation loop Ser(744) and Ser(748) phosphorylation. *J Biol Chem*, 283: 12877-12887.
- [18] Matthews SA, Rozengurt E, Cantrell D. (1999) Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase Cmu. *J Biol Chem*, 274: 26543-26549.
- [19] Rybin VO, Guo J, Steinberg SF. (2009) Protein kinase D1 autophosphorylation via distinct mechanisms at Ser744/Ser748 and Ser916. *J Biol Chem*, 284: 2332-2343.
- [20] Vertommen D, Rider M, Ni Y, Waelkens E, Merlevede W, Vandenhede JR, Van Lint J. (2000) Regulation of protein kinase D by multisite phosphorylation. Identification of phosphorylation sites by mass spectrometry and characterization by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 275: 19567-19576.



- [21] Storz P, Toker A. (2003) Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. *EMBO J*, 22: 109-120.
- [22] Rozengurt E, Rey O, Waldron RT. (2005) Protein kinase D signaling. *J Biol Chem*, 280: 13205-13208.
- [23] Maeda Y, Beznoussenko GV, Van Lint J, Mironov AA, Malhotra V. (2001) Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain. *EMBO J*, 20: 5982-5990.
- [24] Sumara G, Formentini I, Collins S, Sumara I, Windak R, Bodenmiller B, Ramracheya R, Caille D, Jiang H, Platt KA, Meda P, Aebersold R, Rorsman P, Ricci R. (2009) Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell*, 136: 235-248.
- [25] Bencsik N, Sziber Z, Liliom H, Tarnok K, Borbely S, Gulyas M, Ratkai A, Szucs A, Hazai-Novak D, Ellwanger K, Racz B, Pfizenmaier K, Hausser A, Schlett K. (2015) Protein kinase D promotes plasticity-induced F-actin stabilization in dendritic spines and regulates memory formation. *J Cell Biol*, 210: 771-783.
- [26] Evans IM, Zachary IC. (2011) Protein kinase D in vascular biology and angiogenesis. *IUBMB Life*, 63: 258-263.
- [27] Kim YI, Park JE, Brand DD, Fitzpatrick EA, Yi AK. (2010) Protein kinase D1 is essential for the proinflammatory response induced by hypersensitivity pneumonitis-causing thermophilic actinomycetes *Saccharopolyspora rectivirgula*. *J Immunol*, 184: 3145-3156.
- [28] Hao Q, Wang L, Tang H. (2009) Vascular endothelial growth factor induces protein kinase D-dependent production of proinflammatory cytokines in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296: C821-827.
- [29] Abedi H, Rozengurt E, Zachary I. (1998) Rapid activation of the novel serine/threonine protein kinase, protein kinase D by phorbol esters, angiotensin II and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 427: 209-212.
- [30] Rozengurt E. (2011) Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease. *Physiology (Bethesda)*, 26: 23-33.

- [31] Fu Y, Rubin CS. (2011) Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology. *EMBO Rep*, 12: 785-796.
- [32] Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Qi X, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. (2008) Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 3059-3063.
- [33] Kim MS, Fielitz J, McAnally J, Shelton JM, Lemon DD, McKinsey TA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. (2008) Protein kinase D1 stimulates MEF2 activity in skeletal muscle and enhances muscle performance. *Mol Cell Biol*, 28: 3600-3609.
- [34] Ha CH, Wang W, Jhun BS, Wong C, Hausser A, Pfizenmaier K, McKinsey TA, Olson EN, Jin ZG. (2008) Protein kinase D-dependent phosphorylation and nuclear export of histone deacetylase 5 mediates vascular endothelial growth factor-induced gene expression and angiogenesis. *J Biol Chem*, 283: 14590-14599.
- [35] Wang S, Li X, Parra M, Verdin E, Bassel-Duby R, Olson EN. (2008) Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 7738-7743.
- [36] Jensen ED, Gopalakrishnan R, Westendorf JJ. (2009) Bone morphogenic protein 2 activates protein kinase D to regulate histone deacetylase 7 localization and repression of Runx2. *J Biol Chem*, 284: 2225-2234.
- [37] Scott RW, Olson MF. (2007) LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med (Berl)*, 85: 555-568.
- [38] Eiseler T, Doppler H, Yan IK, Kitatani K, Mizuno K, Storz P. (2009) Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through slingshot. *Nat Cell Biol*, 11: 545-556.
- [39] Peterburs P, Heering J, Link G, Pfizenmaier K, Olayioye MA, Hausser A. (2009) Protein kinase D regulates cell migration by direct phosphorylation of the cofilin phosphatase slingshot 1 like. *Cancer Res*, 69: 5634-5638.
- [40] Eiseler T, Hausser A, De Kimpe L, Van Lint J, Pfizenmaier K. (2010) Protein kinase D controls actin polymerization and cell motility through phosphorylation of cortactin. *J Biol Chem*, 285: 18672-18683.

- [41] Ziegler S, Eiseler T, Scholz RP, Beck A, Link G, Hausser A. (2011) A novel protein kinase D phosphorylation site in the tumor suppressor Rab interactor 1 is critical for coordination of cell migration. *Mol Biol Cell*, 22: 570-580.
- [42] Hu H, Bliss JM, Wang Y, Colicelli J. (2005) RIN1 is an ABL tyrosine kinase activator and a regulator of epithelial-cell adhesion and migration. *Curr Biol*, 15: 815-823.
- [43] Bard F, Malhotra V. (2006) The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22: 439-455.
- [44] Diaz Anel AM. (2007) Phospholipase C beta3 is a key component in the Gbetagamma/PKCeta/PKD-mediated regulation of trans-Golgi network to plasma membrane transport. *Biochem J*, 406: 157-165.
- [45] Irannejad R, Wedegaertner PB. (2010) Regulation of constitutive cargo transport from the trans-Golgi network to plasma membrane by Golgi-localized G protein betagamma subunits. *J Biol Chem*, 285: 32393-32404.
- [46] 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: 880-886.
- [47] Graham TR, Burd CG. (2011) Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases. *Trends Cell Biol*, 21: 113-121.
- [48] Nhek S, Ngo M, Yang X, Ng MM, Field SJ, Asara JM, Ridgway ND, Toker A. (2010) Regulation of oxysterol-binding protein Golgi localization through protein kinase D-mediated phosphorylation. *Mol Biol Cell*, 21: 2327-2337.
- [49] Doppler H, Storz P. (2007) A novel tyrosine phosphorylation site in protein kinase D contributes to oxidative stress-mediated activation. *J Biol Chem*, 282: 31873-31881.
- [50] Storz P, Doppler H, Toker A. (2005) Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell Biol*, 25: 8520-8530.

- [51] Haussermann S, Kittstein W, Rincke G, Johannes FJ, Marks F, Gschwendt M. (1999) Proteolytic cleavage of protein kinase C $\mu$  upon induction of apoptosis in U937 cells. *FEBS Lett*, 462: 442-446.
- [52] Vantus T, Vertommen D, Saelens X, Rykx A, De Kimpe L, Vancauwenbergh S, Mikhalap S, Waelkens E, Keri G, Seufferlein T, Vandenabeele P, Rider MH, Vandenheede JR, Van Lint J. (2004) Doxorubicin-induced activation of protein kinase D1 through caspase-mediated proteolytic cleavage: identification of two cleavage sites by microsequencing. *Cell Signal*, 16: 703-709.
- [53] Sundram V, Chauhan SC, Jaggi M. (2011) Emerging roles of protein kinase D1 in cancer. *Mol Cancer Res*, 9: 985-996.
- [54] Mak P, Jaggi M, Syed V, Chauhan SC, Hassan S, Biswas H, Balaji KC. (2008) Protein kinase D1 (PKD1) influences androgen receptor (AR) function in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 373: 618-623.
- [55] Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, Hemstreet GP, Balaji KC. (2003) Protein kinase C $\mu$  is down-regulated in androgen-independent prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 307: 254-260.
- [56] Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, Wheelock MJ, Johnson KR, Hemstreet GP, Balaji KC. (2005) E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C $\mu$  is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. *Cancer Res*, 65: 483-492.
- [57] Biswas MH, Du C, Zhang C, Straubhaar J, Languino LR, Balaji KC. (2010) Protein kinase D1 inhibits cell proliferation through matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 secretion in prostate cancer. *Cancer Res*, 70: 2095-2104.
- [58] Du C, Zhang C, Hassan S, Biswas MH, Balaji KC. (2010) Protein kinase D1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition through phosphorylation of snail. *Cancer Res*, 70: 7810-7819.
- [59] Eiseler T, Doppler H, Yan IK, Goodison S, Storz P. (2009) Protein kinase D1 regulates matrix metalloproteinase expression and inhibits breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res*, 11: R13.

- [60] Borges S, Doppler H, Perez EA, Andorfer CA, Sun Z, Anastasiadis PZ, Thompson E, Geiger XJ, Storz P. (2013) Pharmacologic reversion of epigenetic silencing of the PRKD1 promoter blocks breast tumor cell invasion and metastasis. *Breast Cancer Res*, 15: R66.
- [61] Shabelnik MY, Kovalevska LM, Yurchenko MY, Shlapatska LM, Rzepetsky Y, Sidorenko SP. (2011) Differential expression of PKD1 and PKD2 in gastric cancer and analysis of PKD1 and PKD2 function in the model system. *Exp Oncol*, 33: 206-211.
- [62] Kim M, Jang HR, Kim JH, Noh SM, Song KS, Cho JS, Jeong HY, Norman JC, Caswell PT, Kang GH, Kim SY, Yoo HS, Kim YS. (2008) Epigenetic inactivation of protein kinase D1 in gastric cancer and its role in gastric cancer cell migration and invasion. *Carcinogenesis*, 29: 629-637.
- [63] Wei N, Chu E, Wipf P, Schmitz JC. (2014) Protein kinase d as a potential chemotherapeutic target for colorectal cancer. *Mol Cancer Ther*, 13: 1130-1141.
- [64] Yoo J, Chung C, Slice L, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. (2009) Protein kinase D mediates synergistic expression of COX-2 induced by TNF- $\alpha$  and bradykinin in human colonic myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297: C1576-1587.
- [65] Yoo J, Rodriguez Perez CE, Nie W, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. (2011) Protein kinase D1 mediates synergistic MMP-3 expression induced by TNF- $\alpha$  and bradykinin in human colonic myofibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 413: 30-35.
- [66] Harikumar KB, Kunnumakkara AB, Ochi N, Tong Z, Deorukhkar A, Sung B, Kelland L, Jamieson S, Sutherland R, Raynham T, Charles M, Bagherzadeh A, Foxton C, Boakes A, Farooq M, Maru D, Diagaradjane P, Matsuo Y, Sinnott-Smith J, Gelovani J, Krishnan S, Aggarwal BB, Rozengurt E, Ireson CR, Guha S. (2010) A novel small-molecule inhibitor of protein kinase D blocks pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, 9: 1136-1146.
- [67] Trauzold A, Schmiedel S, Sipos B, Wermann H, Westphal S, Roder C, Klapper W, Arlt A, Lehnert L, Ungefroren H, Johannes FJ, Kalthoff H. (2003) PKC $\mu$  prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells. *Oncogene*, 22: 8939-8947.

- [68] Guha S, Rey O, Rozengurt E. (2002) Neurotensin induces protein kinase C-dependent protein kinase D activation and DNA synthesis in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1. *Cancer Res*, 62: 1632-1640.
- [69] Sin YY, Baillie GS. (2012) Protein kinase D in the hypertrophy pathway. *Biochem Soc Trans*, 40: 287-289.
- [70] Vega RB, Harrison BC, Meadows E, Roberts CR, Papst PJ, Olson EN, McKinsey TA. (2004) Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol Cell Biol*, 24: 8374-8385.
- [71] McKinsey TA, Olson EN. (2005) Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes. *J Clin Invest*, 115: 538-546.
- [72] Iwata M, Maturana A, Hoshijima M, Tatematsu K, Okajima T, Vandenheede JR, Van Lint J, Tanizawa K, Kuroda S. (2005) PKCepsilon-PKD1 signaling complex at Z-discs plays a pivotal role in the cardiac hypertrophy induced by G-protein coupling receptor agonists. *Biochem Biophys Res Commun*, 327: 1105-1113.
- [73] Song K, Backs J, McAnally J, Qi X, Gerard RD, Richardson JA, Hill JA, Bassel-Duby R, Olson EN. (2006) The transcriptional coactivator CAMTA2 stimulates cardiac growth by opposing class II histone deacetylases. *Cell*, 125: 453-466.
- [74] Costa C, Incio J, Soares R. (2007) Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis*, 10: 149-166.
- [75] Bainbridge J, Sivakumar B, Paleolog E. (2006) Angiogenesis as a therapeutic target in arthritis: lessons from oncology. *Curr Pharm Des*, 12: 2631-2644.
- [76] Folkman J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1: 27-31.
- [77] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. (1999) VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 18: 3964-3972.
- [78] Harada M, Mitsuyama K, Yoshida H, Sakisaka S, Taniguchi E, Kawaguchi T, Ariyoshi M, Saiki T, Sakamoto M, Nagata K, Sata M, Matsuo K, Tanikawa K. (1998)

Vascular endothelial growth factor in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 27: 377-380.

[79] Lee SS, Joo YS, Kim WU, Min DJ, Min JK, Park SH, Cho CS, Kim HY. (2001) Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 19: 321-324.

[80] Etherington PJ, Winlove P, Taylor P, Paleolog E, Miotla JM. (2002) VEGF release is associated with reduced oxygen tensions in experimental inflammatory arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 20: 799-805.

[81] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277: 55-60.

[82] Scott BB, Zaratin PF, Colombo A, Hansbury MJ, Winkler JD, Jackson JR. (2002) Constitutive expression of angiopoietin-1 and -2 and modulation of their expression by inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Rheumatol*, 29: 230-239.

[83] Harriman G, Harper LK, Schaible TF. (1999) Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment. *Ann Rheum Dis*, 58 Suppl 1: I61-64.

[84] de Bandt M, Grossin M, Weber AJ, Chopin M, Elbim C, Pla M, Gougerot-Pocidallo MA, Gaudry M. (2000) Suppression of arthritis and protection from bone destruction by treatment with TNP-470/AGM-1470 in a transgenic mouse model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 2056-2063.

[85] Clevers H. (2004) At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell*, 118: 671-674.

[86] Folkman J. (1974) Proceedings: Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res*, 34: 2109-2113.

[87] Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. (2005) Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7: 211-217.

- [88] Yoshimura A. (2006) Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci*, 97: 439-447.
- [89] Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*, 42: 717-727.
- [90] Esposito I, Menicagli M, Funel N, Bergmann F, Boggi U, Mosca F, Bevilacqua G, Campani D. (2004) Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*, 57: 630-636.
- [91] Carmeliet P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6: 389-395.
- [92] Takahashi S. (2011) Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol Pharm Bull*, 34: 1785-1788.
- [93] Shibuya M. (2014) VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomol Ther (Seoul)*, 22: 1-9.
- [94] Carmeliet P, Jain RK. (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473: 298-307.
- [95] Schmidt T, Carmeliet P. (2011) Angiogenesis: a target in solid tumors, also in leukemia? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011: 1-8.
- [96] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. (2011) Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146: 873-887.
- [97] Wong C, Jin ZG. (2005) Protein kinase C-dependent protein kinase D activation modulates ERK signal pathway and endothelial cell proliferation by vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 280: 33262-33269.
- [98] Qin L, Zeng H, Zhao D. (2006) Requirement of protein kinase D tyrosine phosphorylation for VEGF-A165-induced angiogenesis through its interaction and regulation of phospholipase Cgamma phosphorylation. *J Biol Chem*, 281: 32550-32558.
- [99] Evans IM, Britton G, Zachary IC. (2008) Vascular endothelial growth factor induces heat shock protein (HSP) 27 serine 82 phosphorylation and endothelial



tubulogenesis via protein kinase D and independent of p38 kinase. *Cell Signal*, 20: 1375-1384.

[100] Rousseau S, Houle F, Huot J. (2000) Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med*, 10: 321-327.

[101] di Blasio L, Droetto S, Norman J, Bussolino F, Primo L. (2010) Protein kinase D1 regulates VEGF-A-induced  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin trafficking and endothelial cell migration. *Traffic*, 11: 1107-1118.

[102] Silva R, D'Amico G, Hodivala-Dilke KM, Reynolds LE. (2008) Integrins: the keys to unlocking angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: 1703-1713.

[103] Zhao D, Desai S, Zeng H. (2011) VEGF stimulates PKD-mediated CREB-dependent orphan nuclear receptor Nurr1 expression: role in VEGF-induced angiogenesis. *Int J Cancer*, 128: 2602-2612.

[104] Coussens LM, Werb Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, 420: 860-867.

[105] Labonte AC, Tosello-Tramont AC, Hahn YS. (2014) The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Mol Cells*, 37: 275-285.

[106] Davidson A, Diamond B. (2001) Autoimmune diseases. *N Engl J Med*, 345: 340-350.

[107] Nathan C. (2002) Points of control in inflammation. *Nature*, 420: 846-852.

[108] Biswas SK, Mantovani A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*, 11: 889-896.

[109] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature*, 454: 436-444.

[110] Koehne CH, Dubois RN. (2004) COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Semin Oncol*, 31: 12-21.

[111] Szlosarek PW, Balkwill FR. (2003) Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol*, 4: 565-573.

[112] Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN. (2003) IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 2645-2650.

- [113] Karin M. (2006) Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 441: 431-436.
- [114] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. (2007) Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*, 7: 41-51.
- [115] Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. (2014) Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res*, 2014: 149185.
- [116] Shchors K, Shchors E, Rostker F, Lawlor ER, Brown-Swigart L, Evan GI. (2006) The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1beta. *Genes Dev*, 20: 2527-2538.
- [117] Sparmann A, Bar-Sagi D. (2004) Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*, 6: 447-458.
- [118] Borrello MG, Alberti L, Fischer A, Degl'innocenti D, Ferrario C, Gariboldi M, Marchesi F, Allavena P, Greco A, Collini P, Pilotti S, Cassinelli G, Bressan P, Fugazzola L, Mantovani A, Pierotti MA. (2005) Induction of a proinflammatory program in normal human thyrocytes by the RET/PTC1 oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 14825-14830.
- [119] Davidson-Moncada JK, Lopez-Lluch G, Segal AW, Dekker LV. (2002) Involvement of protein kinase D in Fc gamma-receptor activation of the NADPH oxidase in neutrophils. *Biochem J*, 363: 95-103.
- [120] Qureshi A, Subathra M, Grey A, Schey K, Del Poeta M, Luberto C. (2010) Role of sphingomyelin synthase in controlling the antimicrobial activity of neutrophils against *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, 5: e15587.
- [121] Ittner A, Block H, Reichel CA, Varjosalo M, Gehart H, Sumara G, Gstaiger M, Krombach F, Zarbock A, Ricci R. (2012) Regulation of PTEN activity by p38delta-PKD1 signaling in neutrophils confers inflammatory responses in the lung. *J Exp Med*, 209: 2229-2246.
- [122] Yamashita K, Gon Y, Shimokawa T, Nunomura S, Endo D, Miyata N, Hashimoto S, Van Lint J, Ra C. (2010) High affinity receptor for IgE stimulation

activates protein kinase D augmenting activator protein-1 activity for cytokine producing in mast cells. *Int Immunopharmacol*, 10: 277-283.

[123] Murphy TR, Legere HJ, 3rd, Katz HR. (2007) Activation of protein kinase D1 in mast cells in response to innate, adaptive, and growth factor signals. *J Immunol*, 179: 7876-7882.

[124] Park JE, Kim YI, Yi AK. (2009) Protein kinase D1 is essential for MyD88-dependent TLR signaling pathway. *J Immunol*, 182: 6316-6327.

[125] Sidorenko SP, Law CL, Klaus SJ, Chandran KA, Takata M, Kurosaki T, Clark EA. (1996) Protein kinase C mu (PKC mu) associates with the B cell antigen receptor complex and regulates lymphocyte signaling. *Immunity*, 5: 353-363.

[126] Haxhinasto SA, Bishop GA. (2003) A novel interaction between protein kinase D and TNF receptor-associated factor molecules regulates B cell receptor-CD40 synergy. *J Immunol*, 171: 4655-4662.

[127] Haxhinasto SA, Bishop GA. (2004) Synergistic B cell activation by CD40 and the B cell antigen receptor: role of B lymphocyte antigen receptor-mediated kinase activation and tumor necrosis factor receptor-associated factor regulation. *J Biol Chem*, 279: 2575-2582.

[128] Matthews SA, Liu P, Spitaler M, Olson EN, McKinsey TA, Cantrell DA, Scharenberg AM. (2006) Essential role for protein kinase D family kinases in the regulation of class II histone deacetylases in B lymphocytes. *Mol Cell Biol*, 26: 1569-1577.

[129] Irie A, Harada K, Tsukamoto H, Kim JR, Araki N, Nishimura Y. (2006) Protein kinase D2 contributes to either IL-2 promoter regulation or induction of cell death upon TCR stimulation depending on its activity in Jurkat cells. *Int Immunol*, 18: 1737-1747.

[130] Beran M, Cao X, Estrov Z, Jeha S, Jin G, O'Brien S, Talpaz M, Arlinghaus RB, Lydon NB, Kantarjian H. (1998) Selective inhibition of cell proliferation and BCR-ABL phosphorylation in acute lymphoblastic leukemia cells expressing Mr 190,000 BCR-ABL protein by a tyrosine kinase inhibitor (CGP-57148). *Clin Cancer Res*, 4: 1661-1672.

- [131] Dan S, Naito M, Tsuruo T. (1998) Selective induction of apoptosis in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia cells by an inhibitor of BCR - ABL tyrosine kinase, CGP 57148. *Cell Death Differ*, 5: 710-715.
- [132] Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. (2001) Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 293: 876-880.
- [133] Travis J. (2004) Cancer. Gleevec, chapter two: new leukemia drug aims to overcome resistance. *Science*, 305: 319-321.
- [134] Golemovic M, Verstovsek S, Giles F, Cortes J, Manshour T, Manley PW, Mestan J, Dugan M, Alland L, Griffin JD, Arlinghaus RB, Sun T, Kantarjian H, Beran M. (2005) AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has in vitro activity against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 11: 4941-4947.
- [135] Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. (2013) Cancer genome landscapes. *Science*, 339: 1546-1558.
- [136] Broekman F, Giovannetti E, Peters GJ. (2011) Tyrosine kinase inhibitors: Multi-targeted or single-targeted? *World J Clin Oncol*, 2: 80-93.
- [137] Medina-Franco JL, Giulianotti MA, Welmaker GS, Houghten RA. (2013) Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. *Drug Discov Today*, 18: 495-501.
- [138] Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ. (1996) Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett*, 392: 77-80.
- [139] Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JS, Alessi DR, Cohen P. (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J*, 408: 297-315.
- [140] Sharlow ER, Giridhar KV, LaValle CR, Chen J, Leimgruber S, Barrett R, Bravo-Altamirano K, Wipf P, Lazo JS, Wang QJ. (2008) Potent and selective disruption of protein kinase D functionality by a benzoxoloazepinolone. *J Biol Chem*, 283: 33516-33526.

- [141] Torres-Marquez E, Sinnett-Smith J, Guha S, Kui R, Waldron RT, Rey O, Rozengurt E. (2010) CID755673 enhances mitogenic signaling by phorbol esters, bombesin and EGF through a protein kinase D-independent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 391: 63-68.
- [142] Lavalle CR, Bravo-Altamirano K, Giridhar KV, Chen J, Sharlow E, Lazo JS, Wipf P, Wang QJ. (2010) Novel protein kinase D inhibitors cause potent arrest in prostate cancer cell growth and motility. *BMC Chem Biol*, 10: 5.
- [143] Monovich L, Vega RB, Meredith E, Miranda K, Rao C, Capparelli M, Lemon DD, Phan D, Koch KA, Chapo JA, Hood DB, McKinsey TA. (2010) A novel kinase inhibitor establishes a predominant role for protein kinase D as a cardiac class IIa histone deacetylase kinase. *FEBS Lett*, 584: 631-637.
- [144] Evans IM, Bagherzadeh A, Charles M, Raynham T, Ireson C, Boakes A, Kelland L, Zachary IC. (2010) Characterization of the biological effects of a novel protein kinase D inhibitor in endothelial cells. *Biochem J*, 429: 565-572.
- [145] Meredith EL, Beattie K, Burgis R, Capparelli M, Chapo J, Dipietro L, Gamber G, Enyedy I, Hood DB, Hosagrahara V, Jewell C, Koch KA, Lee W, Lemon DD, McKinsey TA, Miranda K, Pagratis N, Phan D, Plato C, Rao C, Rozhitskaya O, Soldermann N, Springer C, van Eis M, Vega RB, Yan W, Zhu Q, Monovich LG. (2010) Identification of potent and selective amidobipyridyl inhibitors of protein kinase D. *J Med Chem*, 53: 5422-5438.
- [146] Meredith EL, Ardayfio O, Beattie K, Dobler MR, Enyedy I, Gaul C, Hosagrahara V, Jewell C, Koch K, Lee W, Lehmann H, McKinsey TA, Miranda K, Pagratis N, Pancost M, Patnaik A, Phan D, Plato C, Qian M, Rajaraman V, Rao C, Rozhitskaya O, Ruppen T, Shi J, Siska SJ, Springer C, van Eis M, Vega RB, von Matt A, Yang L, Yoon T, Zhang JH, Zhu N, Monovich LG. (2010) Identification of orally available naphthyridine protein kinase D inhibitors. *J Med Chem*, 53: 5400-5421.
- [147] Tandon M, Johnson J, Li Z, Xu S, Wipf P, Wang QJ. (2013) New pyrazolopyrimidine inhibitors of protein kinase d as potent anticancer agents for prostate cancer cells. *PLoS One*, 8: e75601.

- [148] Tandon M, Salamoun JM, Carder EJ, Farber E, Xu S, Deng F, Tang H, Wipf P, Wang QJ. (2015) SD-208, a novel protein kinase D inhibitor, blocks prostate cancer cell proliferation and tumor growth in vivo by inducing G2/M cell cycle arrest. *PLoS One*, 10: e0119346.
- [149] Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285: 1182-1186.
- [150] Folkman J. (1985) Angiogenesis and its inhibitors. *Important Adv Oncol*: 42-62.
- [151] Kusaka M, Sudo K, Matsutani E, Kozai Y, Marui S, Fujita T, Ingber D, Folkman J. (1994) Cytostatic inhibition of endothelial cell growth by the angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470). *Br J Cancer*, 69: 212-216.
- [152] Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 359-371.
- [153] Chen HX, Gore-Langton RE, Cheson BD. (2001) Clinical trials referral resource: Current clinical trials of the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab. *Oncology (Williston Park)*, 15: 1017, 1020, 1023-1016.
- [154] Veronese ML, O'Dwyer PJ. (2004) Monoclonal antibodies in the treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 40: 1292-1301.
- [155] Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, Chan E, Moss KG, Haznedar JO, Sukbuntherng J, Blake RA, Sun L, Tang C, Miller T, Shirazian S, McMahon G, Cherrington JM. (2003) In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res*, 9: 327-337.
- [156] Abrams TJ, Lee LB, Murray LJ, Pryer NK, Cherrington JM. (2003) SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther*, 2: 471-478.
- [157] Adnane L, Trail PA, Taylor I, Wilhelm SM. (2006) Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells

and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods Enzymol*, 407: 597-612.

[158] Verzoni E, Grassi P, Testa I, Iacovelli R, Biondani P, Garanzini E, De Braud F, Procopio G. (2014) Targeted treatments in advanced renal cell carcinoma: focus on axitinib. *Pharmacogenomics Pers Med*, 7: 107-116.

[159] Bashshur ZF, Bazarbachi A, Schakal A, Haddad ZA, El Haibi CP, Nouredin BN. (2006) Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*, 142: 1-9.

[160] MacFarlane LA, Todd DJ. (2014) Kinase inhibitors: the next generation of therapies in the treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*, 17: 359-368.

[161] Seavey MM, Dobrzanski P. (2012) The many faces of Janus kinase. *Biochem Pharmacol*, 83: 1136-1145.

[162] Kremer JM, Bloom BJ, Breedveld FC, Coombs JH, Fletcher MP, Gruben D, Krishnaswami S, Burgos-Vargas R, Wilkinson B, Zerbini CA, Zwillich SH. (2009) The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo. *Arthritis Rheum*, 60: 1895-1905.

[163] Mesa RA. (2010) Ruxolitinib, a selective JAK1 and JAK2 inhibitor for the treatment of myeloproliferative neoplasms and psoriasis. *IDrugs*, 13: 394-403.

[164] Christodoulou C, Choy EH. (2006) Joint inflammation and cytokine inhibition in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med*, 6: 13-19.

[165] Damjanov N, Kauffman RS, Spencer-Green GT. (2009) Efficacy, pharmacodynamics, and safety of VX-702, a novel p38 MAPK inhibitor, in rheumatoid arthritis: results of two randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. *Arthritis Rheum*, 60: 1232-1241.

[166] Wong BR, Grossbard EB, Payan DG, Masuda ES. (2004) Targeting Syk as a treatment for allergic and autoimmune disorders. *Expert Opin Investig Drugs*, 13: 743-762.

- [167] Mocsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, Majumdar S, Lanier LL, Lowell CA, Nakamura MC. (2004) The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor gamma-chain (FcRgamma) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 6158-6163.
- [168] Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Jones DA, Musser TK, Grossbard EB, Magilavy DB. (2013) Effects of fostamatinib (R788), an oral spleen tyrosine kinase inhibitor, on health-related quality of life in patients with active rheumatoid arthritis: analyses of patient-reported outcomes from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Rheumatol*, 40: 369-378.
- [169] Ley K. (2014) Fueling the fire: Src family kinases drive inflammation. *J Exp Med*, 211: 1922.
- [170] Futosi K, Nemeth T, Pick R, Vantus T, Walzog B, Mocsai A. (2012) Dasatinib inhibits proinflammatory functions of mature human neutrophils. *Blood*, 119: 4981-4991.
- [171] Chen X, Murawski A, Patel K, Crespi CL, Balimane PV. (2008) A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model. *Pharm Res*, 25: 1511-1520.
- [172] Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80: 3734-3737.
- [173] Ni Y, Sinnott-Smith J, Young SH, Rozengurt E. (2013) PKD1 mediates negative feedback of PI3K/Akt activation in response to G protein-coupled receptors. *PLoS One*, 8: e73149.
- [174] Aranda E, Owen GI. (2009) A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biol Res*, 42: 377-389.
- [175] Bedard K, Krause KH. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87: 245-313.



- [176] Xu H, Goettsch C, Xia N, Horke S, Morawietz H, Forstermann U, Li H. (2008) Differential roles of PKC $\alpha$  and PKC $\epsilon$  in controlling the gene expression of Nox4 in human endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 44: 1656-1667.
- [177] Jaquet V, Scapozza L, Clark RA, Krause KH, Lambeth JD. (2009) Small-molecule NOX inhibitors: ROS-generating NADPH oxidases as therapeutic targets. *Antioxid Redox Signal*, 11: 2535-2552.
- [178] Jakus Z, Nemeth T, Verbeek JS, Mocsai A. (2008) Critical but overlapping role of Fc $\gamma$ RIII and Fc $\gamma$ RIV in activation of murine neutrophils by immobilized immune complexes. *J Immunol*, 180: 618-629.
- [179] Mocsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA. (2002) Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity*, 16: 547-558.
- [180] Mocsai A, Banfi B, Kapus A, Farkas G, Geiszt M, Buday L, Farago A, Ligeti E. (1997) Differential effects of tyrosine kinase inhibitors and an inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade on degranulation and superoxide production of human neutrophil granulocytes. *Biochem Pharmacol*, 54: 781-789.
- [181] Barvian M, Boschelli DH, Cossrow J, Dobrusin E, Fattaey A, Fritsch A, Fry D, Harvey P, Keller P, Garrett M, La F, Leopold W, McNamara D, Quin M, Trumpp-Kallmeyer S, Toogood P, Wu Z, Zhang E. (2000) Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one inhibitors of cyclin-dependent kinases. *J Med Chem*, 43: 4606-4616.
- [182] Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marme D, Schachtele C. (1993) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem*, 268: 9194-9197.
- [183] Hu-Lowe DD, Zou HY, Grazzini ML, Hallin ME, Wickman GR, Amundson K, Chen JH, Rewolinski DA, Yamazaki S, Wu EY, McTigue MA, Murray BW, Kania RS, O'Connor P, Shalinsky DR, Bender SL. (2008) Nonclinical antiangiogenesis and antitumor activities of axitinib (AG-013736), an oral, potent, and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases 1, 2, 3. *Clin Cancer Res*, 14: 7272-7283.
- [184] Shimokawa H, Matoba T. (2004) Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol Res*, 49: 543-549.

## 11. Saját 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, Órfi 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**

## 12. Munkamegosztás a társszerzők között

A PhD munkám alapjául szolgáló projektért elsősorban én voltam a felelős, amelyhez a kísérleteket három különböző laboratóriumban végeztem el.

A vegyülettár tesztelését és a kiválasztott vegyületek dóziszfüggés vizsgálatát én végeztem el a Vichem Chemie Kutató Kft. laboratóriumában. A szűrés során kiválasztott, a disszertáció alapjául szolgáló vegyület a VCC251801 rekombináns kináz vizsgálattal történő további karakterizálásában Gyulavári Pál volt a segítségemre. A rekombináns kináz vizsgálatok beállítását Dr. Szántai-Kis Csaba segítette.

A korai ADME-Tox paraméterek meghatározása során, a citotoxicitás vizsgálatban Dr. Brauswetter Diána és Dr. Kokas Márton, míg a membrán permeabilitás vizsgálat esetében Bökönyi Györgyi és Murányi József voltak a segítségemre.

Az angiogenezis modellként használt érendotél sejteken végzett kísérleteket, vagyis a sejtproliferáció vizsgálatot, western blot analízist, sejtmigráció vizsgálatát, az *in vitro* angiogenezist, és érendotél sejtek szuperoxid termelésének a vizsgálatát egyedül végeztem el. Az érendotél sejtek szuperoxid termelésének vizsgálati módszerét Dr. Borbély Gábor segítette beállítani.

A korai ADME-Tox paraméterek meghatározása, és az érendotél sejtekkel végzett kísérletek mindegyike az MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport laboratóriumában történt.

A neutrofil granulocitákkal való vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetében, Dr. Mócsai Attila laboratóriumában végeztem el. A kísérleti módszerek (neutrofil granulociták izolálása, szuperoxid termelésének és transzmigrációjának vizsgálata) betanításában Dr. Németh Tamás volt a segítségemre.

Az egyes kísérletekből származó eredmények kiértékelését, valamint statisztikai analízisét én végeztem el.

A „Mellékletek” fejezetben szereplő szelektivitási vizsgálatokat külső cégekkel – SignalChem Ltd. és ProQinase GmbH – végeztettük el.

A disszertációban szereplő eredmények nem szerepelnek más doktori értekezésében.

### **13. Köszönetnyilvánítás**

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Vántus Tibornak, hogy PhD hallgatói közé fogadott, és mindvégig tanácsokkal látott el és támogatta munkámat.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kéri Györgynek a munkámhoz nyújtott sok segítségért, és hogy dolgozhattam az MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoportban.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet jelenlegi, és volt gazdátójának Prof. Dr. Bánhegyi Gábornak és Prof. Dr. Mandl Józsefnek, hogy helyet biztosítottak az intézetben a munkám elvégzésére.

Hálával tartozom az MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport tagjainak, Tanai Henriettnek, Bökönyi Gyöngyinek, Dr. Horváth Anikónak, Gyulavári Pálnak, Brauswetter Diánának, Péntes Kingának, Borbély Gábornak és Murányi Józsefnek mind a szakmai, mind pedig a baráti téren nyújtott segítségükért.

Szeretném megköszönni a munkámhoz nyújtott segítséget a Vichem Kft. dolgozóinak, Dr. Szántai-Kis Csabának, Dr. Greff Zoltánnak és Breza Nórának.

Külön köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetéből Dr. Mócsai Attilának, hogy a doktori munkámhoz szükséges kísérleteket elvégezhettem a laboratóriumában, továbbá köszönöm az ott dolgozó kollégák, Dr. Németh Tamás és Pató Zsuzsanna által nyújtott sok segítséget.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni Szüleimnek, hogy végig bíztak bennem és támogattak a hosszú évek alatt.

## 14. Mellékletek

1. táblázat A *PKD1* inhibitorok szelektivitás vizsgálata. A mérést a SignalChem Ltd. végezte 5  $\mu$ M koncentrációban.

	Vegyület sorszáma				
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>11</i>
<b>Kináz</b>	<b>%-os gátlás</b>				
<i>PKC<math>\delta</math></i>	1	62	37	22	83
<i>PKA<math>\alpha</math></i>	0	23	3	13	36
<i>PKD2</i>	67	80	71	66	68
<i>PKC<math>\gamma</math></i>	34	70	42	41	86
<i>MLCK</i>	2	20	4	7	19
<i>PKC<math>\alpha</math></i>	3	25	4	4	38
<i>CAMK1</i>	6	30	8	13	29
<i>PKC<math>\epsilon</math></i>	21	50	17	35	69

2. táblázat A *VCC251801* VEGFR gátló hatása. A mérést a ProQinase GmbH végezte 1  $\mu$ M inhibitor koncentráció mellett.

<i>VCC251801</i>	
<b>Kináz</b>	<b>%-os gátlás</b>
<i>VEGFR1</i>	100
<i>VEGFR2</i>	100
<i>VEGFR3</i>	100