

Fehérjekináz aktiváció és transzlokáció jelentősége PC12 sejtek neuronális differenciációjában

Ph. D. értekezés tézisei

Készítette: Boglári Gábor

Témavezető: Szeberényi József
PTE ÁOK Orvosi Biológia Intézet

2002

Jelen dolgozat a PTE ÁOK Orvosi Biológia intézetében folyó, a "Ras fehérjék szerepe a *jelátvitelben*" című Ph. D. program keretében elvégzett munka eredménye; a téma vezetője Szeberényi József professzor. Az intézet egyik fő célkitűzése az idegseji növekedési faktor (NGF) által kiváltott neuronális differenciációhoz vezető jelátviteli folyamatok részleteinek tisztázása. Erre a célra a legszélesebb körben - így általunk is - használt modellrendszert a PC12 pakkány phaeochromocytoma sejtvonalt képezi; bár a rendszer által szolgáltatott eredményeket általában következtetések levonása szempontjából számos kudaró limitáltnak tartja, ezidáig megbízhatóbban detektálható és reprodukálható morfológiai változásokat produkáló sejtvonalt létrehozni még nem sikerült. Az eredetileg kis, kerek kromaffin sejtek NGF kezeltés hatására hosszú nyúlványokat vesztenek, alakjuk megváltozik, ószezességben tipikus, szimmetrikus jellegű neuronokhoz hasonló fenotípust alakítanak ki. Az ehhez vezető intracelluláris jelátviteli utakban központi szerepet játszik egy - számos különböző humán tumorban előforduló tényezőként felismert - onkogénfehérje, a Ras. Ez a kis G-fehérjék csoportjába tartozó, a membrán belső felszínén elhelyezkedő molekula közvetíti a sejt felszíni receptorra érkező növekedési faktorok által generált szignált a citoplazmatikus jelátviteli rendszer enzimei felé. Effektorai közül - eddigi ismereteink alapján - egy fehérjekináz-kaskád képezi a legfontosabb differenciációs útvonalat. Ezen kaskád elemei közül a mitogén-aktivált protein-kinázok (MAPK-ok) családjába tartozó extracelluláris szignál által regulált kináz (ERK) enzimek aktiválásának időkinetikáját és sejtben belüli lokalizációs változásait kritikus jelentőségűnek tartják a differenciációs válasz szempontjából. Ezek az enzimek aktiválódnak ugyanis a jelátviteli rendszer végső célpontjait képező, a sejtanyagban található transzkripciós faktorokat, amelyek a differenciációban szerepet játszó egyes korai és késői gének indukcijájában vesznek részt.

Kutatási témánkban elsősorban az ERK-ek és néhány egyéb (p90^{Rsk}, JNK, p38MAPK, p70S6 kináz), PC12 sejtek jelátviteli útjaiban részt vevő Ser/Thr specifikus fehérjekináz szerepét - aktiválódásukat, annak időkinetikáját, transzportjukat, nukleáris transzlokációjukat, ill. ezen folyamatok Ras-függését - vizsgáltam, különös tekintettel arra, milyen jelentőséggel bírnak mindezek a differenciációs szignál továbbításának szempontjából. Bizonyossággal állítható, hogy a fenti enzimek eltérő idő- és térbeli aktivációs mintázatot mutatnak különböző növekedési faktorok és másodlagos messzenger analógok hatására, és szerepük jelentős mértékben különbözik egymástól az NGF által indukált jelátviteli folyamatokban. Bizom abban,

hogy a dolgozatban leírt megfigyelések hozzájárulhatnak az egyes fehérjék specifikus szerepének és viselkedésbeli különbségeinek, ezen keresztül pedig az NGF-szignalizáció bonyolult mechanizmusának jobb megértéséhez.

Kísérleti módszerek

Sejtenyészés

A normál PC12 sejtek ill. mutáns szubklónjaink (Z-M17-5, M-M17-26 és nr5 sejtvonalak) tenyésztését Dulbecco által módosított Eagle médiumban végeztük. Az optimális növekedési feltételek biztosítására a médiumot 5% bojtű-, ill. 10% főszerummal egészítettük ki. A sejtek különböző ágensekkel történő kezelése - az egyes kísérleteknél feltüntetett ideig - az alábbi koncentrációkban történt: NGF - 50-100 ng/ml; BDNF - 20-50 ng/ml; okadaicinsav - 0,25 µM; anisomyein - 10 ng/ml; okadaicinsav - 1-10 nM; ortovanadat - 1-10 µM; Trk inhibitor K252a - 200 nM; MEK inhibitor PD98059 - 20 µM; p38MAPK inhibitor SB203580 - 1 µM.

A differenciáció morfológiai vizsgálata

A sejtenyészés 24 lyukű tenyészőedényben történő lezárása után (10⁶ sejt/lyuk) az egyes ágensekkel alacsony szerumtartalmú (0,5% főszerum) médiumba végeztük a kezelést két héten át. A tenyészetekben két-három napotként lezárásokat végeztünk a differenciáció mértékét, oly módon, hogy megállapítottuk azok sejtek közötti differenciáció mértékét, amelyek több mint egy, a sejtesek átmérőjénél kétszer hosszabb nyúlványt növesztettek.

Western blot analízis

A sejteket 100 mm átmérőjű tenyészőedénybe ültettük ki (5x10⁶ sejt/edény), majd a megfelelő kezelést megelőzően a médiumot két napra teljesen szerummentes médiumra cseréltük le, hogy a lehető legalacsonyabb mértékűre szorítsuk a vizsgálni kívánt kináz alapaktivitását. A kezeléseket ezt követően friss, szerummentes médiumban végeztük. A médium eltávolítása után az edényt 4°C-os PBS-el ledöblítettük, majd a sejtek feltárást 1 ml RIPA pufferrel végeztük el, amelyet frissen hozzáadott foszfátáz és proteáz inhibitorokkal (aprotinin, PMSF, ortovanadát) egészítettünk ki. A sejteket lekapartuk, majd a liszátumot 2-3x 21G-s tűn passziroztuk át, a DNS sztroncsolása céljából. 30 perces jégén történő inkubációt követően a liszátumot 15.000 g-vel 20 percen keresztül centrifugáltuk, majd a felülúszó 40 µl-t ugyanilyen mennyiségű mintapufferrel összekeverve 5 percig főrtünk. Rövid hűtés után a fehérjéket SDS jelenlétében 10%-os poliakrilamid gélben választottuk szét (50 mA, 2 óra), majd elektroblotot végeztünk (200 mA, 12 óra). A membránon a keresett fehérjék specifikus

antitesttel történő kimutatása az alábbi protokoll szerint történt: háttérblokkolás 5%-os tejpor/PBS-ben 1 óráig át, első antitest a megfelelő higításban (anti P-ERK 1:1000, anti P-CREB 1:1000, anti ERK2 1:5000, anti P-p38MAPK 1:500, anti JNK 1:1000, anti P-JNK 1:1000, anti p90^{ras} 1:2000, anti p70S6 kináz 1:1000, anti Nck 1:1000) 1%-os tejpor/PBS-ben 1 óráig át, 3x5 perc mosás 1%-os tejpor/PBS-ben, második antitest (HRP-konjugált anti nyúl vagy anti egér immunoglobulin 1:2000 vagy 1:1000) 1%-os tejpor/PBS-ben 30 percen át, 3x20 perc mosás 1%-os tejpor/PBS-ben, végül kemilumineszcianin alapuló detektálás ECL kit felhasználásával.

Nck kötődési teszt

A sejtenyésztés az előbbiekből leírás szerint történt. A sejteket ez esetben lemezenként 1 ml, proteáz- és foszfatáz inhibitorokkal ellátott pufteri használtunk. Lekapars és 13.000 g-n 5 percig centrifugáljuk, majd a felülúszóit keletsozintuk, egyik felét 20 µl teljes Nck/GST, a másik felét Nck-SH3/GST jelenlétében, másik felét 5 µl kontroll GST-vel együtt 1 óráig 4°C-on inkubáljuk. 1000 g-n 5 percig történő centrifugálás után az üleőrés felét 100 µl Nck fel majd újra centrifugáljuk, a maradékot 100 µl GST-vel együtt centrifugáljuk. A felülúszókat Hamilban foszfatáz inhibitorokkal ellátott pufteri használtunk. A foszfatáz inhibitorok a fenti percig forraltuk. Az SDS-polinakramid elektroforézist és az SDS-PAGE-t követően a fenti leírtak alapján történt. A kapcsolódott fehérjéket specifikus kimutatására anti P-tyr antitestet használtunk (1:10.000-es higításban), egyebekben a Western blotnál leírt protokollt követjük.

Gélben végzett kináz aktivációs esszé

A sejtenyésztés, kezelés és felkötés előbbiekből részletezett lépéseinek elvégzése után az extraktumot olyan SDS-polinakramid gélben futattuk, amely - a gélbe polimerizált formában - 0,5 mg/ml koncentrációjú metilin bázikus proteint (MBP) tartalmazott foszfátakceptorként. Az elektroforézis elvégzése után a kinázreakciókat (³²P)ATP felhasználásával végeztük el. A nem inkorporálódott radioaktív foszfátcsoportok intenzív mosással történő elávoítása után az ERK-eket jellemző sávjukat vizualizálása és kvantitatív Phosphor Imager segítségével történt.

Immuncitokémia

A sejtek tenyésztése ebben az esetben 30 mm-es tenyésztőedényekben, steril, poli-L-lizinnel fedett fedőlemezeken történt (5x10⁴ sejt/edény). A megfelelő kezelés után PBS-el történő mosást követően a sejteket -20°C-os metanol/aceton 7:3 arányú keverékében fixáljuk 2 percig, 3x5 perces PBS-el történő mosás után az endogén peroxidáz aktiválás gátlása céljából 10 percig 0,1%-os H₂O₂-ban inkubáljuk a sejteket, majd az ABC festési eljárás protokollját követve az alábbi lépésekkel mutatjuk ki a fehérjék sejtben belüli lokalizációját: 1,5%-os blokkoló szérum/PBS 1 óráig át, első antitesttel történő inkubáció (anti ERK2 1:2000, anti P-ERK 1:250, anti p90^{ras} 1:1500, anti p70S6 kináz 1:500, anti CREB 1:1000, anti P-CREB 1:1000, anti Jun 1:1000, anti Fos 1:1000, anti p38MAPK 1:500, anti JNK 1:500) éjszakán át 4°C-on, 3x5 perc mosás PBS-ben, inkubáció biotin-konjugált második antitesttel (anti nyúl vagy anti egér 1:1000) 30 percig, 3x5 perc mosás PBS-ben, inkubáció avidin-biotin enzimetegemmel 30 percig, 3x5 perc mosás, inkubáció peroxidáz-szubstráttal (Vectastain Nova Red vagy NK-568) a megfelelő színreakció eléréséig (egy esetben ezüst-intenzifikálóval). A pozitív reakciók vizuális detektálás felszálló alkoholsorozattal és xilollal majd lefedés Depex vagy VectaMount lefedőszerrel. (Egyes esetekben metilzölddel ill. metilzöld-pironimmal történő sejtstain is alkalmaztunk.)

vonakozásban is szerepet tulajdonítanak a differenciációs jelátvitelben; KCl-indukálta, emelkedett Ca^{++} influxhoz vezető membrán depolarizáció pl. Ras által közvetített ERK aktivációhoz vezet, ráadásul KCl EGF-el kombinációban történő adása neuritnövekedést indukál PC12 sejtekben. Ami a ciklikus AMP-1-ileti, az önmagában nem képes differenciációs választ kiváltására, de potenciozza az NGF ilyen irányú hatását, másfelől egyes adatok szerint EGF/cAMP kombinációs kezelés hatására a sejtek neurotoxicitást növesztenek. Ugyanígy eredményhez vezet, ha PC12 sejtekben a cAMP jelátviteli utat az agyalapi mirigyből származó cAMP-aktivátor polipeptiddel (PACAP) stimulálják. Ami a cAMP út ERK aktivációra kifejtett hatását illeti, mind az adenilát cikláz-aktivátor forskolinjal, mind a cAMP analóg dibutyrl cAMP-vel történő kezelés átmeneti ERK stimulációt eredményez, mégpedig Ras-független módon. Leírták azonban azt is, hogy egy nem hidrolizálódó, rendkívül membrán-permeabilis cAMP analóg, a 8-(4-chlorophenylthio)-cAMP (CPT-cAMP) tartós ERK aktivációt és ezzel járó neuritnövekedést képes indukálni PC12 sejtekben. Érdekes megfigyelés ugyanakkor, hogy bár a foszforilázok közé tartozó 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetát (TPA) is képes elnyújtott ERK aktivációt okozni, ezt nem kísérleti morfológiai változás. Kísérleteink során tisztázni szeretnénk volna ezeket a némileg ellentmondásos eredményeket, megpróbálván ok-okozati összefüggést találni az ERK aktiváció tartóssága és a neuronális differenciáció között. Munkánkban egyrészt - az előbbiekben már leírt anti foszfo-ERK Western blot analízis segítségével - az ERK foszforilációt vizsgáljuk, másrészt nyomon követtük a sejtmorfológiában bekövetkező esetleges változásokat. Ami az ERK aktivációt illeti, az összes általunk használt másodlagos messengert analóg - dbcAMP, TPA és a Ca^{++} ionofor ionomycin - képes ERK foszforilációt indukálni, mégpedig egymáshoz nagyon hasonló, és az EGF hatásával megegyező módon: az 5 perces kezelésekre jelentkező erőteljes foszforiláció 30 perc elteltevel már alig észlelhető, órákkal később pedig teljesen eltűnik. Vagyis ezen ágensek hatása az ERK aktivációra önmagukban egyértelműen átmeneti. Amennyiben a másodlagos messengerekkel EGF-el kombinációban kezeljük a sejteket, hatásuk nem változott: EGF-el együtt adva sem voltak képesek sem az ERK aktiváció felelősfésztére, sem tartóssá tételre. Összehangban ezekkel az eredményekkel, sem dbcAMP, sem ionomycin, sem TPA, sem pedig ezeknek EGF-el történő kombinációja nem volt képes az NGF hatásához hasonló differenciációs választ kiváltani PC12 sejtekben. Tény, hogy az EGF/dbcAMP és EGF/ionomycin kombinációs kezeléseik hatására a sejtek alakja megváltozik, sőt, 10-15%-ban még rövid nyúlványokat is növesztenek, ám ezeknek sem hossza, sem száma, sem arborizációja nem emlékeztet az NGF-re adott differenciációs válasz során

megfigyelhető neuritnövekedéshez. Ezekben az esetekben bizonyos tehát, hogy - legalábbis az általunk használt sejtvonalakon - neuronális differenciáció nem következik be, amikor az ERK aktiváció gyorsan lecseng. Nem tudjuk, hogy az elnyújtott ERK aktiváció és a neuritnövekedés között ok-okozati összefüggés áll-e fenn, de az bizonyos, hogy a két jelenség az általunk vizsgált esetekben együtt jár, az ezt leíró elméletet pedig olyan körülmények között támasztottuk alá, ahol modellrendszerünkben a különböző sejtvonalak mindegyikén ugyanarról a receptorról induló jelátviteli utakat tudunk tanulmányozni. E rendszer nagy előnye, hogy kizárja esetleges egyéb szignálok jelenlétét, azaz nyílvánvalóbbá teszi, hogy az egyes sejtvonalak ugyanarra a jelre adott eltérő válasza mögött fellelhető különbségek - mint a tartós vs. átmeneti ERK aktiváció - alapvető jelentőséggel bírnak ezen eltérő biológiai válaszok kialakításában.

Egyéb fehérjekinázok aktivációja a differenciáció során

Végeztünk kísérleteket egyéb, a differenciációs jelátviteli utakban még kevésbé tisztázott jelentőségű fehérjekináz aktivációját illetően is. Vizsgálatainkat a MAPK család egyes elemeire, a JUN kinázokra és a p38MAPK-ra ill. az ERK-szubstrát p90 riboszómális S6 kinázra (p90^{S6}) és a p70S6 kinázra terjesztettük ki. EGF, NGF és esetenként másodlagos messengert analóg kezeléseik hatására az enzimek aktivációs állapotában bekövetkező változásokat próbáltuk meg detektálni, egyrészt a foszforilált állapoti fehérjét felismeri képes antitesttel végzett Western blot, másrészt - ahol ilyen antitest még nem áll rendelkezésre - a foszforiláció által előidézett esetleges vándorlási "shift" kimutatásának segítségével. A JUN kinázok (JNK) a MAPK-k azon családját képezik, amelyek főként a sejlet éré stresszhatásokra aktiválódnak, de a tumor nekrotikus faktor (TNF) vagy növekedési faktorok hatására bekövetkező indukciójuk is leírt. PC12 sejtekben a sejtek NGF által indukált differenciációját gátni képes anisomycin JNK aktivációt idéz elő, melyet a Ras-gátlás alig befolyásol. Ez a megállapítás a p38MAPK-ra is igaz, amely enzimet egyébként elsősorban mint lipopoliszacharidok által aktiválódni képes kináz írták le, majd más megfigyelések a cAMP hatásának közvetítésében tulajdonítottak neki szerepet. Mindeket fent említett enzim részt vesz az NGF-megvonás kiváltotta apoptózisban PC12 sejtekben, de a differenciációs választásban betöltött esetleges szerepük nem ismeretes. Anni P-JNK és anni P-p38MAPK Western blotjaink alapján valószínűsíthető, hogy ez a szerep nem is lehet túl jelentős, ugyan vad típusú PC12 sejtekben mind EGF-re, mind NGF-re bekövetkezik JNK foszforiláció, ez azonban jóval gyengébb és

rövidebb ideig tartó, mint az anisomycin- indukálta aktiváció - anisomycin azonban nem okoz differenciációt -, ráadásul ugyanezt az eredményt kapjuk gátló Ras-t expresszálo sejtvonalainkon is. Ami a p38MAPK-t illeti, cAMP kezelés hatására gyengébb, anisomycinre valószínűleg markánsabb foszforilációt detektáltunk, növekedési faktorok azonban ebben a tekintetben hatásatlannak bizonyultak.

Mint arról már az elméleti háttér tárgyalása során esett szó, az ERK-ek egyik legismertebb és legsokeoldalúbb citoplazmatikus szubszeriája a p90 riboszómális S6 kináz, amely számos célfejtéje - elsősorban transzkripciós faktorok - foszforilációját végzi. A két enzim eukarióta sejtekben heterodimerként, egymással fizikai asszociációban található a citoplazmában *in vivo*, és lokalizációjuk megváltozása is együtt zajló folyamattal. Ugyanakkor a p90^{RA} foszforilációs kinetika nem mindig korrelál az ERK aktivációval, vagyis indukciójában egyéb fejtéjkinázok is szerepet játszhatnak. PC12 sejtekben kimutatták, hogy NGF-hatásra a p90^{RA} is aktiválódik, mégpedig az ERK-hez hasonlóan Ras-függő módon. Mivel az ERK foszforilált formája elleni antitest nem áll rendelkezésre, aktiválódásának nyomon követésére olyan Western blot eljárást alkalmaztunk, melynek során a fejtéjének a foszforiláció hatására a géliben bekövetkező lelassult vándorlását próbáltuk meg detektálni. Kísérleteink alapján ERK foszforiláció mind növekedési faktorok, mind ionomycin hatására bekövetkezik, és a jelenség Ras-függő módon valósul meg - ami pedig az NGF-kiáltotta aktiváció tartósságát illeti, a foszforiláció 2 óras kezelés során is kimutatható. Ez erősen emlékeztet az ERK aktiváció időkinetikájára, ami sugallhatja a p90^{RA}-nak a differenciációban az ERK enziméhez hasonló szerepet. Ami a p70S6 kinázról illeti, az enzim riboszómális fejtéjének foszforilálását végzi, és mitogén hatások során aktiválódik. Aktivációját növekedési faktorok, inzulín vagy interleukinok hatására a foszfát-dil-inozitol 3 kináz (PI3K) mediálja, függetlenül a Ras-tól és a MAPK szignalizációs kaskádától. Az enzim NGF-kiáltotta differenciációban betöltött esetleges szerepének tisztázására fordított erőfeszítéseink sajnos nem jártak eredményel - vándorlási "shift" a p70S6 kináz esetében egyik általunk alkalmazott kezelés során sem sikerült kimutatnunk. Összefoglalva a JNK, p38MAPK, p90^{RA}, p70S6GK enzimek vizsgálata során kapott eredményeket, pozitív, az ERK-eken kívül a differenciációban jelentőséggel bíró fejtéjének szerepének betöltésére a fentiek közül egyedül a p90^{RA} bizonyult alkalmas jelöltnek.

2/ ERK transzlokáció jelentősége

ERK transzlokáció Ras-függése

Az ERK enzimnek citoplazmából a magba történő transzlokációja számos különböző hatásra (hormonok, növekedési faktorok), számos különböző sejttípusban bekövetkező jól ismert jelenség. A fentiekben már részletesen ismertett elmélet szerint mindez olyan körülmények között valósul meg, amikor az ERK enzimnek aktiválása tartósan fennáll - ez a „menyiség” ERK-különbség vezet valamilyen módon „minőség” (azaz lokalizációs) eltéréshez. Bár maga a jelenség jól ismert, a transzlokáció mechanizmusára vonatkozóan rendelkezésre álló adatok Bizonyos, hogy az ERK-ek nem rendelkeznek nukleáris lokalizációs szignállal, így a klasszikus, importint és Ran fejtéjüket felhasználó sejtmagba történő transzport esetükben nem működik. Simaizomsejtekben kimutatták, hogy bombezin hatására bekövetkező kontrakció során az ERK a Hsp27 chaperonfejtéjével együtt transzlokálódik a sejtmagba. Más adatok szerint egy rövid élettartamú, az ERK aktivációt kiváltani képes ágensek hatására szintetizálódó nukleáris horgonyfejtéje játszana szerepet a transzlokációban. Bármi is azonban a transzlokáció tényleges mechanizmusa, PC12 sejtekben kimutatták, hogy az átmeneti ERK aktivációt előidéző EGF hatására nem, a tartós ERK aktivációt okozó NGF hatására azonban egy órán belül bekövetkezik az enzimnek magba történő vándorlása. Kísérleteink során sejtvonalainkon anti ERK III. anti P-ERK antitestekkel végzett immunocitokémiai festés segítségével határoztuk meg az enzimnek lokalizációját, ill. követtük nyomon az egyes kezeléseknél bekövetkező változásait. Normál körülmények között (szérum tartalmú táploldatban) tenyésztett vad típusú PC12 sejtekben immunolokalizáció alapján az enzimnek mind a citoplazmában, mind a sejtmagban fellelhetők; általában a citoplazma mutatóit erősebb festődési, de számos sejtben a magban található ERK populáció is jelentős. Ugyanezt a némi megelégedéssel eredményt kaptuk akkor is, amikor az alacsony gátló Ras expressziót mutató Z-M17-5, ill. a magas gátló Ras expressziójú M-M17-26 típusú sejteken végeztük el az immunocitokémiai festést. Mivel ilyen körülmények között a sejtek természetesen nem differenciálódnak, kézenfekvő a következtetés, hogy egy bazális ERK-jelenté a sejtmagban semmiképpen nem elégséges feltétele a neuritnövekedéshez szükséges génextpressziós változások előidézésének. Amikor a festést két napos szérumnehéztést követően végeztük el, az immunreakció mindhárom sejtvonalban szinte kizárólag a citoplazmában jelentkezett: a sejtek mintegy 80%-ában az ERK enzimnek a sejtmagon kívüli lokalizációjuk. Egy

6 óra EGF kezelés ezen gyakorlatilag nem változtatott - hatására transzlokáció nem következett be. Ezzel szemben ugyanilyen idejű NGF kezelés markáns változást indukált: a normál PC12 sejtek mintegy 70%-ában az enzimek a sejtmagba vándoroltak, az immunfestődés erőteljes nukleáris és gyenge citoplazmatikus lokalizációt mutatott. Z-M17-5 és M-M17-26 sejtekben azonban ez nem következett be; a sejtek túlyomór többségében az enzimek a citoplazmában maradtak. Ezek az eredmények világosan igazolják, hogy még a részleges Ras-gátlás - amely az ERK aktivációt nem gátolja, csak átmenetivé teszi - is képes az ERK transzlokáció gyakorlatilag teljes megakadályozására.

Másodlagos messzenger analógok hatása az ERK transzlokációra

Az ERK aktiváció vizsgálatánál alkalmazott másodlagos messzenger analógokkal történő kezeléseket megismételtük az ERK transzlokáció tanulmányozása során is. Immunocitokémiai festéseink eredményeit összegezve megállapítható, hogy sem dbcAMP, sem ionomycin, sem TPA - mind egyikük átmeneti ERK aktivációt indukál - nem képes ERK transzlokáció előidézésére vad típusú PC12 sejtekben. Amennyiben a fenti kezeléseket EGF-el egészítettük ki, az eredmény ugyanaz maradt - kombinált kezelésekként sem vezettek ERK-lokalizációs változashoz. Összegezve elmondható tehát, hogy átmeneti ERK aktivációt kiváló ágensek egyik esetben sem voltak képesek előidézni az enzimek magba történő transzportját, tartós ERK aktivációt előidézők azonban igen - hozzájárulva mindkettőhöz, hogy a transzlokáció bekövetkezéséhez kb. egy óra kezelés is elegendő, azaz nem szükséges hozzá az általunk detektált három órán át is elhúzódó ERK foszforiláció.

Foszforilált ERK populáció transzlokációja

Kísérleteink másik részében azt szeretnénk volna kideríteni, hol aktiválódnak pontosan az ERK-ek, ill. hol aktiválódnak célfehérjéiket. A transzlokáció funkcionális jelentőségét ugyanis az támasztaná alá, ha sikerülne bizonyítani, hogy ténylegesen a foszforilált (azaz aktiválódott) ERK szubpopuláció vándorol a sejtmagba a differenciációt előidézőni képes kezelése hatására. Ezen ERK frakció nyomom követése érdekében anti-P-ERK antitesttel végzettünk immunocitokémiai vizsgálatokat. Eredményeink szerint két napig szűrmentes táplálékban tenyésztett PC12 sejtek immunreakciót egyáltalán nem mutatnak, bennük még bazális ERK foszforiláció sem detektálható. Ehhez képest normál szűrmentes oltóban tenyésztett sejtek mintegy 50%-ában a citoplazmában enyhe festődés észlelhető - azaz ebben az esetben

bekövetkezik egy igen alacsony mértékű ERK aktiváció. 5 perces NGF kezelést követően mind a jelöltöltött sejtek száma, mind a jel erőssége egyértelműen megnő, ám a festődés lokalizációja továbbra is kizárólag citoplazmatikus; 60 perces NGF kezelés után azonban - hasonlóan a „normál” anti-ERK antitest alkalmazása során észleltékhez - a citoplazmában már alig, míg az addig festetlen magokban erőteljes immunfestődés észlelhető. Ezek az eredmények mindenképpen arra utalnak, hogy az NGF-hatásra bekövetkező ERK foszforiláció szintjére a citoplazma, ahonnan az így aktiválódott ERK szubpopuláció az, ami a sejtmagba vándorol. Abban az esetben, ha EGF-el kezeljük a sejteket, 5 perc után itt is markáns citoplazma festődés volt detektálható, ami azonban 60 perces kezelés után jelentősen gyengült, lokalizációs változás nélkül - vagyis EGF-hatásra az ERK aktiváció egy óra belül lecsengett és transzlokáció nem következett be.

Ami a bekezdés elején feltejt kérdés második felét illeti (azaz hol történik a transzkripció faktorok ERK-ek általi foszforilációja), a probléma megközelítéséhez mind anti Fos, anti Jun (mindkét fehérje az ERK *in vitro* szubsztitúként kimutatható), mind a normál CREB-et ill. annak csak foszforilált formáját felismerni képes antitestek (anti CREB és anti P-CREB) felhasználásával végzettünk immunocitokémiai festéseket. Kontroll és NGF-kezelt PC12 sejteket festve elmondható, hogy az összes általunk vizsgált transzkripció faktor mindkét esetben kizárólagosan nukleáris lokalizációjú. Anti-P-CREB festés esetén kezeltlen sejtekben jel nem volt detektálható, de 1 óra NGF kezelés után a sejtmagok itt is erőteljes festődést mutatnak. Miután a foszforilált transzkripció faktor eleve a sejtmagban lokalizálódik, a CREB-foszforiláció szintjére egyértelműen a sejtmag.

Egyéb fehérjehatások transzlokációja

Az ERK-eken kívül más fehérjehatásoknak is szerepük lehet az NGF géncserepresszió hatásainak közvetítésében, kézenfekvő tehát a kérdés, vajon transzlokálódnak-e a citoplazmatikus kaszkád egyéb elemei is NGF ill. kombinált kezelésekként hatására a különböző sejtvonalakban? A géndukációs hatás közvetítésére számos jelölt akad, közülük a legesélyesebbek a CREB-kínázok, melyek közül a Ca⁺⁺-indukált CREB foszforiláció fő közvetítője az Rsk2 izoenzim. Kimutatható, hogy a p90^{Rsk} lokalizációja növekedési faktorok hatására az ERK-ekkel együtt változik, sőt PC12 sejtekben depolarizáció hatására is végbemeny a fehérje nukleáris transzlokációja. Vizsgálataink szerint NGF kezelés hatására a p90^{Rsk} magba történő vándorlása vad típusú PC12 sejtekben az ERK-éhoz hasonlóan lejátszódik, míg Z-M17-

5 sejtekben elmarad. Ugyanakkor az ERK transzlokációval ellentétes eredmény, hogy ionomycin is képes a p90^{src} sejmagba történő transzportjának előidézésére, ráadásul - miután ez Z-M17-5 és M-M17-26 sejtekben is bekövetkezik - egy Ras-tól független jelátviteli út szerepe valószínűsíthető ebben a folyamatban. (Ebben a kérdésben ugyanakkor ellentmondás van azzal az ugyancsak általunk leírt megfigyeléssel, hogy az ionomycin-kiváltotta Ras foszforiláció vizsont Ras-függetlő módon valósul meg: jelenlegi ismereteink alapján ezt a jelenséget megmagyarázni nem tudjuk. Ezek az eredmények mindenesetre azt sugallják, hogy ebben az esetben a transzlokáció talán nem függ az enzim aktíváltsági állapotától.) A továbbiakban vizsgálatainkat kiterjesztettük a JNK, p70S6 kináz és a p38MAPK enzimekre is. Az aktivációs vizsgálatok eredményei alapján nem meglepő módon, egyik féltéte esetében sem sikerült nukleáris transzlokációt kimutatnunk EGF ill. NGF kezelés hatására vad típusú PC12 sejtekben. Az egyetlen pozitív eredményt JNK esetében a sejtek anisomycinrel történő kezelése szolgálta - ez a megfigyelés azonban inkább az enzim stressz-aktíválta jelátviteli útban, semmint a differenciációban betöltött szerepére utal.

3/ ERK-független, alternatív differenciációs útvonalak

Amint arról az előzőekben esett már szó, NGF hatására sem Z-M17-5, sem M-M17-26 sejtekben - ahol a Ras egyenlően ill. erőteljesen gátolt állapotú - nem következik be neuronális differenciáció. Ez a gátlás azonban részlegesen megkerülhető NGF plusz ionomycin ill. NGF plusz dbcAMP együttes stimulációjával -, ezekben az esetekben az NGF által normál PC12 sejtekben kiváltott neuronális differenciációhoz mind morfológiájában, mind arányában hasonló biológiai válasz észlelhető a gátolt Ras-t expresszáló sejtvonalakon, sőt, a kombinált kezelésekorai válasz gének indukciójához is vezetnek. Amennyiben a tartós ERK aktiváció és az ezzel együtt járó transzlokáció valóban esszenciális a neuronális differenciációhoz - ahogy azt eddigi eredményeink sugallják -, a fenti kombinációs kezeléseknél ebből a szempontból is képesnek kellene lenniük a Ras-gátlás megkerülésére. Az alább ismertetésre kerülő kísérletek azonban ennek ellenkezőjét bizonyítják, feltevésezzel, hogy egyes esetekben ERK-független jelátviteli utakon közvetített szignálok is eredményezhetnek neuritnövekedést.

Kombinációs kezelésekek által indukált differenciáció Ras-, MEK- és Trk-függetlenül

Kísérleteink első részében vad típusú PC12 és a domináns gátolt Ras-t magas fokban expresszáló M-M17-26 sejtvonalak morfológiai változásait vizsgálhattuk meg. Az NGF/ionomycin

ill. NGF/dbcAMP kombinációs kezeléseken túl kíváncsiak voltunk arra is, hogy bekövetkezik-e neuritnövekedés azokban az esetekben, ha a Ras-gátlás mellett a jelátviteli pálya más állomásait is kikapjuk speciális gátlószerek segítségével. Eredményeink szerint normál PC12 sejtekben az NGF-indukált neuritnövekedés az ERK-aktivátor MEK PD98059 általi gátlásával blokkolható, ám az NGF plusz ionomycin ill. NGF plusz dbcAMP kezelés kiváltotta differenciáció ebben az esetben is bekövetkezik. Amennyiben azonban a kezelésekek során a nagy affinitású NGF receptor aktivitását gátoltuk (specifikusnak tekintett gátlószere a K252a jelti ágens) a neuritnövekedés mindvégig - a kombinált kezelésekek esetében is - elmaradt. Ugyanez volt megfigyelhető M-M17-26 sejtek vizsgálata során is; az NGF/ionomycin ill. NGF/dbcAMP kombinált kezelésekek által indukált neuritnövekedés (mely mértékében ugyan elmarad a PC12 sejtekben NGF hatására bekövetkezőtől, de a neuritok hossza és száma tekintetében megközelíti azt) TrkA gátlásával kivédhető, MEK gátlásával azonban nem.

Kombinált kezelésekek hatása az ERK aktivációra és transzlokációra

Miután az ERK-ek egyetlen ismert aktivátora a MEK (pontosabban a MEK1 és 2 izoenzim), az a megfigyelés, hogy a MEK gátoló PD98059 csak egy igen enyhe inhibitorikus hatást volt képes kifejteni a kombinált kezelésekek által kiváltott differenciációra, erősen kérdésessé teszi az ERK-ek szerepét is ebben a folyamatban. Ami az ERK-eknek a kombinációs kezelésekek során használt másodlagos messzenger analógok hatására bekövetkező foszforilációját illeti, mint arról az ERK aktiváció részletes tárgyalása során már volt szó, mind ionomycin, mind dbcAMP átmeneti ERK foszforilációt indukál vad típusú PC12 sejtekben, NGF-el együtt adva pedig annak hatását az ERK aktivációra kímálható mértékben egyik ágens sem potenciozza. M-M17-26 sejtekben azonban a másodlagos messzengerek sem önmagukban, sem NGF-el kombinálva nem képesek még átmenetileg detektálható ERK foszforiláció előidézésére sem (holott mint látnuk, ez utóbbi esetekben a sejtek neuritokat növesztenek). Nyilvánvaló, hogy ebben az esetben a neuritnövekedéshez vezető szignáltranszdukcióban az ERK aktiváció nem játszik szerepet.

Megvizsgálva az ERK-ek nukleáris transzlokációját hasonló körülmények között, az aktivációs kísérletekkel összhangban M-M17-26 sejtekben sem NGF, sem a differenciációt okozó NGF/ionomycin ill. NGF/dbcAMP kombináció nem képes az ERK-ek magba történő transzportjának előidézésére. (Ez a megfigyelés, azon túl, hogy további bizonyítékkal szolgál egy ERK-ek nélküli differenciációs jelátviteli útvonal jelenlétére, újfent megerősíti eddigi

eredményeinket, melyek szerint tartós ERK aktiváció hiányában nincs transzlokáció. A fenti eredmények tehát egy olyan, NGF által indukált és mind cAMP, mind Ca^{2+} szignálokkal potencirozható differenciációs jelátviteli pálya meglétét valószínűsítik, amely független a klasszikus Ras/MEK/ERK útról, de szükséges hozzá az NGF receptor épsége. (Ez utóbbit azok a megfigyeléseink is megerősítik, melyek szerint PC12nm5 sejtek, amelyekből hiányzik a nagy affinitású TrkA receptor, rezisztensnek bizonyultak az NGF/ionomycin ill. NGF/dbcAMP kombinációs kezelésekre.) Ez természetesen nem kizárja, hogy az ERK-ek differenciációban **betöltött jelentőségét**, de egyértelműen jelzi, hogy egymással interkommunikáló szignalizációs mechanizmusok kivételre esetekben egy mégoly esszenciálisnak hitt komponens **helyettesítésére** is képesek lehetnek.

Rak szerepe a kombinációs kezeléseknél kiváltott differenciációban

Felmentül természetesen a kérdés, hogy ha nem az ERK-ek, akkor a jelátviteli utak mely **egyéb elemei** lehetnek felelősek a differenciációs válasz közvetítéséért ezekben az esetekben. Irodalmi adatok alapján szóba jöhetnek az új PKC család egyes tagjai, pl. a PKC δ , amelyről kimutatták, hogy szerepet játszik a neurinóvekedésben, a Ca^{2+} hatásokra PC12 sejtekben géntranszpressziót indukáló kalmodulin dependens kinázok (CaMK), a cAMP-stimulációra foszforiláló p38MAPK, vagy az előbbieken más összefüggésben már tárgyalt ERK szubsztát p90^{ras} - mi e két utóbbi enzim lehetséges szerepét vizsgáltnak meg a rendelkezésünkre álló sejtvonalakon. A cAMP-szupporálta jelátviteli útban való részvételre elsődleges jelöltünk a p38MAPK enzim volt, de - annak ellenére, hogy egyes megfigyelések szerint gátlása megakadályozza a forskolin-indukálta neurinóvekedést -, specifikus gátlószereinek (SB203580) alkalmazásakor sem a sejtek túlélésében, sem differenciációjában nem látnak változást a kontrollhoz képest a kombinációs kezeléseknél. Ezek az eredmények erősen kérdésessé teszik - ha nem is zárják ki teljes bizonyossággal - a p38MAPK részvételét az NGF/cAMP-indukálta neurinóvekedésben. Ezek után figyelmünk az NGF/ionomycin kombinációs kezelés által beindított szignalizációs mechanizmus felé fordult, a p90^{ras}-ról ugyanis már az előzésekben leírtuk, hogy ionomycin hatására Ras-függő módon aktiválódik, de Ras-független módon képes nukleáris transzlokációra. Foszforiláció által okozott vándorlási shift ari p90^{ras} Western blot detektálásával sikerült kimutatnunk, hogy M-M17-26 sejtekben az Rak NGF kezelésre nem, de NGF/ionomycin kombinációra enyhe aktiválódást mutat, sőt, az enzim magba történő vándorlását CREB foszforiláció megjelenése kíséri. Mivel a CREB az a transzkripciós faktor,

amelyet növekedési faktorok, cAMP és Ca^{2+} -vezérelte szignálok konvergenciapontjának tekintenek, feltételezhető, hogy az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben az NGF/ionomycin és NGF/dbcAMP kombinált kezeléseknél során is betöltheti ezt a szerepet. (Nem szabad ugyanakkor figyelmen kívül hagyni, hogy CREB foszforiláció önmagában nem elégséges a differenciációhoz.) Mindazonáltal abban a jelátviteli útban, amely az NGF receptorról indulva, Ca^{2+} -indukálta szignálok segítségével kerül meg a Ras/MEK/ERK utat, eredményeink szerint talán a p90^{ras} föltheti be az ERK-eknek a citoplazma és a mag közötti jelátvitásban játszott szerepét.

4/ Az EGF és NGF eltérő hatásának háttérben álló lehetséges mechanizmusok

Kísérleteink egyik fő célkitűzése - az egyes fehérjekinázok specifikus szerepének felismerése mellett - az EGF és NGF által beindított intracelluláris folyamatok közötti, az eltérő biológiai hatás kiváltásában szignifikáns különbségek feltérképezése jelentette. A kérdés megközelítését sajátos módon meglehetősen nehézíti az a tény, hogy eddigi ismereteink alapján mindkét növekedési faktor ugyanazt a - Ras-Raf-MEK-ERK - jelátviteli útvonalat használja a sejten belül, azzal, a fentiekben már bőségesen tárgyalt különbséggel, hogy az ERK-ek aktivációjának időkinetikája az egyes esetekben eltérő. Arról azonban még nem esett szó, hogy mi lehet az EGF ill. NGF által kiváltott átmenet vs. tartós ERK aktiváció mechanizmusa?

Foszfatázok szerepe az ERK aktivációban

Az ERK-ek növekedési faktorok által történő aktivációját specifikus tirozin és treonin oldalláncaik foszforilációja eredményezi a kettős specifikitási MEK enzimek által. Kézenfekvő feltevés, hogy az aktiváció tartósságát befolyásolhatja ezen foszfátcsoportok turnover, amely folyamamban proteín foszfátáz enzimek játszanak kulcsszerepet. Ilyen szabályozási mechanizmus jelenléte az első bizonyítékot azok a kísérletek szolgáltatják, amelyek szerint kezeletlen PC12 sejtekből származó citoplazma-extrakt képes az ERK aktivitás redukálására, és mindez foszfátáz inhibitorokkal gáolható. A lehetséges foszfátáz jelölték közül kiemelkedik a nemrégiben felfedezett, és évről évre új taggal bővülő MAPK-foszfatázok (MKP-k) csoportja - ezek különböző sejttípusokban expresszáldó kettős specifikitási foszfátázok, amelyek mindegyike képes az ERK-ek in vitro defoszforilációjára, és tagjaik között mintegy 40-80%-os szkavenciarokonság mutatkozik. PC12 sejtekben az eddigi kutatások alapján főként az MKP2 és MKP3 szerepe lehet jelentős: kimutatták, hogy NGF kezelés hatására indukciójuk fokozódik

és képesek az Elk-1 transzkripciós faktor (az ERK-ek egyik legfontosabbnak tartott célpontja) aktiválásának megakadályozására. Egyes adatok szerint aktivációjukat maga az ERK kaszkád indukálhán, bekapcsolva így egy negatív feed-back mechanizmust önmaga leállítására. Az ERK aktiváció szabályozásának egy másik lehetséges kulcszime a PP2A foszfatáz, amelyről kimutatták, hogy képes PC12 sejtekben az ERK-ek specifikus teoninon bekövetkező defoszforilálására és inaktiválására. Kísérleteink első részében az ortovanadát (protein tirozin foszfatáz inhibitor) és az okadaicinsav (protein Ser/Thr foszfatáz inhibitor, amely már igen kis koncentrációban - 1nM - blokkolja a PP2A-t) ERK aktivációra, transzlokációra és a neuronális differenciációra gyakorolt hatásait tanulmányoztuk. Feltételeztünk az volt, hogy amennyiben foszfatázok EGF-hatásra indukálódnának - így téve átmennetve az ERK aktivációt -, foszfatázgátló plusz EGF kezelés tartós ERK aktivációt és ezzel együtt járó neurinóvokédat **keltné, hogy eredményezzen** EGF/ortovanadát ill. EGF/okadaicinsav egyidejű adásával azonban PC12 sejtekben - P-ERK Western blotok alapján - nem váltható ki tartós ERK aktiváció (foszforiláció 30 perc eltelével már egyik esetben sem észlelhető). Ezzel összhangban, ilyen kombinációs kezeléseket ERK transzlokáció kiváltására sem bizonyultak alkalmasnak - ezen adatok tehát kizárják egy EGF-hatásra aktiválódó, majd az ERK-eket defoszforiláló foszfatáz működését, amely az átmennetve való ERK aktivációt így módon lenne felelős. Ami a differenciációs kísérleteket illeti, az ezzel kapcsolatos indalmi adatok meglehetősen ellentmondásosak; egyes szerzők szerint a foszfatáz inhibitorok serkentik, mások szerint gátolják az NGF-indukáltá neurinóvokédat. Az általunk használt vad típusú PC12 sejteken az ezekben a cikkekben leírt koncentrációban mind az ortovanadát, mind az okadaicinsav toxikus hatásúnak bizonyult, alacsonyabb koncentrációkat alkalmazva pedig önmagában egyik foszfatázgátló sem váltott ki neuronális differenciációt. Kombinációs kezeléseket során sem EGF plusz ortovanadát, sem EGF plusz okadaicinsav nem bizonyult képesnek neurinóvokédat kiváltására. Amennyiben a foszfatázgátlókat NGF-el együtt adva kezeltük a sejteket, az ágensek a neurinóvokédat kezdeti stádiumát nem gátolják (sőt, számos esetben még gyorsították is a folyamattól), ám hosszan tartó kezelés során a differenciációs folyamatok leálltak, és egy hét után egyre jelentősebb sejtpusztulás volt megfigyelhető. (Két hét eltelével már alig érték el a 20%-ot a túlélő sejtek aránya, azaz hosszú távon még a legalacsonyabb, a foszfatáz-gátlás szempontjából hatásos koncentráció is toxikus a sejtek számára. Nyilvánvaló, hogy a foszfatázok generális gátlása számos, a sejtek életben maradásához is szükséges mechanizmust blokkol - ilyen körülmények között azonban a differenciációra kifejtett esetleges hatásuk

érdemben nem vizsgálható.) Végerinték előkísérleteket a foszfatázgátlók korai és késői génnek expressziójára kifejtett hatásait illetően is. Ezek szerint önmagukban sem fos, sem transzin indukciót nem okoznak, de nem is gátolják az NGF ilyen irányú hatásait. Mindebből messzeemenő következtetést levonni nem lehet, az azonban nyilvánvaló, hogy ezek az ágensek nem gátolják az NGF által kiváltott jel sejmagba jutását. Összefoglalva, a foszfatázok szerepét célzó kísérleteinkből csupán negatív következtetéseket vonhattunk le: valószínűsíthető, hogy nem ilyen típusú enzimek felelősek az EGF ill. NGF-hatásra bekövetkező eltérő idejű ERK aktivációt.

Nck adapterfehérje jelentősége

Az EGF-NGF hatás különbözőségeit vizsgálva azt is megpróbáltuk kideríteni, lehetnek-e eltérések a két jelátviteli pálya receptorokhoz legközelebbi szintjén, nevezetesen, hogy kötődnek-e az egyes esetekben különböző adapterfehérjék a receptorokhoz. Figyelmünk elsősorban az Nck adapterfehérje felé irányult, mert egyes adatok szerint annak overexpressziója képes az NGF által előidéztet neuronális differenciáció megakadályozására. A fehérje egy SH2 és három SH3 alegységből áll és ismereteink szerint az eddig vizsgált összes sejtípusban ubikvitin módon expresszállódik. (Western blot-al kimutathatóan a mi PC12 sejtvonalunkban is.) Vizsgálatához a SOTE Biokémiai Intézetből kaptunk értékes ~~adatok~~ rendelkezésünkre bocsájtvva az Nck-GST fúziós fehérje formájában általuk előállított ~~adatok~~ rendeltetésűnket. Ezen fehérjével ún. kötődési tesztet végeztünk, amely során a növekedési faktorokat színezett sejtek extraktumában vizsgáltuk az Nck-hoz való kötődést: a kapcsolódott fehérjéket anti P-Tyr Western blot segítségével mutattuk ki. Kísérleteink alapján 5 perces EGF kezelést követően mind normál PC12, mind Z-M17-5 sejtekben bekövetkezik az Nck és az ~~aktiválódott EGF~~ receptor összekapcsolódása, ám hasonló időtartamú NGF kezelés ~~ezt egyik sejtípusban sem képes kiváltani~~ - az NGF receptor és az Nck között nem jön létre asszociáció. A ~~foszforiláció~~ EGF receptorhoz való kötődés viszont abban az esetben is bekövetkezik, ha az Nck-nak egy csonkított, csupán az SH2 domént tartalmazó darabjával végeztük el a kísérletet. A csak SH3 doménteket tartalmazó rész használata esetén azonban a csonka Nck nem asszociálódott az EGF receptorhoz - azaz a kötődés (elméleti ismereteink alapján is várható módon) az SH2 doménten keresztül valósul meg. Ezen kísérletek alapján valószínűsíthető, hogy már a receptorokhoz toborzódó adapterek szintjében is van különbség az EGF ill. NGF jelátvitel között. Ennek tényleges jelentőségét az Nck esetében akkor ismerhetnénk fel, ha fel tudnánk térképezni a

férfje SH3 doménjein keresztül a receptorhoz "downstream" kapcsolott további jelátviteli komponenseket. Erre a szerepre az egyik jelölt az immunsejtekben kimutatottan az Nck-hoz kötődni képes p21-aktivált kináz (PAK) lehetne, amelynek főként a JNK jelátvitelben tulajdonítanak szerepet. A másik, esetünkben még érdekesebb pedig a guanin nukleotid kicserélő faktorként a Ras-t aktiválni képes Sos fehérje. A Sos esetleges jelentőségére különbözően azok az adatok hívják fel a figyelmet, melyek szerint T-limfocitákban EGF kezeléssel gyors ERK aktiváció következik be, aminek következményeképpen a Sos is foszforilálódik. A Sos foszforilációja az adaptorférfjének a receptortól való disszociálódásához vezet, ami leállítja - vagyis átmenetivé teszi! - az ERK-aktivációt. Nem tudjuk, hogy ez a mechanizmus működik-e PC12 sejtekben, de EGF receptor-Nck-Sos koimmunoprecipitációs kísérletekkel tisztázni lehetne ezen fehérjék egymáshoz való kötődését. Amennyiben ez az asszociáció bekövetkezik - hozzájárulva, hogy az Nck differenciációt gátló hatású -, úgy a fenti mechanizmus is magyarázatul szolgálhat az ERK aktiváció transzienssé válására, ennek következményeképpen pedig a neuritnövekedés elmaradására.

EGF és NGF együttes hatásai

Végeztül végzettünk előkísérleteket az EGF és NGF együttes hatásának vizsgálatára céljából - ilyen irányú kísérletek nem szerepelnek az irodalomban, pedig érdekes lehetne a sejt biológiai válaszára, és az esetlegesen e mögött meghúzódó eltérő jellegű ERK aktivációnak a detektálása olyan körülmények között, amikor a sejt egyidejűleg van kitéve mindkét stimulációnak. Különösen, ha az EGF valóban egy általa aktivált mechanizmussal „terelne” az ERK aktivációt átmeneti, a sejt biológiai válaszára pedig a proliferáció irányába. Eredményeink szerint azonban a kettős kezelése során mind az ERK aktiváció és transzlokáció, mind a sejt biológiai válasza vonatkozásában egyértelműen az NGF hatása érvényesül; amennyiben a sejteket NGF/EGF kombinációval kezeljük elnyújtott ERK foszforiláció következik be, ezt követő nukleáris transzlokációval, a sejt pedig neuritokat növeszt. Nem tudjuk, miért dominál az NGF által indukált szignál az EGF jelátvitel felett, különösen azon megfigyelés tükrében, hogy a génuindukcióra kifejtett hatásuk egymást potenciozza: zif indukció nyomom következe egyértelműen a gén fokozódó átírást mutatja a kombinált kezelés során. Mindazonáltal az a hipotézis, miszerint az EGF nem átmeneti ERK aktivációt indukálna, hanem elnyújtott ERK aktivációt rövidítene le, a fenti eredmények ismeretében nem tűnik támogathatónak.

Összefoglalás

1. Kimutattuk, hogy részleges Ras-gátlás jelentősen lecsökkenti és átmenetivé teszi, teljes Ras-gátlás pedig megszünteti az NGF-hatásra bekövetkező ERK aktivációt.
2. EGF és másodlagos messenger analógok mind önmagukban, mind egymással kombinációban csak átmeneti ERK aktiváció indukálására képesek.
3. Transziens ERK aktivációt egyetlen állatunk vizsgált esetben sem követ ERK transzlokáció.
4. Transziens ERK aktiváció egyetlen esetben sem jár együtt neuritnövekedéssel.
 ⇒ A fentiekből következik egyrészt, hogy inkább Ras funkció szükséges az elnyújtott ERK aktivációhoz és az enzimnek magába történő transzportjához, másrészt, hogy amennyiben a differenciációs szignál a klasszikus ERK útvonalon transzdukcióval, annak irányításhoz az ERK-ek tartós aktiválása és nukleáris transzlokációja szükséges.
5. Speciális esetekben (NGF/dbcAMP ill. NGF/ionomycin kezelése során) a bekövetkező neuronális differenciációhoz nem szükséges MEK és ERK aktiváció és ERK transzlokáció.
6. Szükséges azonban hozzá az NGF receptor épisége.
 ⇒ Léteznek Ras/MEK/ERK-független, alternatív jelátviteli utak, amelyek az NGF receptortól indulnak ki, és mind Ca^{++} , mind cAMP-függő hatások segítségével képesek neuronális differenciáció előidézésére.
7. Az ERK-eken kívül, az állatunk vizsgált egyéb enzimek közül sem a JNK, sem a p38MAPK, sem p70S6K nem mutat NGF-hatásra bekövetkező szignifikáns foszforilációt és nukleáris transzlokációt PC12 sejtekben, míg a p90^{ras} igen.
8. NGF-el szemben ionomycin kezelés Ras-független módon is képes Rsk - de nem ERK - aktiváció és transzlokáció kiváltására.

9. Az ilyen módon bektövetkező Ras transzlokáció CREB foszforilációval jár együtt.
 ⇒ Az NGF/ionomycin kezelésre Ras-tól függetlenül bektövetkező, neuroindukcióhoz vezető jelátviteli utakban a p90^{Rsk} helyettesítheti az ERK-eket.
10. Foszfátázgátlók (sem okadaissav, sem ortovanadát) nem képesek az EGF által kiváltott transziens ERK aktiváció tartóssá tételére és az ERK-ek nukleáris transzlokációjának kiváltására.
11. EGF plusz foszfátázgátló kezelés nem okoz neuroindukciót.
12. A sejtek EGF és NGF-el történő együttes kezelése során az NGF hatásai érvényesülnek.
 ⇒ Az EGF valószínűleg nem egy - ezidáig ismeretlen - általa aktivált mechanizmussal teszi dimenzióvá az ERK aktivációt; ha mégis, azt nem foszfátáz enzimek indukciója révén éri el.
13. A megfelelő növekedési faktor stimulációját követően az NGF receptor nem, az EGF receptor azonban asszociálódni képes az Nck adapterfehérítéhez.
 ⇒ Az EGF vs. NGF jelátvitel már a sejmembránhoz legközelebbi szinten, a receptorokhoz kapcsolódó adapterek vonatkozásában is különbségeket mutat.

Publikációk

Az érdekezés alapjául szolgáló közlemények

- Boglári, G., Erhardt, P., Cooper, G. M., Szeberényi, J. (1998) Intact Ras function is required for sustained activation and nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinases in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *Eur. J. Cell. Biol.* **75**, 54-8 (IF: 2,801)
- Boglári, G. and Szeberényi, J. (2001) Nerve growth factor in combination with second messenger analogues causes neuronal differentiation of PC12 cells expressing a dominant inhibitory Ras protein without inducing activation of extracellular signal-regulated kinases. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 1445-54 (IF: 3,862)
- Boglári, G. and Szeberényi, J. (2001) Nuclear translocation of p90^{Rsk} and phosphorylation of CREB is induced by ionomycin in a Ras-independent manner in PC12 cells. *Acta Biol. Hung.*, közlésre elfogadva (IF: 0,291)
- Impact factorral bíró absztrakt*
- Boglári, G. and Szeberényi, J. (1999) Analysis of the time-course of ERK phosphorylation in the neuronal differentiation of PC12 cells. *Biochimie*, Vol. 81, suppl. No.6., 249 (IF: 1,635)
- Előadás és poszter*
- Boglári, G., Nusser, N., Szeberényi, J. (1994) NGF jelátvitel, Ras fehéríték és gényexpresszió. "Jelátviteli utak rendszereiben", tudományos ülés, Salgótarján
- Boglári, G., Sztáló, Gy. jr., Pap, M., Nusser, N., Szeberényi, J. (1994) Ras fehérje szerepének vizsgálata az NGF-indukált korai gényexpresszióban PC12 sejtekben. *A Magyar Genetikusok Egyesületének III. konferenciája*, Debrecen

- Boglári, G., Sétáló, Gy. jr., Pap, M., Nusser, N., Szeberényi, J. (1995) Differential role of H-Ras in the expression of early response genes induced by NGF in PC12 cells. *FEBS Advanced Course on "Single Cell Techniques in Signal Transduction Research"*, Leiden, The Netherlands
- Boglári, G., Sétáló, Gy. jr., Pap, M., Nusser, N., Szeberényi, J. (1995) Differential role of H-Ras in the expression of early response genes induced by NGF in PC12 cells. *6th IMP Spring Conference*, Wien, Austria
- Boglári, G. and Szeberényi, J. (1996) ERK-ek nukleáris transzlokációja PC12 sejtronalakban. *IV. Sejt- és Fejlődéshiológiai Napok, Visegrád*
- Boglári, G., Sétáló, Gy. jr., Szeberényi, J. (1996) Nuclear translocation of Ser/Thr kinases in PC12 subclones treated with NGF, dbcAMP, TPA and ionomycin. *12th Annual Meeting on Oncogenes*, Frederick, USA
- Boglári, G., Sétáló, Gy. jr., Szeberényi, J. (1996) Nuclear translocation of Ser/Thr kinases in PC12 subclones treated with NGF, dbcAMP, TPA and ionomycin. *FEBS Advanced Course on "Molecular Mechanisms of Signaling and Targeting"*, Spetses, Greece
- Boglári, G., Sétáló, Gy. jr., Szeberényi, J. (1998) ERK-ek NGF és másodlagos messzengerek hatására beövetkező nukleáris transzlokációja PC12 szubklónokban. *VI. Sejt- és Fejlődéshiológiai Napok, Szeged*
- Boglári, G., Erhardt, P., Szeberényi, J. (1998) Intact Ras function is required for nuclear translocation of ERKs in NGF-treated PC12 cells. *Silver Jubilee FEBS Meeting*, Copenhagen, Denmark
- Boglári, G. and Szeberényi, J. (2000) Fehérje kináz aktiváció és nukleáris transzlokáció szerepe PC12 sejtek neuronális differenciációjában. *VIII. Sejt- és Fejlődéshiológiai Napok, Pécs*

- Egyéb, a témához nem kapcsolódó közlemények*
- Szeberényi, J., Boglári, G., Komáromy, L., Nusser, N., Pap, M., Sétáló, Gy. jr., Tigyí, A. (1996) Problem-oriented teaching of Molecular Cell Biology. *Med. Edu.*, 30, 323-4 (IF: 1.078)
- Szeberényi, J., Boglári, G., Komáromy, L., Nusser, N., Pap, M., Sétáló, Gy. jr., Tigyí, A. (1996) How Molecular Cell Biology is taught at the University Medical School of Pécs, Hungary. *Med. Teacher*, 3, 213-8 (IF: 0.785)
- Szeberényi, J., Boglári, G., Komáromy, L., Nusser, N., Pap, M., Sétáló, Gy. jr., Tigyí, A. (1997) Problem-based teaching of Molecular Cell Biology. *in Med. Edu-21: An account for initiative for change in Europe for the 21st century*, 25-9
- Előadás és poszter*
- Boglári, G., Horváth, G., Lakatos, A., Szeberényi, J. (1998) The use of interactive computer programs in self-instructed learning of Molecular Cell Biology. *AMEE Conference*, Prague, Czech Republic
- Boglári, G. and Szeberényi, J. (1999) The method of examination in Molecular Cell Biology in the Medical School of Pécs, Hungary. *AMEE Conference*, Linköping, Sweden