

PhD értekezés tézisei

**Stressz-aktivált jelátviteli utak szerepe és szabályozása PC12
patkány phaeochromocytoma sejtekben**

Törőcsik Beáta

Témavezető: Szeberényi József

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Biológiai Intézet**

Pécs, 2000

Tudományos háttér

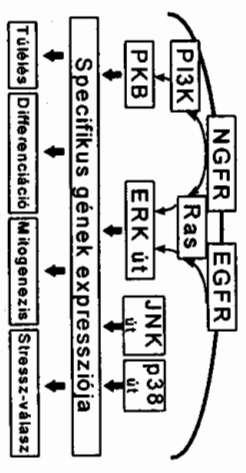
Az eukaróta sejtek normális fejlődésük és túlélésük érdekében számos külső ingerre válaszolnak. Egyes ingerek kiválthatnak sejtosztódást, növekedést, mások differenciációt vagy apoptózist. A válaszok háttérében gyakran génextpressziós változások állnak, a jel eljutása a membrántól a sejtimagig és a sejtimagban történő folyamatok vizsgálata az elmúlt negyed század sejtbiológiájának egyik legfontosabb eseménye volt, bár a részletek ma sem teljesen tisztázottak. A normális sejtjelátvitelének felderítése nem csak azt segít megérteni, hogyan válaszolnak a sejtek extracelluláris jelekre, de információt nyújthat arról is, milyen molekuláris biológiai elváltozások állnak bizonyos betegségek háttérében. A leggyakrabban alkalmazott leírás a jelátviteli utakat biokémiai események kaszkádjáinak mutatja be, amelyek hasonló szerkezetűek de eltérő funkciójúak, egymással párhuzamosan futnak, kapcsolódnak, konvergálnak és divergálnak. Az utakat gyakran egyik központi enziműkről, a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) családd egyik tagjáról nevezik el. A sejtet érő stresszválasz által aktivált jelátviteli utak közé tartozik a stressz-aktiválta protein kináz (SAPK)/c-Jun N terminális kináz (JNK) út és a p38 MAPK út. Munkánk során ezeknek a stressz-aktiválta utaknak a szerepét vizsgáltuk, kísérleteinket PC12 sejtvonalon és ezen sejtvonal szubklónjain végeztük.

APC12 sejtek jelátvittele

A neurotrof hormonok, mint például az idegsejt növekedési faktor (NGF), számos hatást kifejtenek célsejtjeiken, mint proliferáció, differenciáció, neurit növekedés, plaszticitás, repair, túlélés. A legtöbb NGF-re válaszoló sejtvonal NGF hiányában nem marad életben, így nem alkalmas a faktor adása előtti és az adás utáni jelátviteli mechanizmusok összehasonlítására. A patkány phaeochromocytomából nyert PC12 sejtvonal NGF hiányában is osztódik, széles körben használta a neuronális differenciáció, proliferáció és apoptózis molekuláris mechanizmusának vizsgálatára. A naív, kezelésben nem részesült PC12 sejtek kromaffin jellegűek: kis méretű, kerek vagy poligonális, nyúlvány nélküli sejtek. NGF kezelést követően néhány óra múlva neuritokat kezdenek növeszteni és pár nap alatt teljesen differenciált, szimpatikus jellegű neuronokká alakulnak át.

Míg a PC12 sejtek életben maradásukhoz nem igényelnek neurotrofinokat, a szérumhatás hatására bekövetkező apoptózis kivédhető NGF-el. A PC12 sejtvonal tehát kitűnő modell rendszert szolgáltat mind a differenciációs, mind a túlélési szignál transzdukció tanulmányozására.

Az NGF hatását két sejtfelszíni receptoron keresztül fejti ki, ezek a nagy affinitású (NGFRT/TrkA) és a kis affinitású NGF receptor (p75^{N^{tr}}). Az NGF nagy affinitású receptora az NGF kötődését követően autofoszforilálódik és a foszforilált tirozinok adapter molekulákat vonzanak magukhoz. Rajtuk keresztül számos párhuzamos, de egymással és más faktorok által aktivált jelátviteli utakkal több helyen kapcsolódó szignalizációs kaszkád indul el a sejt belseje felé. Az aktivált fehérjék közé tartozik az NGF antiapoptotikus útvágban szerepet játszó foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K), és a neuronális differenciációban központi szerepet játszó Ras (1. ábra).



1. ábra: Növekedési/faktor- és stressz-jelátviteli PC12 sejtekben

Mitogén-aktivált protein kináz kaszkádok

Az elsőként leírt és jellemzett Ras/Raf/MEK/ERK út mellett az utóbbi időben több, hasonló felépítésű jelátviteli kaszkádokat találtak. Ilyenek a MEKK/SEK/JNK és az MKK/p38 utak, melyek elsősorban a sejtet érő stressz hatásokra adott válaszként felelősek. Az ERK, JNK és p38 egy jelátviteli központi szerepet játszó kináz család, a mitogén aktiválta protein kinázok (MAPK) tagjai (2. ábra).

Stimulus	Növekedési faktorok	Sejtet érő stressz, gyulladási citokinek	???	Szérum, stressz
MAPKKK	Mos Raf TPL2	TPL2 MEKK MILKDLK TAK	???	???
↓	↓	↓	↓	↓
MAPKK	MEK1/2	MKK 4/7	???	MKK 5
↓	↓	↓	↓	↓
MAPK	ERK 1/2	JNK	p38 MAPK	ERK 3 ERK 5
↓	↓	↓	↓	↓
Válasz	Proliferáció Differenciáció Fejlődés	Gyulladás Apoptózis Fejlődés	???	???

2. ábra: MAPK-kaszkádok és biológiai jelentőségük

A JNK- és p38 út szerepe a PC12 sejtek szabályozásában még nem pontosan ismert. Bár az NGF aktiválja ezeket az enzimeket, az NGF visszavonása szintén elnyújtott aktivációjukhoz vezet. Ezek alapján mind a differenciációban, mind az apoptózisban valószínűsíthetjük a stressz aktiválta utak szerepét.

A stressz-aktivált jelátviteli utak PC12 sejtekben történő vizsgálatára a fehérjeszintézis gátló anizomicint alkalmaztuk.

Anizomicin

Az anizomicin az eukarióta transzlációt gátló szer, de fehérjeszintézist még nem gátló, nem toxikus koncentrációjában is képes jelátviteli folyamatok serkentésére: aktiválja mind a JNK, mind a p38 utat. A szer szignáltranszdukciós hatásainak elemzése tehát alkalmasnak látszik a stressz-utak biológiai jelentőségének tanulmányozására.

Céltűzések

Mind a neuronális differenciáció, mind az apoptózis alapvető celluláris jelenségek az idegrendszer fejlődésében. A háttérükben álló molekuláris jelenségek megértése közelebb visz bennünket a hibás mechanizmusok felismeréséhez. Új diagnosztikus és terápiás lehetőségeket nyújthat az idegrendszer érintett betegségekben, mint a Parkinson kór vagy az Alzheimer betegség. Kísérleteink célja az volt, hogy felférképezzük a PC12 sejtekben stresszhelyzetben fellépő jelátviteli folyamatokat.

1. Kísérleteink segítségével megpróbáltuk azonosítani az alacsony koncentrációjú, fehérjeszintézist nem gátló anizomicin-kezelés által aktivált jelátviteli utakat PC12 sejtekben. Részletesen vizsgáltuk az anizomicin MAPK kaskádokra és a kináz kaskádokon keresztüli korai és késői géningdukcióra kifejtett hatását.
2. Anizomicin segítségével tanulmányoztuk a stressz aktiválta kinázok biológiai szerepét a neuronális differenciációban.
3. A stressz aktiválta kinázok számos, PC12 sejtekben apoptózist okozó ágens hatására aktiválódnak, az aktiváció gátlása antiapoptotikus hatású. Kísérleteinkben vizsgáltuk a fehérjeszintézist nem gátló, de stressz utakat aktiváló anizomicin hatását az apoptózisra.
4. A fehérjeszintézis gátlók apoptózisban játszott szerepe ellenmondásos. Céluł tűztük ki az anizomicinen keresztül a PC12 sejtek apoptózisa és a fehérjeszintézis gátlása közti kapcsolat tisztázását, azon jelátviteli fehérjék azonosítását, melyek expressziójának vagy működésének csökkenése felelős lehet az apoptózis kiváltásáért.

Alkalmazott anyagok és módszerek

Sejtülturák

Murkánk során a jelátviteli folyamatok egyik, már klasszikusnak számító sejtvonalat, a PC12 sejtvonalat használtuk. Az M-M17-26 sejtvonalt olyan PC12 szubklón, ami domináns negatív mutáns Ras fehérjét expresszál. Ezekben a

sejtekben a normális Ras fehérje működése gátolt. A PC12 *nr5* sejtvonalt az NGF receptorok közül csak a kis affinitásút expresszálja.

A neuronális differenciáció vizsgálata

A neuronális differenciáció kritériumának azt tekintettük, ha a kültetéskor differenciálatlan, kerekded PC12 sejtek a sejtátmérőjüket meghaladó hosszúságú neuritokat növesztettek.

A fehérjeszintézis vizsgálata [³H]leucin beépülés méréseivel

A sejteket 16 órán keresztül kezeltük alacsony (10 ng/ml) illetve magas (1000 ng/ml) koncentrációjú anizomicinnel. Ezt követte a 3 óráos [³H]leucin jelölés, amely szérumentes médiumhoz adott radioaktívan jelzett leucinmal történt. A [³H]leucin beépülést tritocerecepsavas filter precipitációval igazoltuk.

DNS fragmentáció vizsgálata

Apoptózis tesztként az internukleoszomális DNS darabolódás kimutatását alkalmaztuk. A fragmentumok szétválasztását 1,8%-os agaróz gélelektroforézissel végeztük. A láthatóvá tétel kétféle módon történt: vagy etidium bromiddal festettük a gél, vagy átblóítottuk, és a membránon kötődött DNS fragmentumokat radioaktívan jelölt EcoRI-el emesztett teljes DNS-el hibridizáltuk. A hibridizációt Cytosine Phosphor Imagerrel detektáltuk.

Northern blot analízis

A teljes citoplazmatikus RNS izolálása, az elektroforézis formaldehidet tartalmazó agaróz géiben, és a hibridizáció ³²P-jelölt próbával történt. Az alkalmazott próbák korai válasz génekre a c-fos, c-jun, zif268, késői válasz géne a tranzsin voltak.

Western blot analízis

A fehérje extraktumok izolálása az antitesteket gyártó cég leírása alapján történt (New England Biolabs, USA). Az SDS poliakrilamid gélelektroforézist követően a fehérjéket ECL membránra biotoltuk át. Ezen a membránon történt

az első és második antitest kötődése. Az immunkomplexeket kemilumineszcenciás detektáló kit és röntgenfilm-expozíció segítségével azonosítottuk.

Elektroforetikus mobility shift analízis

A fehérje-DNS komplexeket nem denaturáló poliakriamid gélen választottuk el a nem kötődött oligonukleotidoktól. A gélt megszártítottuk és a fehérje-oligonukleotid komplexeket Cyclone Phosphor Imagerrel detektáltuk.

JNK immunkomplex kináz analízis

A sejltizátumokból a JNK-1 JNK ellenes antitesttel és ProteinA-Sepharose gyöngyökkel immunprecipitáltuk. A kináz aktivitás mérése GST-c-Jun (1-79) fúziós fehérje szubsztáttal és γ - 32 P]ATP-vel történt. A reakcióelegyeket 10%-os SDS poliakriamid gélen választottuk szét és Cyclone Phosphor Imagerrel analizáltuk.

Akt kináz analízis

Az Akt fehérje aktivitásának mérését Akt kináz kit (New England Biolabs, USA) segítségével végeztük. A sejlextraktumokból agaróz gyöngyökhöz kötött anti-Akt antitesttel immunprecipitáltuk az Akt kinázt. A kináz aktivitás meghatározására GSK-3 szubsztátot használtunk. A foszforiláció kimutatására foszforilált GSK-3 fehérje ellenes antitesttel Western blotot végeztünk.

Eredmények

A JNK- és a p38-út szerepe a neuronális differenciációban és géneexpresszióban

Kísérleteink első részében fehérjesszintézis gátló koncentráció alatti (szubinhibitoros), a sejtekre nem toxikus koncentrációban (1-10 ng/ml) alkalmaztuk az anizomicint. Anizomicin kezeléssel gátolni tudtuk az NGF által kiváltott neuronális differenciációt és a differenciáció folyamatával közvetlen kapcsolatban álló késői géinindukciót. Ez arra utal, hogy a stressz-aktívált kináz kaszkád serkentése gátolja a neuronális differenciációt, hatása ellenértés az

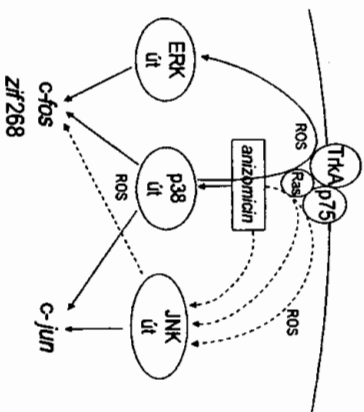
ERK út aktivációjával. Ugyanakkor az anizomicin-kezelés is indukálta az NGF által aktivált korai válasz géneket, sőt, még szinergizmust is mutatott az NGF-fel, ami alátámasztja azt a megfigyelést, hogy a korai gének aktivációja nem elegendő a differenciáció létrehozásához. Megvizsgálva a korai válasz gének indukciójának Ras-függését, azt találtuk, hogy az anizomicin a domináns negatív Ras fehérjét expresszáló M-M17-26 szubklónban változatlanul indukálja a *c-jun*-t, míg a *c-fos* és a *zif268* indukciója részleges gátlást mutatott. Így, szemben az NGF jelátvitelével, melyben a korai válasz gének indukciója Ras-függő, az anizomicin jelátvitelében egy Ras-függő és egy Ras-független komponenst is megkülönböztethetünk. Megvizsgálva ezen korai válasz gének promotert, a *c-jun* csak AP-1 helyet tartalmaz, míg a *c-fos* és a *zif268* promotere az AP-1 hely mellett más enhancer-elemeket is tartalmaz. Ezek alapján az AP-1 hely tűnik a Ras-független jelátviteli út célpontjának, míg az összetettebb *c-fos* és *zif268* promoterek enhancerei a Ras-függő út célpontjainak.

Kísérleteinkben a szabadyökök képződését gátló N-acetil-cisztein (NAC) az anizomicin Ras-függő és Ras-független jelátviteli útját is gátolta, tehát a szabadyököknek szerepe van az anizomicin jelátviteli hatásainak közvetítésében. Az NAC nem befolyásolja a tetradekanol forbol acetát (TPA) géinindukciós hatását, ami igazolja, hogy az NAC okozta gátlás nem esetleges toxikus, nem-specifikus hatásának köszönhető.

A p38 kináz specifikus gátlószere, az SB203580 gátolja az anizomicin okozta korai géinindukciót, ami a p38 kináz központi szerepére utal az anizomicin jelátvitelében.

Az anizomicin fehérjekináz kaszkádokra kifejtett hatását a megfelelő MAPK-ok foszforilált formája ellenes antitesttel végzett Western blot vizsgálattal igazoltuk. A JNK aktivációját emellett *in vitro* kináz reakcióval is vizsgáltuk. Az anizomicin aktiválja a JNK-1, az ERK-et, és a p38 kinázt PC12 sejtekben. A JNK aktivációja az M-M17-26 és *nr7* sejtvonalon is bekövetkezik, míg az ERK aktivációja ezekben a sejtekben gátolt, ami a JNK aktivációhoz kapcsolott *c-jun*, és az ERK aktivációhoz kapcsolott *c-fos* és *zif268* indukció fellevését támasztja alá. NAC előkezelés gátolja az anizomicin okozta JNK és ERK aktivációt, a szabadyököknek tehát az anizomicin kináz kaszkádokra

kifejlett hatásában is szerepe van. A p38 gátló SB203580 gyengíti az anizomicin ERK aktiváló hatását, míg az NGF okozta ERK aktivációt nem befolyásolja. Ezek szerint az anizomicin jelátvitelében a p38 kináz aktivációja megelőzi az ERK stimulációt. Az anizomicin eddig ismeretelt jelátviteli célpontjait a 3. ábra foglalja össze.



3. ábra: Az anizomicin jelátviteli célpontjai. (A folytonos nyílak kísérletileg alátámasztott, a szaggatott nyílak pedig hipotetikus kapcsolatokat mutatnak. ROS, reaktív oxigén származékok.)

Szubinhibitoros és a fehérjeszintézist gátló koncentrációjú anizomicin jelátviteli hatásainak összehasonlítása

A stressz-aktivált utak vizsgálatára - a szakirodalom tanúsága szerint - általában nagy, a fehérjeszintézist gátló anizomicin-koncentrációt használnak. A specifikus, szignál transzdukciós, illetve nem-specifikus, toxikus hatások megkülönböztetésére [³H]leucin beépülés vizsgálatával kiválasztottunk egy fehérjeszintézist biztosan nem gátló (10 ng/ml) és egy fehérjeszintézist gátló (1 µg/ml) anizomicin koncentrációt.

A magas koncentrációjú anizomicin gátolja a sejtproliferációt, sejtpusztulást okoz, míg az alacsony koncentrációjú anizomicin biológiai hatása az NGF-okozta neuronális differenciáció gátlása, toxikus mellékhatások nélkül. A magas koncentrációjú anizomicin által kiváltott sejtpusztulás apoptózissal történik. Az elért biológiai hatás hátterében az első megközelítés során nem találtunk elért jelátviteli utakat: a két különböző koncentráció ugyanazokat a fehérjekinázokat (JNK, ERK, p38) aktiválja, CREB foszforilációt okoz, és korai

válasz géneket (zif268, c-fos, c-jun) indukál, egyforma kinetikával és mértékben. A JNK kivételével ezek a jelátviteli utak p38 függő úton keresztül aktiválódnak. Bár az apoptotikus hatások számos esetben járnak JNK aktivációval, és az aktiváció gátlása antiapoptotikus hatású, az anizomicin esetében ez nem tűnik elegendőnek. Feltételeztük, hogy az apoptotikus hatást nem - vagy nem csak - a MAPK-utak serkentése, hanem a magas koncentrációjú anizomicin fehérjeszintézist gátló hatása okozza.

Mivel az ERK, JNK és p38 utat a kis és nagy anizomicin koncentráció azonos módon befolyásolja, a túlélésben alapvető jelentőségű P13K út egyes elemeit is megvizsgáltuk. Rövid idejű (5 perc) NGF kezelés hatására PC12 sejtekben megemelkedik a fosfo-Akt szintje. Ez az emelkedés rövid idejű, nagy koncentrációjú anizomicin kezeléssel gátlható. Ugyanakkor a kis koncentrációjú anizomicin Akt foszforilációhoz és aktivációhoz vezet.

Olyan fehérjéket kerestünk, amelyek szintézisének gátlása felelőssé tehető a proapoptotikus hatáért. Hosszu távú (24 óras) kezelés hatására az ERK, JNK, p38, PKB expressziójában nem találtunk változást. A toxikus anizomicin kezelés tehát nem ezeknek az enzimeknek az "eltüntetésével" idéz elő sejthalált. Ezzel szemben az apoptózis kivédéséért felelős Bcl-2 fehérje mennyisége alacsony koncentrációjú anizomicin kezelésre 4 óra után megemelkedik, és még 12 óra után is megtalálható a sejtekben. Ez az emelkedés magas koncentrációjú anizomicin kezelésre teljesen elmarad. Feltételezzük, hogy a Bcl-2 antiapoptotikus hatásának kiesése szerepet játszik az anizomicin apoptózist indukáló hatásában.

Az Akt hatás lehetséges közvetítője az NF-κB is: az Akt aktivációjának hatására az NF-κB a sejtmagba transzlokálódik, DNS-hez kötődik és túlélést elősegítő géneket indukál. Mobility shift analízis segítségével ezért megvizsgáltuk az alacsony, illetve magas koncentrációjú anizomicin kezelés hatását a transzkripciós faktorok kötődésére. Az NF-κB kötődés 12 óra után csökken, 24 óra után teljesen eltűnik magas koncentrációjú anizomicin kezelésre, alacsony koncentrációjú anizomicin kezelésre nem mutat lényeges változást. Az NF-κB és a Bcl-2 két egymástól eltérő, az apoptózisban résztvevő

út szereplője, ami valószínűsíti, hogy az anizomicin apoptotikus hatását több támadásponton is kifejezi.

Megvizsgáltuk azt is, milyen jelátviteli utak aktiválása védi ki a nagy koncentrációjú anizomicin okozta apoptózist. A növekedési faktorok (NGF, FGF, EGF) hatásaihoz, tehát az ERK illetve a PI3K út aktivációja nem elégséges az antiapoptotikus hatáshoz. Ugyanígy nem okoz gátlást a p38 gátló SB203580. Ugyanakkor a cAMP részleges védelmet nyújt, tehát a PKA-n keresztül jelátviteli út aktivációja részben kivédi a magas koncentrációjú anizomicin apoptotikus hatását. Az anizomicinnel együtt adott cAMP kivédi az NFκB kötődés csökkenését és a Bad foszforiláció gátlását is.

Következtetések

A fentiekben ismertetett kísérleti megfigyeléseink legfontosabb következtetései az alábbiakban foglalhatók össze.

1. A fehérjeszintézist nem gátló koncentrációjú anizomicin kezelés PC12 sejtekben több szignál transzdukciós kaszkádot (JNK út, p38 út, ERK út) okozott morfológiai változást, a sejtek változatlanul proliferáltak. Az ERK út elsődleges szerepe az irodalom szerint a proliferáció, neuronális differenciáció jelátviteli útjainak aktiválásában van. Kísérleteink alapján az anizomicin okoz ERK aktivációt, amelyhez szükséges a TrkA és a Ras fehérje jelenléte. Ez az ERK aktiváció kísérleti körülményeink között nem okozott neuronális differenciációt, de ez az ERK aktiváció nem elnyújtott, és vele párhuzamosan stressz utak is aktiválódnak. Saját kísérleteink ellene szólnak azoknak a korábbi irodalmi eredményeknek, hogy a JNK vagy p38 út jelentős szerepet játszana a neuronális differenciáció jelátvitelében, aktivációjuk éppenséggel gátlhatja az NGF által indukált neurinóvokedést. Az ellentmondó eredmények oka a kísérleti rendszerek különbözőségében lehet: az említett kísérletekben overexpressziós rendszereket használtak, amelyek gyakran váltanak ki a fiziológiától eltérő hatásokat. Feltételezésünk szerint az anizomicin-indukálta stressz-aktívált

kaszkádok (p38 út, JNK út) együttes aktivációja az NGF-indukálta neuronális differenciáció gátlásához vezet.

2. Az anizomicin által aktivált MAPK-ok, a JNK, ERK, és p38 út közül legfontosabb és direkt célpontnak a p38 út tűnik. Ez az út anizomicin hatására Ras-tól függetlenül indukálódik, és nélkülözhetetlen a korai válasz génnek indukciójához. A JNK utat az anizomicin szintén direkt módon aktiválja, de serkentése önmagában nem elegendő a korai génnek (c-Jun, c-fos, zif268) indukciójához. Az ERK aktivációja kísérleteink alapján sokkal proximálisabban kezdődik: az ERK, c-fos, zif268 indukcióhoz szükséges a Ras fehérje normális működése és a TrkA receptor jelenléte. Ugyanakkor, meglepő módon, az anizomicin hatására bekövetkező ERK aktivációt a p38 kináz aktivációja előzi meg, a kaszkádok között "párhuzamos" folylk.

3. Az anizomicin különböző utakat használ a korai génnek indukciójára. Az anizomicin a vizsgált korai génnek (c-Jun, c-fos, zif268, junB) kissé elhúzódo indukcióját váltja ki. NGF-el kombinálva annak korai géningdukciós hatását fokozza és tartósabbá teszi. Az NGF-el szemben (amni a domináns negatív Ras fehérjét expresszáló M-M17-26 szubklónban nem okoz korai géningdukciót, azaz Ras-függő módon aktiválja ezeket a géneket) az anizomicin géningdukciós hatása differenciálisan érvényesül: a c-Jun-t direkt támadásponttal, Ras-független úton aktiválja, míg a c-fos és a zif268 indukciója részben a Ras/ERK-út közvetítésével történik. Ehhez szükséges a nagy affinitású receptor jelenléte, de nem szükséges annak aktivációja. A korai génnek nem állnak közvetlen kapcsolatban az NGF okozta biológiai hatással, de mint transzkripciós faktorok szerepet játszhatnak késői génnek indukálásában. Az anizomicin által stimulált stressz-aktívált kaszkádok (p38 út, JNK út) gátolják a differenciációval közvetlen kapcsolatban álló tranzsin gén indukciót. A gátlás molekuláns mechanizmusát jelenleg nem ismerjük.

4. Az anizomicin minden általunk vizsgált jelátviteli hatása gátlható volt a szabadgyökök képződésének gátlásával. Az anizomicin-stimulálta ERK

foszforiláció, a JNK foszforilációja és aktivációja és a *c-jun*, *c-fos*, *zif268* indukciója mind igénylik a szabadygók jelenlétét. Újabb számos kísérleti eredmény számol be a szabadygók központi jelátviteli szerepéről. Az anizomicin-indukálta szabadygók képződésének mechanizmusa egyelőre ismeretlen, de kísérleteink alapján nélkülözhetetlen közvetítőnek tűnnek PC12 sejtekben.

5. Az anizomicin kis koncentrációban nem befolyásolja a sejtiproliferációt és önmagában nem elegendő az apoptotikus sejtpusztulás előidézéséhez. A nagy koncentrációjú anizomicin ezzel szemben sejtpusztulást okoz, ami apoptózissal történik. Bár az irodalmi adatok alapján a JNK út aktivációja apoptózist okoz, a PC12 rendszerben ez nem elegendő magyarázat az apoptózis létrehozására, mivel a kis koncentrációjú, sejtpusztulást nem okozó anizomicin a nagyhoz hasonló mértékben és időkinetikával okoz JNK aktivációt. Hasonlóképpen, összevetve a kis és nagy koncentrációjú anizomicin jelátviteli hatását, mindkettő aktiválja az ERK, és a p38 kinázokat, illetve rajtuk keresztül *c-jun*, *c-fos*, *zif268* indukciót okoznak. Annak ellenére, hogy a p38 kináz központi szerepet játszik az anizomicin jelátviteli útjában, gátlása nem antiapoptotikus hatású. Ebből arra következtethetünk, hogy az anizomicin jelátviteli útjának apoptózist kiváltó és antiapoptotikus hatása is van. Közülük az apoptózist kiváltó út nem igényel fehérjesszintézist, míg az antiapoptotikus útban újonnan szintetizált fehérjék is szerepet játszanak. Ezeknek a fehérjéknek a szintézisét gátolja meg az anizomicin nagy koncentrációja.

6. Az anizomicin apoptotikus hatását túléleési fehérjék gátlása közvetítheti. A PC12 sejtekben számos fehérje játszik antiapoptotikus szerepet, ilyen a PI3K, az Akt/PKB, az NF- κ B, a Bcl-2. Mivel a növekedési faktorok nem védik ki az anizomicin által okozott apoptózist, valószínű, hogy az ERK aktivációja nem játszik szerepet az antiapoptotikus mechanizmusokban. PC12 sejtekben az NGF feltételezett fő antiapoptotikus útvonalat a PI3K közvetíti. A PI3K-on keresztül aktiválódó Akt fehérje szintén fontos antiapoptotikus szerepet játszik. Kísérleteink alapján az NGF okozta Akt foszforilációt a nagy koncentrációjú

anizomicin gátolja. Ez több útvonalon okozhat apoptotikus hatást, hiszen az Akt célfehérjei közé tartoznak a Bad, caspase-9, IKK α fehérjék is. Újabb számos kísérleti eredmény igazolja, hogy az apoptózis szabályozásában szerepet játszó Bcl-2 fehérje szintje mind transzkripcionális, mind posztranszkripcionális szinten szabályozott. A kis koncentrációjú anizomicin Bcl-2 expressziónak emelkedést okoz, szemben a nagy koncentrációjú anizomicinnel. Feltételezzük, hogy a Bcl-2 szint emelkedése adaptációs válasz az anizomicin apoptotikus hatásaira. Ez az alkalmazkodási lehetőség a nagy koncentrációjú anizomicin esetében elmarad a fehérjesszintézist gátló hatás miatt, valószínűleg központi szerepet játszva az apoptózis kialakításában.

7. A protein kináz A serkentése részleges védelmet nyújt az anizomicin apoptotikus hatásával szemben. Az anizomicin okozta apoptózisban az általunk tesztelt ágensek közül egyedül a dbcAMP okozott részleges gátlást. Ebben az irodalmi adatok tanúsága szerint aktiválja az Akt fehérjét és foszforilálja a CREB fehérjét. A B-Raf aktivációján keresztül az ERK út antiapoptotikus hatása érvényesülhet. A dbcAMP hatása a vizsgált növekedési faktorok sikerelenségével együtt arra utal, hogy a toxikus anizomicin kezelés valahol, a receptorokhoz közel, viszonylag proximálisan szaktítja meg a PC12 sejtek túléleési szignalizációját.

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy az anizomicinnel kezelt PC12 sejtek alkalmasnak látszanak a stressz-szignalizáció eseményeinek vizsgálatára, a stressz utak és más jelátviteli mechanizmusok közötti kapcsolatok elemzésére. Világosan látszik azonban az is, hogy az anizomicin szignalizációs és transzlációt gátló hatásai együtt jelentkezhetnek, egymást költhetjük, megnehezítve a bonyolulttá váló biokémiai és biológiai hatások kiértékelését. A transzlációt gátló anizomicin-koncentrációval kapott jelátviteli hatások jelentőségét ezért mindenkor kritikával kell mérlegelni.

A munka alapjait képző publikációk

Közlemények

Törőcsik B., Szeberényi J. (2000) Anisomycin uses multiple mechanisms to stimulate mitogen-activated protein kinases and gene expression and to inhibit neuronal differentiation in PC12 pheochromocytoma cells. *European Journal of Neuroscience*, 12, 527-532 (Imp. f.: 4.95)

Törőcsik B., Szeberényi J. Anisomycin affects both pro- and antiapoptotic mechanisms in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, közlésre elfogadva. (imp. f.: 3.400)

Szeberényi J., Törőcsik B. Stressz-aktivált jelátviteli utak emlős sejtekben. In "Stressz - A sejtől a populációig", (közlés alatt).

Absztraktok

Törőcsik B., Szeberényi J. Anisomycin uses multiple mechanisms to inhibit neuronal differentiation in PC12 pheochromocytoma cells. 26th FEBS Meeting, June 19-24, 1999, Biochimie (supplement) s318

Előadások/Poszterek

Törőcsik B., Szeberényi J. The effect of anisomycin on gene expression in PC12 cells. 25th Silver Jubilee FEBS Meeting, July 5-10, 1998

Törőcsik B., Szeberényi J. The effect of anisomycin on gene expression in PC12 cells. 14th Annual Meeting on Oncogenes, La Jolla, June 24-27, 1998

Törőcsik B., Szeberényi J.: Az anizomycin géniindukcióra kifejlett hatása patkány pheochromocytoma sejtekben. VI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 1998, jan. 18-21

Törőcsik B., Szeberényi J.: Az anizomycin géneexpressziós hatása patkány pheochromocytoma sejtekben. Doktoranduszok II. Országos Konferenciája, 1998, aug. 30 - szept. 1

Törőcsik B., Szeberényi J.: Az anizomycin génaktivációs hatása PC12 sejtekben. Jelátviteli Magyarországon, 1998, okt. 9-10

Törőcsik B., Szeberényi J.: Anizomycin hatása PC12 sejtek szignáltranszdukciós folyamataira. VII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 1999, jan. 17-20

Törőcsik B., Szeberényi J.: Stressz-aktivált jelátviteli utak PC12 patkány pheochromocytoma sejtekben. VIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2000, jan. 17-19

Egyéb sajtó publikációk

Csatáry L. K., Moss R. W., Beuth J., Törőcsik B., Szeberényi J. and Bakács T. Beneficial treatment of patients with advanced cancer using a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68-H). *Anticancer Research*, 19, 635-638, 1999 (Imp. f.: 1.045)

Oszter, A., Törőcsik, B., Vértés, Zs., Kömvei, J.L., Kovács, K.A. and Vértés, M. (2000) Regulation of activator protein-1-DNA binding activity by opioid peptides in estrogen-sensitive cells of rat hypothalamus and uterus. *Eur. J. of Pharmacology* 395, 103-106 (Imp. f.: 1.9)

Oszter, A., Vértés, Zs., Törőcsik, B., Kömvei, J.L., Kovács, K.A. and Vértés, M. (2000) Antiestrogenic effect of opioid peptides in rat uterus. *J. of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, közlésre elfogadva. (Imp. f.: 1.9)

Fábián, Zs., Törőcsik, B., Kiss, K., Csatáry, L.K., Bodey, B., Tigyí, J., Csatáry, C., and Szeberényi, J. Induction of apoptosis by a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Anticancer Res.*, közlésre elfogadva (Imp. f.: 1.045)

Egyéb absztraktok

Oszter, A., Törőcsik, B., Paál, B., és Vértés, M. (1999) Effect of opioid peptides on the oestradol receptors in rat hypothalamus. *Neurobiology*, 7, 364

Oszter, A., Törőcsik, B., Kömvei, J.L., Vértés, Zs. and Vértés, M. Transcriptional effect of D-Me²-Pro⁵-enkephalinamide in rat oestrogen-sensitive tissues. Joint Meeting with the Hungarian Physiological Society, 27th to 29th May 2000. *J. of Physiology*

Egyéb előadások/poszterek

- Oszter A., Törőcsik B., Paál B.: Az endogén opioid peptidok hatásának vizsgálata az oestradiol receptor rendszer működésére patkány hypothalamusban és uterusban. Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XVII. Kongresszusa, 1998, augusztus 25-27
- Oszter A., Törőcsik B., Kovács K.A., Kömlyei J., Vértés Zs., Vértés M.: Opioid peptidok antioesztrogén hatása patkány uterusban. A Magyar Élettani Társaság LXIV. Vándorgyűlése 1999, július 5-8
- A. Oszter, B. Törőcsik and M. Vértés: Effect of opioid peptides on the oestradiol receptors in rat hypothalamus. 9th Meeting and Workshops of the European Neuroendocrine Association 1999, september 3-7
- Oszter, A., Törőcsik, B., és Vértés, M. (2000) Opioid peptidok hatása a hypothalamikus AP-1-DNS kötődés aktiválására a szexuális fejlődés hatására patkányban. IBRO-MITT Milenneurni Konferencia, 2000, jan. 19-22
- Fábián, Zs., Kiss K., Törőcsik B., és Szeberényi J.: Newcastle Disease Virus vakcina (MTH-68/H) által indukált apoptózis PC12 patkány pheochromocytoma sejtekben. VIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2000, jan. 17-19