

A RHOA FEHÉRJE SZABÁLYOZÁSA AZ NGF ÁLTAL INDUKÁLT NEURONÁLIS DIFFERENCIÁCIÓS JELÁTVITTELBEN

Nusser Nóra

Ph.D. Tézis

Pécsi Tudományegyetem, Orvostudományi Kar
Biokémia és Molekuláris Biológia Ph.D. program
"Ras proto-oncogének szerepe a jelátvitelben" Ph.D. alprogram
alprogramvezető: Dr. Szeberényi József

Pécs, 2004

BEVEZETÉS

Az első Rho fehérjét a Ras kis GTP kötő fehérjék családjának tagjaként izolálták. A Rho fehérje család legtöbbet tanulmányozott tagjai a RhoA, Rac1 és a Cdc42 fehérjék. Először ezek a fehérjék a citoskeleton és a citoskeleton által irányított folyamatok szabályozóiként voltak ismertek. Később igazolták, hogy fontos szerepük van különböző jelátviteli folyamatok szabályozásában is, úgy mint a sejtciklus, a sejt transzformáció és a neuronális differenciáció szabályozásában. A PhD tézisem alapjául szolgáló munka során a RhoA fehérjének a neuronális növekedési faktor (NGF) által indukált neuronális differenciáció jelátvitelében betöltött szerepét vizsgáltam patkány pheochromocytoma (PC12) sejtekben.

Munkámat Dr. Szeberényi József és Dr. Tigyi Gábor vezetése alatt végeztem és szerves folytatása Dr. Sebők Ágnes munkájának, melyben azt igazolta, hogy a RhoA fehérjének kettős szerepe van a neuronális differenciációban. Kimutatta, hogy a neuronális differenciáció iniciációs fázisában az NGF inaktíválja a RhoA-t, majd a neurit növekedés fázisában a RhoA ismét aktiválódik. Ezután én azt vizsgáltam, hogy az iniciáció fázisában milyen fehérjék közvetítik a jelet az NGF-től a RhoA fehérjéig, majd a RhoA fehérje aktiválásának egy új szabályozó mechanizmusát írtam le, mely befolyásolja a célfehérjék kötődését.

Kísérteim első felében az NGF-től milyen jelátviteli molekulák közvetítik az információt a RhoA felé. Igazoltam, hogy az NGF a nagy affinitású NGF-receptoron, a TrkA-n keresztül, a Ras-tól független jelátviteli úton gátolja a RhoA fehérjét. Megmutattam azt is, hogy a TrkA és RhoA közötti jelátvitelben a foszfátidilinozitol-3-kináz (PI3-K) és a Rac fehérje aktiválása is szükséges és a PI3-K a Rac feletti helyezkedik el. Munkám második felében azt igazoltam, hogy a RhoA fehérje szabályozásában a már eddig is jól ismert GDP-GTP kötésen kívüli a foszforilációnak is szerepe van, pontosabban a 188-as pozícióban lévő szerin protein kináz A (PKA) általi modifikációjának. A RhoA fehérje foszforilációja megváltoztatja az egyes effektorokhoz való affinitását, nevezetesen a foszforilált RhoA nem képes kötödni a Rho-kinázhoz, de fokozottabban kötődik a PKN-hoz, a rhotekinhoz és az mDia-hoz. Ezáltal lehetővé válik, hogy a RhoA által elindított jelátviteli utak a szükségleteknek megfelelően különbözőképpen aktiválódjanak.

RÖVID IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az általában vizsgált RhoA fehérje a kis GTP kötő fehérjék Ras szupercsaládjába tartozik, ezen belül a Rho fehérje családba. A Rho fehérjecsalád tagjai több, mint 50%-os szekvencia homológiát mutatnak egymással és a szekvencia hasonlóság alapján 6 alcsaládba lehet osztani őket: A hat alcsalád közül a Rho, a Rac és a Cdc42 szerepét vizsgálták legtöbbször. A Rac család fehérjéi a lamellopodiumok, a Cdc42 család fehérjéi a filopodiumok kialakulásának szabályozásában játszanak szerepet. A Rho család tagjai az aktin citoskeleton szerveződését szabályozzák és minden olyan folyamatot, melyben az aktin citoskeletonnak szerepe van, úgymint a citokinézis, fagocitózis, pinocitózis, sejtvándorlás, axon növekedés. Ezen kívül különböző jelátviteli mechanizmusok szabályozásában is részt vesz, mint pl. a sejtciklus, a sejt transzformáció, apoptózis, neuronális differenciáció.

GDP-GTP ciklus:

Eddigi ismereteink szerint a RhoA fehérje aktivitásának szabályozásában, mint minden GTP kötő fehérje szabályozásában a GTP és GDP közötti állapot váltakozás szerepet. GDP kötött állapotban a fehérje inaktív, a guanin nukleotid leválasztó gátló (GDI) fehérjéhez kötődve a citoplazmában található. Amikor a sejt aktiválódik bizonyos extracelluláris hatásokra (pl. növekedési faktor kötődés), akkor a GDI-t leválasztó faktorok (GDF) kötődnek a RhoA/DGI komplexhez és ezáltal a GDI leválik a RhoA fehérjétől. Ez elősegíti a guanin nukleotid kicserélő faktorok (GEF) kötődését a RhoA-hoz és megtörténhet a GDP cseréje GTP-re. A GTP kötött RhoA fehérje aktív és transzlokálódik a citoplazmából a sejtmembránba, ahol a célfehérjéhez kapcsolódva, azokat aktívvá vagy továbbítja a jelet.

Effektorok:

Az elmúlt években több, mint 30 olyan fehérjét azonosítottak élesztő kettős-hibrid módszerrel, amelyek a Rho, Rac, Cdc42 fehérjék effektorai. Közülük a Rho fehérjék effektorait a Rho-kötő szekvenciájuk alapján három csoportba lehet osztani.

1. Az első csoport a PRK (protein kinase C (PKC)-related protein kinase) fehérje család, melynek tagjai az általában vizsgált PRK1/PKN és rhotekin, továbbá a PRK2, rhoflin/2. A PKN egy serin/threonin kináz, melynek C-terminális régiója nagy hasonlóságot mutat a PKC katalitikus doménjével. A PKN fehérje számos funkciója ismert: i) a RhoA fehérjétől továbbítja a jelet a citoskeleton felé, ezáltal szabályozza a sejt morfológiáját, valamint a sejtciklus szabályozó fehérjék felé, melynek eredménye a mitózis késleltetése, ii) a neurofilamentumok foszforilációján keresztül gátolja az intermedier filamentumok rendeződését, iii) közvetíti a jelet a RhoA fehérjétől a serum

response factor (SRF)-függő transzkripció felé. A rhotekin katalitikus aktiválással nem bíró fehérje, mely a fehérje-fehérje és a fehérje-lipid kötődés szabályozásában vesz részt, így feltehetően a RhoA-nak a különböző sejtmembrán részlekre való transzlokációjának szabályozásában vesz részt.

2. A második csoport a Rho-kináz család, melynek tagjai az általában vizsgált p160^{ROCK}/ROK β /ROCK-1 (a későbbiekben ROK-nak vagy Rho-kináznak fogom nevezni) és a család másik tagja a ROK α /ROCK-II. A Rho-kináz család tagjai szintén serin/threonin kinázok. Az általában vizsgált ROK fehérje nagy mennyiségben expresszálódik az agyban. Ismert, hogy a ROK-nak szerepe van a stressz rostok és a fokál adhézió kialakulásának szabályozásában, a c-fos transzkripció faktor és a sejtciklusban a G₁/S átmenetet elindító fehérjék expressziójának szabályozásában. Az is ismert, hogy a ROK fehérje inaktivációja szükséges és elégséges a neuritetrakció létrehozásához, valamint a ROK gátlása neurit növekedést indít el PC12 sejtekben NGF-től függetlenül.

3. A harmadik csoport tagjai az általában vizsgált mDia, valamint a citron kináz és a citron. Az mDia a ROK fehérjével együttműködve közvetíti a jelet a RhoA-tól az aktin citoskeleton újrendeződésének folyamatában.

NGF által indukált neuronális differenciáció PC12 sejtekben:

Az NGF receptortól indulva már több jelátviteli utat is azonosítottak. Ezek közül elsőként kell megemlíteni a legtöbbet tanulmányozott Ras/Raf/MEK/ERK utat, másrészt a Ras-tól független Crk/C3G/Rap1/Braf utat, melyek mindegyike az extracelluláris jel által szabályozott kináz (ERK) tartós aktivációjához vezet, mely szükséges a neurit növekedéséhez. Ez utóbbi, Ras-független jelátviteli úthoz kapcsolható a protein kináz A (PKA) fehérje, hisz igazolták, hogy Ras-tól függetlenül képes az ERK tartós aktivációjának létrehozására. A harmadik jelátviteli útnak a sejt túlélésében van fontos szerepe, ismert tagjai a PI3-K, Gab1 és a IRS1 fehérjék.

A RhoA fehérje szerepét a neuronális differenciációban először a neuritetrakció során igazolták. Kimutatták, hogy a RhoA fehérje aktivációja például lizozozand savval (LPA) vagy aktív RhoA fehérje expressziójával, a differenciálódott PC12 sejtekben a neuritok összeesését, retrakcióját hozza létre. Továbbá azt is megmutatták, hogy a RhoA fehérje inaktivációja például C3 toxinnal vagy domináns gátló RhoA fehérje expressziójával a neuritok növekedését idézi elő. Végül munkacsoportunkkal azt igazoltuk, hogy az NGF-indukálta neuronális differenciáció iniciációs fázisa során a RhoA fehérje inaktiválódik, majd a neurit növekedés fázisában a RhoA fehérje újra aktív állapotba kerül.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

EREDMÉNYEK

Sejtkultúrák és sejtvonalak: Kísérleteimben a patkány pheochromocytoma eredetű PC12 sejteket, illetve ezek mutánsait, valamint egyes biokémiai jellegű kísérletekben HEK293 (humán embrionális vese) sejteket alkalmaztam.

Plazmidok: HA-taggal ellátott Rho és Rac mutánsokat transziens transzfekciós kísérletekben, a His-taggal ellátott plazmidokat baculovírusokban használtam.

Transziens transzfekció: Idegen fehérjék sejtben belüli expressziójára transziens transzfekciót alkalmaztam: az Rac^{N17} domináns negatív fehérjének, a RhoA^{S188A} mutáns fehérjét expresszáltam *in vivo* kísérletekben, valamint *in vitro* kísérletekhez izoláltam vad típusú és S188A mutáns RhoA fehérjét.

Rekombináns fehérjék előállítása baculovírus expressziós rendszerben: Az így izolált fehérjéket *in vitro* foszforilációs és pull down esszékben használtam.

Sejtfrakcionálás: Kísérleteim során a RhoA fehérje inaktiválódását és célfehérjéhez való affinitását részben teljes sejttitulumon, részben membrán és citoplazma frakción vizsgáltam.

A RhoA fehérje *in vitro* foszforilációja: A PKA enzim által történő foszforiláció során radioaktív foszforral jelölt RhoA fehérjét állítottam elő, majd a célfehérjéhez való kötődését vizsgáltam ezáltal meghatározom a foszforiláció hatását a RhoA és effektorok közti kötés erősségére.

"Effector pull down" esszé: A RhoA fehérje és effektorai közötti kapcsolat kimutatására használtam. A módszer során a különböző módon kezelt PC12 sejtekből származó RhoA fehérjét a különböző effektor fehérjék Rho-kötő doménjének GST-taggal ellátott fragmentumaival reagáltattam, majd az így képződött komplexet glutation-gyöngyökkel precipitáltam.

Western blot: Az aktíválódot/inaktiválódot, továbbá a pull-down esszé során izolált fehérjék mennyiségének kimutatását kereskedelmi forgalomban kapható antitestek (RhoA, Rac, Akt) felhasználásával Western blot analízissel végeztem.

Statistikai módszerek: Minden eredmény legalább 3 független kísérlet eredményén alapul. Student T-tesztet használtam az NGF kezelés és a foszforiláció hatásának elemzésére.

1. Az NGF által indukált jelátviteli út egyes fehérjéinek azonosítása, melyek szerepet játszanak a RhoA inaktiválódásában.

Korábbi vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy rövid ideig tartó NGF kezelés határa PC12 sejtekben a RhoA fehérje inaktiválódik. A munkám első részében arra kerestem választ, hogy milyen jelátviteli molekulák közvetítik az NGF hatását a RhoA molekulához. A RhoA fehérje aktiválódásának vizsgálatához az úgynevezett "effector pull down" esszét használtam.

TRKA

Először azt határoztam meg, hogy melyik NGF receptornak van szerepe a RhoA inaktiválódásában. A nagy affinitású NGF receptor, a TRKA molekula szerepének vizsgálatához az nmf⁵ nevű PC12 sejtklónt használtam. Ebben a PC12 klónban nincs működőképes TRKA receptor. A kísérletek során megállapítottam, hogy ezekben a sejtekben az NGF kezelés nem inaktiválja a RhoA fehérjét. Ebből arra a következtetésre jutottam, hogy a TRKA NGF receptor szükséges az NGF által indukált jelátviteli út aktiválásához, mely a RhoA inaktiválódásához vezet.

Ras

Ezután a legtöbbet tanulmányozott, ezáltal legismertebb NGF neuronális differenciációt közvetítő jelátviteli utat, a Ras kis GTP-kötő fehérje által közvetített utat vizsgáltam. Az M-M17-26 nevű PC12 sejtvonalamon domináns negatív Ras fehérje expresszáldók nagy mennyiségben, melyet Dr. Szeberényi állított elő transzfekcióval. Az M-M17-26-os sejtek NGF-fel történő kezelése során az aktivált RhoA fehérje mennyisége csökkent, a vad típusú PC12 sejtekhez hasonlóan, annak jelként, hogy az NGF a Ras fehérjétől függetlenül képes gátolni a RhoA fehérjét.

Rac1

Fibroblaszt sejtekben már ismert egy hierarchikus sorrend, melyben a Cdc42 fehérje után a Rac1, majd utána a RhoA fehérje aktiválódik. Ez az eredmény felvetette azt a lehetőséget, hogy a neuronális differenciáció jelátvitelében a Rac1 közvetíti jelet a RhoA felé. Ahhoz, hogy ezt vizsgáljuk, domináns negatív/gátló Rac1 fehérjét expresszáltam PC12 sejtekben és ezekben a sejtekben

vizsgáltam az NGF hatását a RhoA fehérjére. Azt találtam, hogy a Rac1 fehérje gátlása következtében az NGF kezelés ellenére sem történt neurit növekedés a PC12 sejteken, valamint a RhoA fehérje nem inaktiválódott. Ebből arra következtettem, hogy a Rac1 fehérje szükséges az NGF és a RhoA fehérje közötti jel közvetítésében.

PI3-K

Szintén fibroblaszt sejtekben írták le, hogy a Ras-tól független jelátviteli út indul ki a receptor tirozin kinázoktól, mely során a PI3-K-on keresztül aktiválódik a Rac1 fehérje. Ezért esett a választásom arra, hogy vizsgáljam vajon a PI3-K-nak van-e szerepe az NGF és RhoA közötti jelátvitelben. Wortmanninnal és LY294002-vel, két specifikus PI3-K gátlószerekkel előkezelt PC12 sejteket kezeltem NGF-fel, majd vizsgáltam a RhoA fehérje aktiválását. Igazoltam, hogy a PI3-K gátlása gátolja az NGF hatását a RhoA inaktivációjára, ebből azt a következtetést vontam le, hogy a PI3-K fehérje szükséges az NGF által közvetített jelátviteli útban, mely során a RhoA gátódik.

A PI3-K és a Rac1 közötti kapcsolat

A PI3-K és a Rac1 fehérje közötti alá- és fölérendeltségi viszonyt kétféleképpen vizsgáltam. Egyrészt a fent említett specifikus PI3-K gátlószerekkel előkezelt PC12 sejtekben vizsgáltam, hogy az NGF kezelés hatására aktiválódik-e a Rac1 fehérje. Kísérleteimmel igazoltam, hogy ezekben a sejtekben az NGF nem tudja aktiválni a Rac1 fehérjét, tehát a PI3-K szükséges a Rac1 aktiválódásához NGF hatására. Másrészt domináns negatív Rac1 fehérje expressziójával vizsgáltam, hogy az NGF kezelés hatására létrejövő PI3-K aktiválódáshoz szükséges-e a Rac1 fehérje. A Rac1 fehérje gátlása nem akadályozta meg a PI3-K aktiválódását NGF hatására. A fent leírt kísérletekből arra következtettem, hogy a PI3-K a Rac1 fehérje felett helyezkedik el az NGF által indukált jelátviteli útban, mely során a RhoA inaktiválódik.

2. A foszforiláció szerepe a RhoA fehérje affinitásának szabályozásában a különböző effector fehérjék felé.

Kísérleteimben a RhoA fehérje aktiválásának vizsgálatára az úgynevezett effektor pull down essztét használtam. Ez a módszer azon alapul, hogy a GTP kötött, aktív RhoA fehérje kötődik a célfehérjéhez. A módszer során ezt a kötődést kihasználva GST-effektor fúziós fehérjével a RhoA

fehérje precipitálható és a lehúzott RhoA mennyisége Western blotral meghatározható. Kísérleteim kezdetén négy különböző GST-effektor fúziós fehérjét használtam, a GST-ROK, a GST-PKN, a GST-mDia és a GST-hotekin komplexeiket. Meglepetésemre az NGF kezelés hatására a különböző komplexek, különbözőképpen kötődtek a RhoA-hoz. Ahogy vártuk a GST-ROK kötött RhoA mennyisége csökkent NGF kezelés hatására, míg a másik három célfehérje fokozottabban kapcsolódott a RhoA-hoz NGF kezelés hatására. Ez az eredmény felvetette egy további aktiválási szabályozó mechanizmus lehetőségét a GTP-GDP cseré mellett. Ismert volt az irodalomból, hogy a PKA fehérje képes a RhoA fehérjét foszforilálni a 188-as szerin aminosávon. A foszforiláció számos fehérje esetében aktiválást szabályozó mechanizmus, ezért kísérleteimben azt akartam igazolni, hogy ez a RhoA esetében is így van-e.

PKA

Először azt vizsgáltam, hogy a PKA fehérjének van-e szerepe az NGF indukálta RhoA inaktiválódásban. A PKA fehérje közvetlen aktiválása dbcAMP-vel vagy Forskolinnal, az NGF-hez hasonlóan csökkentette a ROK-hoz kötődő RhoA mennyiségét és ezzel szemben növelte a PKN-hez kötődő RhoA mennyiségét. Ugyanakkor specifikus PKA gátlószerekkel előkezelt PC12 sejtekben vagy működőképes PKA fehérjét nem expresszáló PC12 sejtekben NGF kezelés hatására nem változott a RhoA fehérje affinitása sem a ROK, sem a PKN célfehérjéhez. A kísérletekből arra következtettem, hogy a PKA szükséges a jel továbbításában az NGF-től a RhoA fehérje felé.

A 188-as szerin aminosav a RhoA fehérjében

In vitro kísérletekben, radioaktív foszfor izotóp felhasználásával igazoltam, hogy a RhoA fehérjét a PKA enzim foszforilálja, továbbá azt is megmutattam, hogy a 188-as pozícióban lévő szerin aminosav az egyetlen foszforilációs hely a RhoA fehérjén, melyet a PKA foszforilál.

A foszforiláció, mint a RhoA egy újabb, másodlagos szabályozó mechanizmusa.

Végül kísérleteim utolsó fázisában azt igazoltam, hogy a GTP-kötött állapot szükséges ahhoz, hogy a RhoA fehérje kötődjön mind a ROK, mind a PKN célfehérjéhez. Továbbá *in vitro* kísérletekben kimutattam, hogy a GTP-kötött RhoA fehérje PKA általi foszforiláció után elveszti affinitását a ROK célfehérjéhez, ezzel szemben a foszforiláció tovább fokozza a RhoA-nak a PKN effektor fehérje felé irányuló affinitását. *In vivo* kísérletekben a RhoA^{S188A} mutáns fehérje expressziójával kimutattam, hogy a 188-as pozícióban lévő szerin aminosav foszforilációjának hiánya

nem csökkenti a RhoA fehérje affinitását a ROK effektorhoz és nem növeli a PKN-hez az NGF kezelést követően. Kísérleteimmel igazoltam, hogy a RhoA fehérje 188-as szerin aminoszávon történő foszforiláció – a GTP-GDP kötés mellett – alapvető fontosságú az NGF által indukált jel differenciált továbbításához a különböző effektor fehérjék felé.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám első részében az NGF által indukált, a RhoA fehérje inaktívációjához vezető jelátviteli út egyes elemeit azonosítottam. Igazoltam, hogy az NGF Ras fehérjétől független jelátviteli úton inaktiválja a RhoA fehérjét. Továbbá azt is igazoltam, hogy az NGF által indukált jel közvetítésében a TrkA, PI3-K és Rac1 fehérjék szükségesek, az előbb leírt sorrendben.

Munkám második felében igazoltam, hogy a GTP-GDP kötésen kívüli a RhoA fehérje 188-as pozíciójában lévő szerin aminoszávnak foszforilációja egy másodlagos szabályozási mechanizmus, mely hatásként a foszforiláció csökkenti a GTP kötött RhoA affinitását a ROK effektor fehérjéhez és ezzel szemben növeli a GTP kötött RhoA affinitását a PKN-hez, az mDia-hoz és a Rhotekinhez.

Bár munkám során molekuláris biológiai módszerekkel a sejten belüli mechanizmusokat vizsgáltam és eddig nem ismert részleteket írtam le, mint orvos hiszek benne, hogy munkámmal a gyakorlati orvostudomány fejlődéséhez is hozzájárulhatok. Eredményeim talán elősegítik új diagnosztikai módszerek, valamint új, specifikusabb gyógyszerek kifejlesztését. Ismert például, hogy jelenleg gerincvelő sértülést követően a gerincvelő nem regenerálódik. McKerracher munkacsoportja írta le, hogy a C3 toxin kezelés, mellyel a RhoA fehérjét gátolták, elindította a látköideg regenerációját, bár nem hozott létre teljes regenerációt. Hiszek benne, hogy azáltal, hogy megismerjük a RhoA fehérje szabályozásának újabb, eddig nem ismert aspektusait, valamint a RhoA fehérjéhez vezető jelátviteli utakat részletekben, lehetőség nyílik arra, hogy a C3 toxinai specifikusabb gyógyszert fejlesszünk ki, mellyel a teljes regeneráció elérhető lenne.

A PHD TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

1. Nusser, N., Gosmanova, E., Zheng, Y. and Tigyí, G. (2002) Nerve growth Factor Signals through TrkA, Phosphatidylinositol-3-kinase and Rac1 to Inactivate RhoA during the Initiation of Neuronal Differentiation of PC12 Cells. *J Biol Chem.* 277, 35840-35846. IF: 6,696
2. Nusser, N., Gosmanova, E., Guo, F., Luo, Y., Zheng, Y. and Tigyí, G. Phosphorylation-regulated Target Selection of RhoA Is Required for NGF-Induced Neurite Outgrowth. (submitted to *Current Biology*)

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:

1. Sarder VM, Bautista DL, Fischer DJ, Yokoyama K, Nusser N, Virág T, Wang DA, Baker DL, Tigyí G, Parrill AL. (2002) Molecular basis for lysophosphatidic acid receptor antagonist selectivity. *Biochim Biophys Acta.* 23, 309-17. IF: 3,883
2. Fischer DJ, Nusser N, Virág T, Yokoyama K, Wang Da, Baker DL, Bautista D, Parrill AL, Tigyí G. (2001) Short-chain phosphatidates are subtype-selective antagonists of lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol.* 60, 776-84. IF: 5,297
3. Lilom K, Sun G, Bunemann M, Virág T, Nusser N, Baker DL, Wang DA, Fabian MJ, Brandis B, Bender K, Eickel A, Malik KU, Miller DD, Desiderio DM, Tigyí G, Port L. (2001) Sphingosylphosphocholine is a naturally occurring lipid mediator in blood plasma: a possible role in regulating cardiac function via sphingolipid receptors. *Biochem J.* 355, 189-97. IF: 4,326
4. Lilom K, Bunemann M, Sun G, Miller D, Desiderio DM, Brandis B, Bender K, Port L, Nusser N, Tigyí G. (2000) Sphingosylphosphorylcholine is a bona fide mediator regulating heart rate. *Ann N Y Acad Sci.* 905, 308-10. IF: 1,381
5. Tigyí G, Fischer DJ, Baker D, Wang DA, Yue J, Nusser N, Virág T, Zsifos V, Lilom K, Miller D, Parrill A. (2000) Pharmacological characterization of phospholipid growth-factor receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 905, 34-53. IF: 1,381
6. Sebők Á, Nusser N, Debrecei B, Guo Z, Santos MF, Szeberényi J and Tigyí G (1999) Different roles for RhoA during neurite initiation, elongation, and regeneration in PC12 cells. *J Neurochem.* 73, 949-960. IF: 4,906
7. Fischer DJ, Lilom K, Guo Z, Nusser N, Virág T, Murakami-Murofushi K, Kobayashi S, Erickson JR, Sun G, Miller DD, Tigyí G (1998) Naturally Occurring Analogs of Lysophosphatidic Acid

Elicit Different Cellular Responses through Selective Activation of Multiple Receptor Subtypes. *Molecular Pharmacology* 54, 979-988. IF: 5,428

8. Szeberényi J, Boglári G, Komáromy L, Nusser N, Pap M, Sebők Á, Sétáló Gy, Tigyi A (1996) How molecular cell biology is taught at the University Medical School of Pécs, Hungary. *Med. Teacher* 18, 213-218.

9. Szeberényi J, Boglári G, Komáromy L, Nusser N, Pap M, Sebők Á, Sétáló Gy, Tigyi A (1996) Problem-oriented teaching of molecular cell biology. *Med. Educ.* 30, 232-234. IF: 1,367

POSZTEREK:

1. Nusser N, Zheng Y, Tigyi G (2000) Distinct activation of ROK and PKN by RhoA during NGF induced neuronal differentiation in PC2 cells. *Soc Neurosci. Abstr.* 26, 314.6, p.833

2. Sebők Á, Santos MF, Nusser N, Debreceni B, Tigyi G (1997) Dual role for RhoA in the NGF-induced differentiation of PC12 cells: opposing control over neuronal commitment versus neurite extension. *Soc Neurosci. Abstr.* 23, 241.20, p.600

3. Sebők Á, Fischer D, Nusser N, Santos MF, Zheng Y, Tigyi G (1996) Rho regulates neurite outgrowth in PC12 cells. *Soc Neurosci. Abstr.* 22, 297.6, p.737

4. Pap M, Nusser N, Szeberényi J (1995) The role of Ras proteins in nerve growth factor induced gene expression in PC12 cells. 23rd Meeting of the Federation of European Biochemical Societies. Bazel, Switzerland Aug. 13-18

5. Boglári G, Sétáló Gy, 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. Single cell techniques in signal transduction research FEBS Advanced Course. Leiden, Netherlands Apr. 29-May 5

6. Nusser N, Pap M, Szeberényi J, Cooper GM (1994) Ras-dependent and -independent regulation of early-response gene products in NGF-stimulated PC12 cells. *Abst. Fourth European Congress of Cell Biology.* Prague, Czech June 26-July 1