

# **Egy virtuális szűrés által azonosított új, nem-lipid LPA<sub>2</sub> receptor agonista, a GRI977143 farmakológiai és celluláris vizsgálata**

Ph.D. tézis

Szerző:

**Nagyné dr. Kiss Gyöngyi**

Témavezetők:

**Prof. Dr. Tigyi Gábor, Ph.D.**

Department of Physiology  
University of Tennessee Health Science Center  
Memphis, TN, USA

**Prof. Dr. Sümegei Balázs, Ph.D., D.Sc.**

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet  
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Pécs, Magyarország

Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet  
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Pécs, Magyarország

2013

## 1. Köszönetnyilvánítás

Hálával tartozom témavezetőimnek, Dr. Tigyi Gábor és Dr. Sümegi Balázs professzor uraknak a lehetőségért, hogy kutatóként két évet tölthettem az Egyesült Államokban, a memphisi University of Tennessee Health Science Center Élettani Intézetében. Ezen évek alatt, Tigyi professzor úr munkacsoportjának tagjaként megismerhettem a lizofosfolipidek izgalmas világát és számtalan apoptózist indukáló és detektáló kísérletes módszer elsajátítására nyílt lehetőségem. Tigyi professzor úr tanácsai és biztatása által vezetve valóra válhattam azt az álmom, hogy rátaláljak egy sikeres kutatási témára, büszke lehessenek a munkámra és az eredményeimre és elsőszerzős cikkeim rangos nemzetközi folyóiratokban jelenjenek meg.

Hála és köszönet illeti korábbi kollégáimat a Tigyi professzor úr munkacsoportjából, Ryoko Tsukahara-t, Yuko Fujiwara-t, Dianna Liu-t, James Fells-t, Sue-Chin Lee-t, Alyssa Bolen-t, Mari Gotoh-t és Billy Valentine-t, akik egyben a barátaim is voltak. Mindnyájan kiváló kutatók és nagyszerű barátok, akiktől nagyon sokat tanultam tudományos és személyes értelemben is.

Nagyon sokat köszönhetek Sümegi Balázs professzor úrnak, aki lehetővé tette, hogy befejezzem a témámhoz kapcsolódó kutatásokat, segített a fokozatszerzési eljárás lebonyolításában és támogatott abban is, hogy minél több időt tölthessek újszülött kislányommal. Nagyra értékelem azt a barátságos és segítőkész légkört melyet kollégáim és barátaim a Sümegi professzor úr munkacsoportjából, többek között Bognár Eszter, Solti Izabella, Bartha Éva, Szabó Alíz, Lengyel Anna, Zalán Petra, Fekete Katalin, Jakus Péter, Berente Zoltán, Girán László, Horváth Bertalan és Sáfrány Ernő biztosítottak számomra az alatt a nehéz időszak alatt, amikor egyszerre kellett időt fordítanom a kutatásra, az oktatásra és újszülött kislányomra.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a férjemtől, Nagy Lórándtól kapott végtelen szeretetet, illetve köszönetet mondok a szüleimnek, Kiss Sándornak és Kiss Margitnak valamint a férjem szüleinek, Nagy Józsefnek és Nagy Anna Mária-nak mindazért a türelemért, megértésért, szeretetért és segítségért melyet a magánéletemben nyújtottak, és amely lehetővé tette számomra, hogy minél teljesebb mértékben koncentráljak kutatásaimra.

## 2. Rövidítések jegyzéke

Akt	protein kináz B
Bax	Bcl-2-asszociált X protein
CM	kondicionált médium
DKO	kettős géniütött
EC	hatékony koncentráció
ERK1/2	extracelluláris szignál regulált kinázok 1/2
G <sub>i</sub>	gátló G protein
GPCR	G proteinhez kötött receptor
GRI	Genome Research Institute
GRI977143	[2-((3-(1,3-dioxo-1 <i>H</i> benzo[de]izokinolin-2(3 <i>H</i> )-il)propil)tio)benzoe sav]
Gy	Gray (sugárzás mértékegysége)
H2L	Hit2Lead
H2L5547924	[4,5-dikloro-2-((9-oxo-9 <i>H</i> -fluorén-2-il)carbamoil)benzoe sav]
H2L5828102	[2-((9,10-dioxo-9,10-dihydroantracén-2-il)carbamoil)benzoe sav]
HUVEC	humán köldökzsínór véna endothél sejt
IEC-6	6-os patkány bélhám sejtvonal
LD	halálos dózis
LIM	Lin-11, Isl-1 és Mec-3 proteinek
LPA	lizofoszfátidsav
LPAR	LPA receptor
MEF	egér embrionális fibroblaszt sejt
MEK	mitogén aktivált protein kináz/extracelluláris szignál regulált kináz
MM1	patkány hepatoma sejt
NF $\kappa$ B	nukleáris faktor $\kappa$ B
NHERF2	Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> kicserélődést reguláló faktor 2
NSC12404	[2-((9-oxo-9 <i>H</i> -fluorén-2-il)karbamoil)benzoe sav]
OTP	oktadecenil tiofoszfát
PARP-1	poli (ADP-ribóz) polimeráz 1
PDZ	PSD95/Dlg/ZO-1 domén
PI3K	foszfatidil-inozitol 3-kináz
PPAR $\gamma$	peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma

PSD95	posztzinaptikus denzitás protein 95
QPCR	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció
TNF- $\alpha$	tumor nekrosis faktor $\alpha$
TRIP6	thyroid receptor kölcsönható protein 6
UC-DDC	University of Cincinnati Drug Discovery Center
U937	humán monocita limfóma sejt vonal

### 3. Bevezetés

A lizofoszfátidsav (LPA) specieszek számos alapvető sejtes választ szabályoznak, többek között a sejtek túlélését, szaporodását, motilitását és migrációját. Biológiai hatásait specifikus G proteinhez kötött sejtmembrán receptorokon (GPCR; LPA receptor 1-6, LPAR 1-6) és a nukleáris peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gammán (PPAR $\gamma$ ) keresztül fejtik ki (Tigyi, 2010).

Az LPA-hoz kötődő jelátviteli folyamatok zavarait számos humán megbetegedés patogenezisével hozták összefüggésbe. Kimutatták, hogy az LPA<sub>1</sub> és az LPA<sub>3</sub> receptorok szívérrendszeri aktivációja befolyásolja a szívizomsejtek kontraktilitását (Cremers et al., 2003) és szívizom hipertrófiához vezet (Chen et al., 2008). Az LPA<sub>2</sub> és az LPA<sub>3</sub> receptorok aktiválásán keresztül az LPA elősegíti a tumorsejtek invázióját, a metasztázisok kialakulását és az angiogenezist (Kato et al., 2012; Pustilnik et al., 1999), míg az LPA<sub>1</sub> receptor aktivációja gátolja ezeket a folyamatokat (Yamada et al., 2009). Különböző tanulmányok összefüggést mutattak ki az LPA<sub>1</sub> receptor aktivációja valamint a szervfibrózis (Tager et al., 2008), a neuropátiás fájdalom (Inoue et al., 2004) és az oszteoarthritisz (Mototani et al., 2008) kialakulása között, az LPA<sub>1</sub> receptor hiánya és a skizofrénia (Harrison et al., 2003) kialakulása között, illetve rávilágítottak az LPA<sub>2</sub> receptor gátló hatására kolera toxin indukálta szekretoros hasmenésben (Li et al., 2005).

Az egyes LPA receptorok felfedezése, valamint a receptor-altípus szelektív agonisták és antagonisták kifejlesztésére irányuló törekvések elősegítették az LPA-hoz kapcsolódó jelátviteli folyamatok megértését és felvetették az LPAR farmakoterápiás befolyásolásának lehetőségét (Im, 2010). A ligand kötött GPCR kristályszerkezetek hiánya ellenére, a mutagenézist és a számítógépes szerkezeti analízist kombináló tanulmányok számos LPAR agonista és antagonistá jelölt kifejlesztéséhez vezettek (Im, 2010). Az LPA alapú gyógyszerjelöltek kifejlesztése a lipid természetű ligandumokra korlátozódott, amely teljesen érthető a GPCR ligandkötő helyek hidrofób környezetének ismeretében (Valentine et al., 2008). Mindössze néhány nem-lipid LPAR ligandum ismeretes, melyek közül az LPA<sub>1/2/3</sub> antagonistá Ki16425 (Ohta et al., 2003) és az LPA<sub>1</sub> szelektív AM095-152 vegyületcsalád bír jelentőséggel (Swaney et al., 2011).

Már egy évtizeddel ezelőtt kimutattuk, hogy az LPA jelentős apoptózist megelőző hatással bír illetve az apoptotikusan elkötelezett sejteket is megvédi az apoptotikus kaszkád progressziójától (Deng et al., 2002; Deng et al., 2007). Kifejlesztettünk egy hosszú hatású LPA analógot, az oktadecenil tiofoszfátot (OTP; Durgam et al., 2006), mely az LPA-nál *in vitro* és *in vivo* is sokkal hatékonyabb, és védi a sejteket és a kísérleti állatokat a besugárzás indukálta apoptózissal szemben (Deng et al., 2007). Sejtes modellben az LPA és az OTP azon túl, hogy kivédtek a besugárzás indukálta apoptózist, a besugárzás előtt alkalmazva, úgynevezett sugárzás enyhítő (radiomitigating) hatással is rendelkeztek, azaz megvédték az apoptotikusan elkötelezett sejteket a besugárzást követő két óra után alkalmazva is (Deng et al., 2002). Túlélést elősegítő hatásukat az LPA és OTP az LPA<sub>2</sub> receptoron keresztül fejtették ki. Annak ellenére, hogy az OTP nagyon hatékonyan bizonyult az akut sugárbetegség kivédésében kísérleti állatmodellen, a gyógyszer fejlesztés szempontjából nézve lipid szerkezete, az optimálisnál alacsonyabb megoszlási hányadosa, valamint az LPA receptor-altípus iránti specificitás hiánya hátrányt jelent. Pán-agonista tulajdonsága gyengítheti az OTP

antiapoptotikus hatékonyságát olyan sejtek esetén, melyeken az LPA<sub>1</sub> és LPA<sub>2</sub> receptorok egyidejűleg expresszálódnak, mivel az LPA<sub>1</sub>-ről leírták, hogy aktivációja apoptózishoz vezethet anoikis sejthalál által (Funke et al., 2012).

Kutatócsoportunk olyan metabolikusan stabil LPA analógok kifejlesztésén dolgozott melyek az LPA receptorok által közvetített túlélésért felelős jelátviteli folyamatokat tartósan aktiválják. Ezek a kutatások az LPA<sub>2</sub> receptor egy olyan korábban fel nem ismert szerepére világítottak rá, miszerint a C-terminális részén található egyedülálló szekvencia motívumokon keresztül egy makromolekuláris jelátviteli komplex központi részét képezi (E et al., 2009; Lin et al., 2007). Felfedeztük, hogy az LPA<sub>2</sub> receptor egy C<sub>311</sub>xxC fél cinkujj-szerű motívumon keresztül megköti a Lin-11, Isl-1 and Mec-3 (LIM) fehérjecsaldához tartozó Siva-1 proapoptotikus fehérjét, majd az így létrejött komplex kivonódik a GPCR körforgásból, poliubikvitinálódik és lebomlik a proteozómában (Lin et al., 2007). Egy ezt követő tanulmányban meghatároztuk, hogy az LPA<sub>2</sub> GPCR ternár komplexet képez két másik PSD-95, DlgA, és ZO-1 (PDZ) kötő domént tartalmazó fehérjével, a thyroid receptor kölcsönható protein 6-al (TRIP6) és a Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> kicserélődést reguláló faktor 2-vel (NHERF2). Az LPA<sub>2</sub> – TRIP6 – 2x(NHERF2)-ből felépülő ternár komplex a GPCR LPA-val történő stimulációját követően alakul ki és az LPA<sub>2</sub> receptor antiapoptotikus hatásához szükséges túlélést elősegítő jelátviteli útvonalak, a mitogén aktivált protein kináz/extracelluláris szignál regulált kináz (MEK)-extracelluláris szignál regulált kinázok 1/2 (ERK1/2), valamint a foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K)-protein kináz B (Akt)-nukleáris faktor κB (NFκB) útvonalak fokozott és hosszantartó aktivációjához vezet (E et al., 2009). Az LPA<sub>2</sub> receptor aktivációját követő ternár komplex képződés kivételes szerepet játszik a kemorezisztenciában (Tigyi et al., 2010).

## 4. Kutatási célkitűzések

- 4.1 Új, nem-lipid természetű, az LPA<sub>2</sub> receptor-altípusra specifikus, gyógyszer jellegű vegyületek azonosítása:
- 4.1.1 Az NSC12404, [2-((9-oxo-9H-fluorén-2-il)karbamoil)benzoe sav], egy véletlenszerűen azonosított, gyenge LPA<sub>2</sub> receptor agonista molekula azonossági szűrővizsgálata az University of Cincinnati Drug Discovery Center (UC-DDC) kémiai adatbázisában.
  - 4.1.2 Az új, nem-lipid LPA<sub>2</sub> agonista analógok kísérletes jellemzése az LPA<sub>1-5</sub>, GPR87, és P2Y10 receptorokon, stabil az egyes LPA receptorokat egyénileg expresszáló sejtvonalakon, illetve vektor transzfektált kontrol sejteken, receptor mediált Ca<sup>2+</sup> mobilizációs esszé segítségével.
- 4.2 A vezérmolekula sejtnövekedésre gyakorolt hatásának meghatározása LPA<sub>1</sub> és LPA<sub>2</sub> kettős kiűtött (DKO) egérből származó vektor és LPA<sub>2</sub> receptorral transzfektált egér embrionális fibroblaszt (MEF) sejteken.
- 4.3 A vezérmolekula tumorsejt invázióra gyakorolt hatásának meghatározása invazív patkány hepatoma sejt (MM1) és egyrétegű humán köldökzsínór véna endothél sejt (HUVEC) kultúrák felhasználásával.
- 4.4 A kiválasztott nem-lipid természetű LPA<sub>2</sub> agonista antiapoptotikus hatásainak jellemzése különböző intrinszik és extrinszik apoptózis modellek segítségével:
- 4.4.1 A vezérmolekula antiapoptotikus hatékonyságának meghatározása Adriamicin és szérummegvonás indukálta apoptózis modellekben, LPA<sub>1</sub> és LPA<sub>2</sub> DKO egérből származó vektor és LPA<sub>2</sub> receptorral transzfektált MEF sejteken, Bcl-2-asszociált X protein (Bax) transzlokációt, kaszpáz 3, 7, 8, 9 aktivációt, poli (ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP-1) hasítást és DNS fragmentációt detektáló esszék alapján.
  - 4.4.2 A vezérmolekula antiapoptotikus hatékonyságának meghatározása tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) által indukált apoptózis modellben, 6-os patkány bélhám sejtvonalon (IEC-6), DNS fragmentációs esszé alapján.
- 4.5 A kiválasztott nem-lipid LPA<sub>2</sub> agonista sugárzás enyhítő hatásának jellemzése *in vitro* és *in vivo*:
- 4.5.1 A vezérmolekula sugárzás enyhítő hatékonyságának meghatározása  $\gamma$ -sugárzás indukálta apoptózis modellben, LPA<sub>1</sub> és LPA<sub>2</sub> DKO egérből származó vektor és LPA<sub>2</sub> receptorral transzfektált MEF sejteken, Bax transzlokációt, kaszpáz 3, 7, 8, 9 aktivációt, PARP-1 hasítást és DNS fragmentációt detektáló esszék alapján.
  - 4.5.2 A vezérmolekula antiapoptotikus hatékonyságának meghatározása  $\gamma$ -sugárzás indukálta úgynevezett szomszédási (bystander) apoptózis modellben, besugározatlan IEC-6 sejtek és besugározott humán monocita limfóma sejt vonaltól (U937) származó kondicionált médium (CM) felhasználásával, kaszpáz 3 és 7 aktiváció alapján.

- 4.5.3 A vezérmolekula sugárzás enyhítő hatékonyságának meghatározása hemopoetikus akut sugárbetegségben, 6.6 Gray (Gy) teljes test  $\gamma$ -sugárdózisnak ( $\sim$  halálos dózis, LD<sub>100/20</sub>) kitett C57BL6 egereken.
- 4.5.4 A vezérmolekula  $\gamma$ -sugárzásnak kitett sejtek malignus transzformációra gyakorolt hatásának meghatározása LPA<sub>1</sub> és LPA<sub>2</sub> DKO egérből származó LPA<sub>2</sub> receptorral transzfektált MEF sejteken puha agar esszé alapján.
- 4.6 A kiválasztott nem-lipid LPA<sub>2</sub> agonista által aktivált túlélést elősegítő jelátviteli útvonalak jellemzése:
- 4.6.1 A vezérmolekula indukálta ERK1/2 aktiváció meghatározása LPA<sub>1</sub> és LPA<sub>2</sub> DKO egérből származó vektor és LPA<sub>2</sub> receptorral transzfektált MEF sejteken, immunoblot analízis alapján.
- 4.6.2 Az LPA<sub>2</sub>, a TRIP6 és a NHERF2 között a vezérmolekula hatására kialakuló ligand indukálta szupramolekuláris komplex képződés meghatározása *in vitro* kötési kísérlet és immunoblot analízis alapján.



## 5. Diskusszió és következtetések

Előző munkánk során, melynek célkitűzése az LPA<sub>1</sub> specifikus vegyületek virtuális keresése volt, véletlenszerűen azonosítottuk az NSC12404-et, amely egy gyenge de specifikus LPA<sub>2</sub> agonista (Perygin, 2010). Jelen tanulmányunkban ezt a vegyületet használtuk fel az UC-DCC kémiai adatbázisának virtuális szűrésére. Ez a megközelítés három új, szelektív nem-lipid természetű LPA<sub>2</sub> agonista találatot eredményezett: a GRI977143-t [2-((3-(1,3-dioxo-1H-benzo[de]isokinolin-2(3H)-il)propil)tio) - benzoe sav], a H2L5547924-t [4,5-dikloro-2-((9-oxo-9H-fluorén-2-il)karbamoil) benzoe sav], és a H2L5828102-t [2-((9,10-dioxo-9,10-dihidroantracén-2-il)karbamoil) benzoe sav]. A receptor mediálta Ca<sup>2+</sup> mobilizációs esszék alapján 10 µM koncentrációig alkalmazva az NSC12404, a H2L5547924, a H2L5828102, és a GRI977143 egyedül az LPA<sub>2</sub> receptort aktiválta az általunk tesztelt igazolt és feltételezett LPA GPCR-ok közül. Az említett vegyületek 10 µM koncentrációinak feltételezett gátló hatását teszteltük az LPA 18:1 ~EC<sub>75</sub> koncentrációja által kiváltott Ca<sup>2+</sup> válaszra azokon a receptorokon melyeket a vegyületek 10 µM koncentrációja nem aktivált. Eredményeink alapján az NSC12404 és a GRI977143 ebben a magas koncentrációban gátolta az LPA<sub>3</sub> receptort, ugyanakkor a többi általunk tesztelt receptorra sem aktiváló sem gátló hatást nem fejtett ki. A H2L5547924 aktiválta az LPA<sub>2</sub>-t de részlegesen gátolta az LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>3</sub>, LPA<sub>4</sub>, GPR87, és P2Y10 receptorokat. A H2L5828102 szintén az LPA<sub>2</sub> specifikus agonistájának bizonyult, de teljesen gátolta az LPA<sub>3</sub>-t és részlegesen gátolta az LPA<sub>1</sub>, GPR87 és P2Y10 receptorokat. Mivel alacsonyabb EC<sub>50</sub> koncentrációban aktiválta az LPA<sub>2</sub> receptort, mint az NSC12404 illetve a H2L vegyületekkel összehasonlítva egyedül az LPA<sub>3</sub> receptort gátolta ezért a további sejt alapú vizsgálatainkhoz a GRI977143-t választottuk.

Jelen munkánk során kimutattuk, hogy az LPA<sub>2</sub> receptor-altípus specifikus aktivációja elősegíti a sejtnövekedést. Ez az első farmakológiai bizonyítéka annak, hogy ez a receptor-altípus mitogenezist közvetít. Meglepő módon az LPA receptor pán-agonista OTP valamint a GRI977143 egyforma erősen serkentette a sejtproliferációt. Megfigyeltük, hogy három nap elteltével az OTP és a GRI977143 a vektor transzfektált MEF sejtek proliferációját is elősegítette, valószínűleg másodlagos, úgynevezett off-target hatásokon keresztül. Nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét sem, hogy az OTP és a GRI977143 valamilyen módon erősítette a sejtes médiumban található 1.5% szérum hatását. Előfordulhatnak farmakokinetikai eltérések a két ligand között, melyek magyarázhatják az általunk tapasztalt különbségeket. A két ligand hatására a sejtnövekedésben bekövetkezett eltérések hátterének megismeréséhez további kísérletek szükségeltetnek.

Az LPA-ról kimutatták, hogy elősegíti a tumorsejtek invázióját és a metasztázis képződést (Kato et al., 2012; Pustilnik et al., 1999). Megvizsgáltuk a GRI977143 hatását egy *in vitro* inváziós modellben, mely egy valóság-hú metasztázist modellező esszének számít (Mukai et al., 2005; Uchiyama et al., 2007). MM1 hepatokarcinóma sejtek stimulációja GRI977143-vel dózisfüggő módon fokozta az egyrétegű HUVEC sejtpopuláción áthatoló MM1 sejtek számát. Ugyanakkor, a 10 µM GRI977143 hatása szerénynek bizonyult az LPA hatásához képest. Kvantitatív RT-PCR alapján az MM1 sejtek az LPA<sub>2</sub> >> LPA<sub>1</sub> > LPA<sub>6</sub> > LPA<sub>5</sub> > LPA<sub>4</sub>, míg a HUVEC sejtek az LPA<sub>5</sub> >> LPA<sub>4</sub> > GPR87 ~ LPA<sub>1</sub> > LPA<sub>2</sub> receptorokat expresszálják (Lee és Tigyi – nem publikált adatok). A GRI977143 által

indukált fokozott MM1 sejt invázió hátterében valószínűleg inkább az MM1 semmint a HUVEC sejteken található LPA<sub>2</sub> receptorok szelektív stimulációja áll, hiszen a HUVEC sejteken ezen receptor-altípus expressziója nagyon alacsony (Gupte et al., 2011).

Az LPA<sub>2</sub> receptor szerepét a sejtek apoptózis elleni védelmében már számos tanulmány igazolta (Deng et al., 2002; E et al., 2009; Lin et al., 2007). A GRI977143 LPA<sub>2</sub> specifikus agonista tulajdonságai lehetővé tették, hogy teszteljük ezt a hipotézist LPA<sub>2</sub> génbejuttatott MEF sejteken valamint IEC-6 sejteken, melyek közül az utóbbiak endogén módon expresszálnak számos LPA GPCR-t (Deng et al., 2002; Deng et al., 2007). Kísérleteink azt mutatták, hogy az LPA<sub>2</sub> receptor aktiválásán keresztül, a GRI977143 hatékonyan csökkenti az Adriamicin, a szérummegvonás és a  $\gamma$ -sugárzás indukálta intrinzik apoptózissal összefüggő citoszolikus Bax transzlokációt, iniciátor és effector kaszpáz aktivációt, DNS fragmentációt és PARP-1 hasítást. A vektor transzfektált sejtekre a GRI977143 nem volt hatással, leszámítva egy minimális DNS fragmentáció csökkentő hatást az Adriamicin által indukált apoptózis modellben, amely a vegyület egy még ismeretlen másodlagos hatásának következménye lehet. A szérummegvonás, illetve a  $\gamma$ -sugárzás indukálta apoptózis modellekben a GRI977143 ehhez hasonló hatása nem volt detektálható. Ugyanakkor megfigyeltük azt, hogy ellentétben a GRI977143-vel, az LPA és az OTP enyhe védő hatást fejtett ki a vektor transzfektált MEF sejtekre. A kvantitatív RT-PCR analízis kimutatta, hogy az LPA<sub>1</sub> és LPA<sub>2</sub> DKO egér embriókból származó MEF sejtek jelentős mennyiségű LPA<sub>4/5/6</sub> és P2Y<sub>10</sub> receptort expresszálnak, amely magyarázhatja az LPA és OTP antiapoptotikus hatását. Fontos felismerni azt is, hogy a GRI977143 az IEC-6 sejteket is megvédte az apoptózistól, melyek endogén módon expresszálnak több különböző LPA GPCR-altípust. Az irodalmi adatok alapján ez az eredmény az első bizonyítéka annak, hogy az LPA<sub>2</sub> specifikus aktivációja elegendő egy antiapoptotikus hatás kiváltásához és ez a hatás nem korlátozódik az LPA<sub>2</sub> génbejuttatott MEF sejtekre. Mindezek alapján felvetjük, hogy az LPA<sub>2</sub> specifikus aktivációja elegendő ahhoz, hogy a sejteket megvédje az apoptózistól. A GRI977143 specifikus agonista tulajdonságai előnyt jelenthetnek az LPA-val illetve más nem receptor szelektív LPA analóggal szemben, melyek az LPA<sub>1</sub> receptort is aktiválhatják, amelyről kimutatták, hogy tumor sejteken (Furui et al., 1999), szívizomsejteken (Chen et al., 2006) és pulmonális epithel sejteken (Funke et al., 2012) elősegítheti a sejthalált anoikis révén.

Megvizsgáltuk az LPA és a GRI977143 hatását egy *in vitro*, sugárzás indukálta szomszédsági apoptózis modellben is. Ennek a modellnek az LPA analógok sugárzás enyhítő hatása miatt van jelentősége, hiszen az állatkísérletekben az LPA analógok a besugárzást követő első 24 órában, azaz a sugárzás indukálta apoptózis első hulláma alatt nem voltak jelen. Mindemellett a GRI977143 vagy az OTP (Deng et al., 2007) alkalmazása a besugárzást követő 24 óra elteltével hatékonyan elősegíti a kísérleti állatok túlélését. Feltételezzük, hogy a szövetekben található GRI977143 által aktivált LPA<sub>2</sub> receptorok  $\gamma$ -sugárzás elleni védő hatása részben a szomszédsági hatás csökkentésén keresztül nyilvánult meg, mely a besugárzást követő 24-48 óra elteltével jelentkezik és kialakulásában valószínűleg az *in vitro* modellünkben (Kim et al., 2008) szereplő besugárzott U937 sejtek CM-ban fellelhető faktorokhoz hasonló ágensek felelősek. A GRI977143-el kapott eredményeink a különböző  $\gamma$ -sugárzás indukálta károsodás modellekben következetesen azt sugallják, hogy ez a vegyület sugárzás enyhítő hatást fejt ki és képes az apoptotikusan elkötelezett

sejtek megmentésére *in vitro* és *in vivo*. Ebben az összefüggésben meglepve tapasztaltuk, hogy a GRI977143 kezelés nem fokozta a besugárzott, majd megmentett MEF sejtek malignus transzformációját. Ez a megfigyelés, bár *in vivo* igazolást igényel, már most felveti annak a lehetőségét, hogy a GRI977143-vel kezelt sejtek képesek voltak DNS károsodásaik kijavítására, melyek egyébként nagymértékű transzformációhoz vezettek volna a puha agar esszé alapján.

Az ERK1/2 sejt túlélést elősegítő kinázok LPA<sub>2</sub> függő aktivációja egy szükséges lépés az antiapoptotikus jelátvitel során (E et al., 2009; Lin et al., 2007). A korábbi, LPA-val és OTP-vel kapott eredményeinkkel összhangban (Deng et al., 2007; E et al., 2009; Lin et al., 2007), a GRI977143 kezelés nagymértékű ERK1/2 aktivációhoz vezetett. Korábban kimutattuk, hogy a pertussis toxin érzékenység által demonstrált Gi protein mediálta szignálok túlmenően (Deng et al., 2002), az LPA<sub>2</sub> függő antiapoptotikus hatáshoz egy LPA<sub>2</sub>-t, TRIP6-t és NHERF2 homodimért tartalmazó, C-terminális makromolekuláris komplex felépülése is szükséges (E et al., 2009; Lin et al., 2007). Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a GRI977143 elősegítette a szignáloszóma felépülését, amely magyarázhatja a velejáró nagymértékű ERK1/2 aktivációt.

Mindent egybevetve, a jelenlegi eredmények azt mutatják, hogy a nem-lipid LPA<sub>2</sub> specifikus agonisták, mint amelyeket tanulmányunkban mi is bemutatunk nagyon jó kiindulási alapot jelentenek olyan vegyületek kifejlesztéséhez, melyek sugárzás enyhítő hatással rendelkeznek, és terápiás szerepük lehet az apoptotikus sejthalál megelőzésében számos degeneratív és gyulladásoos betegségben.

## 6. A tudományos eredmények összefoglalása

- 6.1 Olyan új, nem-lipid természetű vegyületeket azonosítottunk (GRI977143, H2L5547924, és H2L5828102), melyek az LPA<sub>2</sub> receptor specifikus agonistái és nem aktiválják az LPA<sub>1/3/4/5</sub>, GPR87 illetve P2Y<sub>10</sub> GPCR-okat.
- 6.2 Vezérmolekulánk, a GRI977143 bár kevésbé potens, de ugyan olyan hatékonyan védi a sejteket a különböző intrinszik és extrinszik apoptózis modellekben in vitro mint az LPA és az OTP.
- 6.3 A GRI977143 elősegíti a humán köldökzsinór véna endothél sejtek karcinóma sejt invázióját és a fibroblaszt proliferációt, ugyanakkor nem okoz malignus transzformációt a besugárzott, majd megmentett MEF sejteken.
- 6.4 A GRI977144 sugárzás enyhítő tulajdonságokkal bír:
  - 6.4.1 Megmenti az apoptotikusan elkötelezett sejteket in vitro a nagy dózisú  $\gamma$ -sugárzás okozta károsodástól, a besugárzást követő egy óra elteltével alkalmazva.
  - 6.4.2 Hatékonyan elősegíti a halálos sugárdózisnak kitett egerek túlélését a besugárzást követő 24 óra elteltével alkalmazva.
- 6.5 A GRI977143 gátolja a besugárzott sejtek által termelt szolubilis, proapoptikus mediátorok indukálta szomszédsági apoptózist.
- 6.6 Az LPA<sub>2</sub> receptorok specifikus aktiválásán keresztül a GRI977143 erőteljesen aktiválja az ERK1/2 túlélési útvonalat és egy az LPA<sub>2</sub>-t, TRIP6-t és NHERF2-t tartalmazó makromolekuláris szignálszóma felépüléséhez vezet, mely szükséges ezen receptor-altípus antiapoptikus hatásához.