

**A Ras fehérje szerepe PC12 sejtek nitrogén-monoxid indukálta
differenciációjában és apoptózisában**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

dr. Bátor Judit

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs

Témavezető és programvezető: Prof. Dr. Szeberényi József



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Biológiai Intézet

2013

Bevezetés

A nitrogén-oxid szerepe, képződése, metabolizmusa

A nitrogén-oxid (NO) másodlagos messengerként szerepet játszik az intracelluláris jelátvitelben, illetve a sejtmembránon átjutva a sejtek közötti parakrin jelátviteli folyamatokban. A vérrel, a hemoglobinnal hem részéhez vagy az albuminhoz kötődve a keletkezési helyétől távolabbra is szállítható.

A nitrogén-oxid szintáz (NOS) fehérjecsald felelős a NO előállításáért. Szubsztrátként L-arginint használ, terméként a NO mellett L-citrullin keletkezik. Az enzimsald tagjai a neuronális, az endoteliális és az indukálható NOS. Az endoteliális és neuronális NOS aránylag kis mennyiségben termel NO-t, ami nem éri el a toxikus szintet. Konstitutívan expresszálódnak, Ca^{2+} , illetve kalmodulin hatására aktiválódnak. Az indukálható NOS lipopoliszacharid, citokinek, tumor nekrozis faktor α (TNF α) hatására expresszálódik. Az indukálható NOS aktivációjában nem vesz részt a kalmodulin, a képződött fehérje a szubsztrát depléciójáig vagy a saját lebomlásáig folyamatosan (akár több napig) aktív. Az általa termelt NO adott esetben nagyobb, már toxikus koncentrációt is elérhet.

In vivo körülmények között a NO hatásait többféle tényező befolyásolja: egyrészt a potenciális célfehérje NOS-tól való távolsága, hiszen a képződött NO, mint szabadgyök nagyon reakcióképes. Másrészt a képződött NO koncentrációja, hiszen különböző fehérjék módosításához eltérő NO-koncentráció szükséges. Például a cGMP-út aktiválásához jóval kisebb mennyiségű NO is elég, mint a p53 fehérje módosításához. Sőt, egy adott fehérjén belül is különböző aminosav-oldalláncok módosulása eltérő NO koncentráció hatására következik be. Harmadrészt, élő szervezetben belül más lebontó mechanizmusok is érvényesülnek, mint akár egy sejtenyészeten, ezáltal általában csökkent és/vagy rövidebb idejű hatással számolhatunk.

A NO hatásai

A képződött NO intracellulárisan serkenti a **szolubilis guanilat-cikláz** (sGC) működését (annak hem részéhez kötődve), a képződött ciklikus GMP (cGMP) többek között a protein kináz G (PKG) aktiválásán keresztül fejti ki hatásait.

A NO kovalensen kötődhet fehérjék meghatározott aminosav oldalláncaihoz. A folyamat a **nitroziláció** nevet kapta. A -NO csoport cisztein aminosavhoz kötődése a nitrozáció vagy S-nitroziláció. A tirozin módosítása -NO₂ csoport által a nitráció folyamata.

Egyes kutatók leírják a triptofán aminosav nitrációját NO hatására, ennek biológiai jelentősége még kevésbé ismert. A fehérjék konformációját és aktivitását befolyásolja a nitrozilációjuk, ennek a módosított aminosav elhelyezkedésétől függően aktiváló és inaktíváló hatása egyaránt lehet.

Vas vagy rézionnal komplexet képző fehérjékben a NO a fémmel is kapcsolódhat.

Az oxigén szabadgyökök által kiváltott oxidatív stresszhez hasonlóan, a nagyobb mennyiségű NO általános sejtkárosító hatást vált ki, melyet (kémiaileg pontosan) **nitrozatív stressznek** neveznek. A nitrozatív stressz végső soron sejthalálhoz vezethet.

NO-donorok

A NO hatásának modellezésére kísérleti körülmények között sokszor NO-donorokat használnak. Ezek könnyebben adagolhatók a gáz halmazállapotú NO-hoz képest, viszont hátrányuk, hogy a NO mellett egyéb termékek is képződnek belőlük, és nem zárható ki, hogy a tapasztalt hatások egy részéért ezek a „melléktermékek” felelősek. Valamint nem biztos, hogy az adott donor-vegyület egyenletes sebességgel, illetve dózissal arányos mértékben termel NO-t. Munkacsoportunk nitroprusszid-nátriumot (SNP, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$) használ a kísérletei során. Ebből NO mellett nátrium-cianid képződik. A toxikus dózisu SNP-ből képződő nátrium-cianid azonban nem éri el azt a koncentrációt, ami toxikus a sejtekre.

A NO szerepe a neuronális differenciáció jelátvitelében

Az NGF jelátvitelének PC12 sejtekben

A munkám során használt PC12 patkány pheochromocytoma sejtek idegsejt növekedési faktor (NGF) hatására differenciálódnak. Az NGF hatásait a TrkA (tropomyosin-related kinase A) és a p75 neurotrofin receptorok (p75NTR) közvetítik. Az NGF kötődését követően több jelátviteli útvonal párhuzamos aktivációja figyelhető meg: a Ras - extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK) útvonal tartós aktivációja szükséges a neuritnövekedéshez, a foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K) - Akt útvonal döntően a sejt túléléséért felelős, a foszfolipáz C γ (PLC γ) útvonal szerepe a rendelkezésre álló adatok alapján kevésbé meghatározó.

Az aktivált NGF-receptorhoz adapter fehérjék közvetítésével kapcsolódó guanin-nukleotid kicserélő faktorok (GEF) aktiválják a Ras fehérjét. A Ras fehérje aktivitása kritikus: a domináns gátló Ras-t expresszáló sejtvonalak NGF hatására nem képesek differenciálódni.

Az aktiválódott Ras fehérje a Raf és mitogén-aktivált protein kináz kináz (MKK) enzimek közreműködésével serkenti az ERK-et. A tartós ERK-foszforiláció, valamint a fehérje nukleáris transzlokációja szükséges a neuronális differenciációhoz.

Az ERK-nek számos célfehérjéje van. Többek között a p90 riboszomális S6 kináz (p90RSK) fehérje közvetítésével aktiválja a cAMP-reszponzív elemet kötő (CREB) transzkripciós faktort. A CREB a Ras-ERK-en kívül számos más jelátviteli út (például cAMP-PKA, cGMP-PKG, Ca²⁺-kaldmodulin, PI3K-Akt) aktivációját követően is foszforilálódhat. A CREB gátlásával is gátolható a neuronális differenciáció.

A Ras-ERK útvonal közreműködésével indukálódik a neuronális NOS is NGF-kezelt PC12 sejtekben. Az általa termelt NO hatására a p53 fehérje közreműködésével a p21WAF1 (wild-type p53-activated fragment 1) ciklin dependens kináz inhibitor indukálódik. A ciklin D1 mennyisége szintén megnövekszik, és ez a ciklin PC12 sejtekben a proliferáció serkentése helyett a differenciáció folyamatában játszik szerepet: az NGF hatására a p21WAF1 és ciklin D1 expresszió fokozódásával párhuzamosan lecsökken az S-fázisba lépő sejtek száma. Az S-fázisban lévő sejtek arányának csökkenését a DNS-polimeráz egyik alegységének, a PCNA-nak (proliferating cell nuclear antigen) csökkent expressziója jelzi. Az NGF antiproliferatív hatása domináns gátló RasH-t expresszáló PC12 sejtekben nem érvényesül.

Növekedési faktor receptorok aktivációjakor a PI3K foszfatidil-inozitol-biszfoszfát (PIP₂) foszforilálásával foszfatidil-inozitol-triszfoszfátot (PIP₃) termel, ennek hatására aktiválódik a protein kináz B-ként is ismert Akt fehérje. Az Akt enzim számos célfehérjéje elsősorban a túlélési jelátvitelben játszik szerepet. A PIP₃ defoszforilálásával a foszfatáz és tenzin homológ (PTEN) fehérje felelős a PI3K hatásainak gátlásáért. A differenciációhoz a PI3K-Akt jelátviteli út közvetlenül nem szükséges, bár egyes kutatócsoportok szerint pozitív szerepe lehet benne.

A NO szerepe az NGF jelátvitelében

A NO önmagában nem idéz elő differenciációt PC12 sejtekben, a neuronális differenciáció folyamatában viszont fontos szerepet játszik. Ezt alátámasztja, hogy NOS-gátlók alkalmazása gátolja a differenciációt. A NO által aktivált sGC-cGMP jelátviteli útvonal nem szükséges a PC12 sejtvonal neuronális differenciációjához. Ennek alapján feltételezhető, hogy a tapasztalt hatások háttérében fehérjenitroziláció áll.

Több, a neuronális differenciáció jelátvitelében szerepet játszó fehérje potenciálisan nitrozilálható. A differenciáció szempontjából a nitrozilációjuknak serkentő és gátló szerepe

egyaránt lehet, valamint a jelátviteli fehérjék közül többről még nem bizonyított, hogy *in vivo* körülmények között is nitrozilálódnak-e NGF-kezelés hatására.

A NO antiapoptotikus hatásai

A NO kis koncentrációban citoprotektív hatású, nagyobb koncentrációban (ennek mértéke a sejttípus függvényében változik) sejthalált idéz elő. Növekedési faktor- illetve szérummegvonás, oxidatív stressz, halálligandok indukálta apoptózis kivédhető NO-dal. Bizonyos sejttípusokban antiapoptotikus hatása a cGMP jelátviteli úton érvényesül. A PKG segítségével a PI3K-Akt útvonalat aktiválja, illetve a CREB foszforilációját és az antiapoptotikus hatású Bcl2 fehérje expresszióját fokozza. Más sejttípusokban a sGC-cGMP út szerepe kérdéses, így az antiapoptotikus hatás várhatóan nitrozilációs folyamatok eredménye. A Ras nitrozilációjának protektív szerepét is igazolták.

Az antiapoptotikus hatás nemcsak a sejt túlélését segítő jelátviteli folyamatok aktiválásával, hanem az apoptózisban pozitív szerepet játszó fehérjék gátlásán keresztül is érvényesülhet. Például a nitrált citokróm c a nem nitráltnál kevésbé aktiválja az apoptozómát. Katalitikus doménjük S-nitrozilációjával a kaspázok aktivációja gátolható.

A NO-indukálta sejthalál

Kellően nagy koncentrációban a NO nitrozatív stresszt indukál, így vezet sejthalálhoz. Az ehhez szükséges koncentráció sejttípusonként jelentősen eltérő: a szívizomsejtek, fogpulpasejtek pusztulásához vezető 3-4 mM SNP dózis a tízszerese a PC12 sejtek sejthalálához szükséges 200-400 μ M SNP koncentrációnak. Nemcsak a szükséges dózis, hanem a sejthalál típusa is különbözhet: sejtenyészetben egyaránt találunk nekrozissal, apoptózis kaspáz-függő, illetve -független típusával elpusztuló sejteket. A domináns sejthalál-típus a tenyésztési körülményeknek, az aktuálisan használt sejttípus glikolitikus kapacitásának és egyéb tényezőknek a függvénye. Általában a NO kisebb koncentrációban inkább apoptózist, nagyobb koncentrációban inkább nekrozist okoz.

A NO által okozott nekrozis

A nagy koncentrációjú NO által okozott nekrozis hátterében az ATP-szintézis gátlása áll. Legfontosabb a légzési lánc komplexeinek irreverzibilis gátlása, amiért fehérjenitroziláció

felelős. Ilyenkor a sejt csak a glikolízis által tud ATP-t termelni, amennyiben ez nem elég, nekrozissal elpusztul.

A NO által előidézett kaszpáz-független, programozott sejthalál

A poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) aktivációja szintén megtörténik NO hatására. A PARP többféle sejthalál-típusban is szerepet játszhat. Hatásának egyik fő közvetítője az apoptózis indukáló faktor (AIF). Ez a nyugalmi sejtben mitokondriális fehérje felszabadulva a sejtmagba transzlokálódik. A sejtmagban endonukleáz-aktiváció révén indít el sejthalált, amely az apoptózishoz hasonlóan kromatin-kondenzációval jár.

A NO proapoptotikus hatásai

Az Akt kináz központi szerepet tölt be PC12 sejtek és számos más sejttípus túlélésében. Inaktiválása önmagában többféle sejthalál kiváltója lehet. A PI3K-Akt jelátviteli útvonal működését több ponton befolyásolja a NO: alacsonyabb koncentrációban nitrozilációval gátolja a PTEN fehérje működését, míg magasabb koncentrációban az Akt enzim működését is. Ennek megfelelően alacsonyabb dózisu NO összességében serkenti az Akt fehérje aktivitását, míg magasabb koncentrációban a gátlás érvényesül.

A MAPK-ok családjába tartozó stresszkinázok (c-Jun N-terminális kináz /JNK/ és p38 mitogén aktivált protein kináz /p38MAPK/) a legkülönbözőbb celluláris stresszhatásokra, többek között nagy dózisu NO-kezelésre aktiválódnak. Számos célfehérjét foszforilálnak a sejt stresszválasza érdekében. Átmeneti aktivációjuk a túlélést is serkentheti, tartós aktivációjuk apoptózishoz vezet.

A NO farmakológiai dózisban endoplazmatikus retikulum (ER) stresszt is előidéz. A nem megfelelő térszerkezetű fehérjék felhalmozódása a sejtben úgynevezett „unfolded protein response”-t (UPR) vált ki. A stresszválasz részeként a translációs aktivitás csökken. Ennek mechanizmusa, hogy a foszforilált eukarióta translációs iniciációs faktor 2 α -alegységének (eIF2 α) jelenlétében a cap-függő transláció iniciációja gátolt. Az eIF2 α foszforilációját több fehérjekináz képes végrehajtani. Az eIF2 α tartós foszforilációja a cap-függő transláció iniciációjának általános gátlásával apoptózishoz vezethet.

A p53 fehérje kezeletlen sejtekben is expresszálódik. Celluláris stresszhatás nélkül a p53 fehérje mennyisége mégis kevés, mert a képződött fehérje az ubikvitin-proteaszóma rendszer által lebomlik. Különböző celluláris stresszhatásokra, illetőleg stimulusokra stabilizálódhat, így a mennyisége emelkedik. A stabilizációjában különböző poszttranszlációs

módosulások (többek között a fehérje foszforilációja) vesznek részt. A p53 fehérje ilyenkor antimitogén hatást fejt ki vagy apoptózist indukál. A p53 fehérje aktivációjával az apoptózis mitokondriális (intrinszik) útvonala aktiválódik. A p53 apoptózist előidéző hatását a sejtmagban (mint transzkripciós faktor), vagy közvetlenül a mitokondriumra hatva fejtheti ki. Közvetlen mitokondriális hatásainak pontos mechanizmusa még nem világos: a proapoptotikus Bax és/vagy Bak aktiválására, illetve az antiapoptotikus Bcl2 vagy Bcl-xL inaktiválására is találunk adatokat. A p53 fehérje által indukált apoptózis során a multidomén proapoptotikus Bcl2 családtagok által létrehozott fehérjecsatornákon keresztül többek között citokróm c áramlik a citoszolba. Részvételével felépül az apoptoszóma, aktiválva az iniciátor kaszpázok közé tartozó prokaspáz-9-et. A hasított kaszpáz-9 effektor kaszpázok, többek között a prokaspáz-3 hasításával indukál apoptózist.

Néhány példa a NO jelentőségére patológiás folyamatokban

Számos adat utal arra, hogy a túlzott mennyiségben, illetve nem megfelelően szabályozott módon termelődő NO szerepet játszik a neurodegeneratív betegségek kialakulásában. A túlzott mennyiségű NO jelenléte nem megfelelő konformációjú fehérjék felhalmozódásához vezethet, ez például közrejátszik Alzheimer- és Parkinson kór kialakulásában is. Sokféle idegrendszeri kórképben gyulladáshoz vezető reakció, mikroglia és asztrocita aktiváció figyelhető meg. Ezekben a sejtekben az iNOS indukálódik és nagyobb mennyiségű NO-t termelhet, mely a környező idegsejteket elpusztítja.

Célkitűzések

A NO kis koncentrációban jelátviteli molekulaként, toxikus koncentrációban celluláris stresszt előidézve vesz részt az idegsejtek szignál transzdukciós folyamataiban. Munkám célja kis dózisu SNP-kezelés NGF-jelátvitelt moduláló hatásainak, valamint toxikus dózisu SNP citotoxikus hatásainak tesztelése volt a PC12 sejtek modell rendszerében. Domináns gátló RasH fehérjét expresszáló PC12 szubklónt használva elsősorban a RasH fehérjének a NO-szignalizációban betöltött szerepét vizsgáltam.

PC12 sejtek NGF indukálta neuronális differenciációja során igazolni kívántam:

- az SNP antiproliferatív hatásának Ras-függő vagy Ras-független voltát,

- kombinált SNP- és NGF-kezelés hatását Ras-gátlás esetén a neuronális differenciációra,
- az SNP és NGF által befolyásolt, a neuronális differenciációban részt vevő jelátviteli utak aktivációját.

Citotoxikus dózisu SNP-kezelés indukálta apoptózisban szerepet játszó fehérjék kimutatásával vizsgáltuk:

- a Ras-gátlás hatásait a túlélési szignalizációt közvetítő Akt- és ERK-út aktivitására,
- a Ras fehérje befolyását stressz-jelátviteli utak aktivációjára,
- a p53-aktiváció és -indukció Ras-függését,
- az SNP és a Ras fehérje hatását a kaszpáz-aktivációra.

Kísérleti anyagok és módszerek

Felhasznált anyagok és sejt kultúrák

Kísérleteinkhez vad-típusú PC12 patkány pheochromocytoma sejt vonalat, valamint ennek különböző szubklónjait használtuk. Az M-M17-26 sejt vonal nagy mennyiségben expresszál domináns gátló RasH-t (N17 mutáns). A sejt vonalakat 5% hőinaktivált főtális borjúsérummal és 10% szintén hőinaktivált lószérummal kiegészített, 4.5 g/l glükózt tartalmazó Dulbecco által módosított Eagle médiumban (DMEM) tenyésztettük. Nitrogén-oxid donorként nitroprusszid nátriumot (SNP) alkalmaztunk.

A proliferáció vizsgálata

A proliferáció vizsgálatához lyukanként 5×10^3 sejtet ültettünk ki 24 lyukú sejttenyésztő lemezre. Másnap, illetőleg 3 nap múlva ismételtelen nem toxikus dózisu SNP-vel és/vagy NGF-fel kezeltük a sejteket. A 6 napos kezelési idő végén tripszin segítségével leválasztottuk a sejteket a tenyésztőedény aljáról, majd Bürker-kamrás számolással meghatároztuk a sejtek abszolút számát az egyes lyukakban. Az eredmények statisztikai analizését Student-féle t-próbával végeztük. Szignifikánsnak a $p < 0.05$ értékeket tekintettük.

Western-blot analízis

Lemezenként 5×10^6 sejtet ültettünk ki 100 mm-es tenyésztőlemezre. A különböző dózisu SNP-vel és/vagy NGF-fel történő kezeléseik végén fehérjét izoláltunk. A sejtek líziséhez proteáz- és foszfatázgátlókkal kiegészített RIPA puffert használtunk. A kaszpázok kimutatásához Chaps-pufferrel izoláltunk fehérjéket. A fehérjelizátumokat (30-50 μ g fehérjét) 0.1% SDS-tartalmú 12-15%-os poliakrilamid gélben elektroforézissel elválasztottuk, PVDF membránra transzferáltuk. A következő antitesteket használtuk: anti-P-Akt(Ser473), anti-

Akt, anti-hasított kaszpáz-9, anti-hasított kaszpáz-3, anti-P-CREB(Ser133), anti-P-eIF2 α , anti-eIF2 α , anti-P-ERK, anti-P-JNK, anti-JNK, anti-P-p38, anti-p38, anti-P-p53(Ser15), anti-p21, anti-p53, anti-PCNA, anti-ERK1, HRP-konjugált másodlagos – anti-nyúl illetve anti-egér – antitestek. A membránokat ECL-reakciót követően Kodak géldokumentációs rendszer segítségével fényképeztük.

A differenciáció morfológiai vizsgálata

A neuronális differenciáció vizsgálatához lyukanként 10^3 sejtet ültettünk ki 24 lyukú sejtenyésztő lemezre. Másnap, illetőleg 3 nap múlva ismételtén SNP-vel és/vagy NGF-fel kezeltük a sejteket. A differenciálódott sejtek arányát 2, 4 és 6 napos kezelés után mikroszkópos vizsgálattal határoztuk meg, mintánként 200 sejtet értékelve. Az eredmények statisztikai analízisét Student-féle t-próbával végeztük. Szignifikánsnak a $p < 0.05$ értékeket tekintettük.

A sejtek életképességének vizsgálata

Az élő sejtszám biokémiai meghatározásához WST-1 esszét használtunk. A WST-1 reagens egy, az élő sejtek mitokondriális dehidrogenázai által átalakított formazánsó. Lyukanként 2×10^4 sejtet ültettünk ki 24 lyukú sejtenyésztő lemezre. Másnap különböző koncentrációjú SNP-oldattal kezeltünk. A 3 napos kezelési idő lejártakor a sejteket 10%-os WST-1 reagens-oldattal inkubáltuk 4 órán keresztül. Az átalakítását követően sárgás színű formazán termék kontrollhoz viszonyított fényelnyelését ELISA-olvasó segítségével, 450 nm hullámhosszon határoztuk meg. Az eredmények statisztikai analízisét Student-féle t-próbával végeztük. Szignifikánsnak a $p < 0.05$ értékeket tekintettük.

A magmorfológia vizsgálata

Lyukanként $1-2 \times 10^5$ sejtet ültettünk ki 6 lyukú sejtenyésztő lemezre. Másnap különböző dóziszú SNP-vel adott ideig, vagy adott dóziszú SNP-vel különböző ideig kezeltünk. A kezelési idő lejártakor a sejteket paraformaldehid 4%-os oldatával fixáltuk, majd 0.1% Triton X-100 segítségével permeabilizáltuk. A sejtek DNS-ét 0.5% Hoechst 33258 oldattal festettük, a mintákat Vectashield H-1000 fluoreszcens lefedőszerrel fedtük le. Az apoptózisra jellemző kromatinkondenzációt vagy -fragmentációt mutató sejtek arányát fluoreszcencia mikroszkóp segítségével kvantifikáltuk. Az eredmények statisztikai analízisét Student-féle t-próbával végeztük. Szignifikánsnak a $p < 0.05$ értékeket tekintettük.

A DNS-fragmentáció vizsgálata

Lemezenként 5×10^6 sejtet ültettünk ki 100 mm-es tenyésztőlemezre. A különböző dóziszú SNP-vel végzett kezelés után a sejteket a saját médiumukba kapartuk fel, 2000 fordulat/perc sebességgel, 5 percig centrifugáltuk, és 0.5 % Triton-X 100, 5 mM Tris pH 7.4, 5 mM EDTA tartalmú pufferben lizáltuk. A centrifugálás utáni felülúszóból DNS-t izoláltunk fenol-kloroformos fehérjekicsapást alkalmazva, majd RNáz emésztés után 1.8%-os agaróz gélben futtattuk a mintákat. DNS-festékként etídium-bromidot vagy SYBR Goldot használtunk. A géleket Kodak géldokumentációs rendszerrel fotóztuk.

Eredmények

A citotoxikusnál kisebb koncentrációjú SNP hatásai

Az SNP Ras-független úton gátolja a sejtproliferációt

A NO sejtproliferációt gátló hatásának tesztelésére vad-típusú PC12 és domináns gátló RasH-t erőteljesen expresszáló M-M17-26 sejtjeinket 5 vagy 50 μ M koncentrációjú SNP-vel kezeltük 6 napon keresztül. Az alkalmazott dózissal arányos mértékű volt a NO proliferációt gátló hatása mind a vad-típusú PC12, mind az M-M17-26 sejtvonalban.

Mivel ismert, hogy az NGF antiproliferatív hatását a Ras-ERK-p53-p21WAF1 jelátviteli út közvetíti, vizsgáltuk, hogy ezek a fehérjék felelősek-e az SNP antiproliferatív hatásának közvetítéséért is. A p53 fehérje az SNP-vel kezelt vad-típusú PC12 és M-M17-26 sejtekben egyaránt dóziszfüggően, tehát Ras-független úton keresztül indukálódott. Az SNP sejtosztódást gátló hatásával összhangban az S-fázis marker PCNA expresszióját mindkét sejtvonalban gátolta az SNP-kezelés.

Az NGF és az SNP együttes hatása sem idéz elő neuronális differenciációt M-M17-26 sejtekben

PC12 sejtekben 0.5, 5 vagy 50 μ M koncentrációjú, maximum 6 napos SNP-kezelés önmagában nem idézett elő differenciációt. 50 ng/ml NGF hatására a sejtek differenciálódni kezdtek, amely 2 nap múlva már szignifikáns volt a kontrollhoz viszonyítva, és 6 nap alatt elérte a 64 %-ot. Az NGF-fel együtt adott 5 μ M SNP átmenetileg gyorsította a neuritnövekedést, hiszen 2 napos kombinált kezelés után a differenciálódott sejtek száma magasabb volt a csak NGF-fel kezelt sejtekéhez képest. 50 μ M SNP némileg lassította az NGF indukálta differenciációt. M-M17-26 sejtek nem differenciálódtak sem a különböző dózisú SNP, sem 50 ng/ml NGF-kezelés hatására. Mivel az SNP az M-M17-26 sejtek proliferációját is gátolta, megkíséreltük SNP-vel és NGF-fel együtt kezelve előidézni az M-M17-26 sejtek differenciációját, ez azonban egyik alkalmazott SNP-dózissal sem sikerült. Kis dózisú NO, illetve a sejtciklus gátlása tehát nem képes oldani a Ras/ERK út blokkjának differenciációt gátló hatását.

Az SNP nem fokozza az NGF ERK-foszforilációt serkentő hatását

Az irodalmi adatok alapján várható módon az NGF-kezelés erőteljes ERK-foszforilációt eredményezett PC12 sejteinkben. Vad-típusú PC12 sejtekben az SNP kezelés által előidézett ERK-foszforiláció az NGF hatásához képest elenyésző volt. Az SNP és az NGF együttes adásakor az ERK foszforilációja nem fokozódott tovább a csak NGF-fel kezelt mintához viszonyítva. Az ERK fehérje aktivációját a domináns gátló RasH jelenléte nagymértékben gátolta mind az NGF-fel, mind az SNP-vel kezelt M-M17-26 sejtekben. Ebben a sejtvonalban a kombinált SNP és NGF kezelés sem indukált a PC12 sejtekéhez hasonló mértékű ERK-foszforilációt.

Az SNP nem befolyásolja az NGF által indukált Akt-foszforilációt

Az Akt fehérje PC12 sejtekben NGF hatására Ras-független jelátviteli úton keresztül foszforilálódva aktiválódik. Az Akt foszforilációja 473. pozíciójű szerin aminosavon ennek megfelelően NGF-kezelés hatására mindkét sejtvonalban fokozódott. Nem toxikus koncentrációjú SNP a dózissal arányosan mindkét sejtvonalban kissé serkentette az Akt foszforilációját, viszont kombinált kezelés esetén nem fokozta az NGF hatását.

A CREB foszforilációja Ras-függő mind SNP-, mind NGF-kezelés hatására

Kísérleteinkben a CREB fehérje foszforilációs helyei közül a 133. pozíciójű szerin aminosav foszforilációját vizsgáltuk, mert az NGF jelátvitelében ez játszik kulcsszerepet. NGF-kezelés hatására az irodalom alapján elvárt módon vad-típusú PC12 sejtekben erőteljes CREB-foszforilációt detektáltunk. Az alkalmazott SNP-kezelés is a CREB dózisfüggően fokozott foszforilációjához vezetett PC12 sejtekben. 50 μ M SNP hatására a CREB foszforilációja az NGF-kezelt mintához hasonló mértékű volt. Az SNP hatása nem szinergisztikus az NGF-kezelés által előidézett foszforilációval. M-M17-26 sejtekben a CREB foszforilációja nem fokozódott sem SNP, sem NGF-kezelés hatására, valamint a két szer együttes adásakor sem.

Citotoxikus koncentrációjú SNP hatásai

Az SNP hatása a sejtek életképességére

A WST-1 esszé eredményei alapján mindkét sejtvonal életképessége az alkalmazott SNP-dózissal arányosan csökkent, 400 μ M SNP gyakorlatilag teljes sejtpusztulást idézett elő.

Az M-M17-26 sejtvonal némileg érzékenyebbnek bizonyult az SNP citotoxikus hatására, mint a vad-típusú PC12 sejtek.

Az SNP apoptotikus hatásának kimutatása a kromatinban

A kromatin-kondenzáció megjelenése apoptózist, esetleg apoptózis-szerű sejthalált valószínűsít. Kondenzált kromatinú sejtmagok mind a vad-típusú PC12, mind az M-M17-26 sejtek (minimum 100 μ M dózissal, illetve minimum 4 óráig) SNP-kezelését követően megjelentek, az M-M17-26 sejtvonal ismét érzékenyebbnek bizonyult az SNP hatására.

Az apoptózis markereként tartja számon az irodalom az internukleoszomális DNS-fragmentációt. Vad-típusú PC12 sejtekben 200 μ M SNP hatására, míg M-M17-26 sejtekben már 100 μ M SNP hatására kimutatható mértékű volt a DNS-fragmentáció.

Az általunk alkalmazott tesztek alátámasztják, hogy az M-M17-26 sejtvonal valamivel érzékenyebb az SNP citotoxikus hatására, mint a vad-típusú PC12 sejtek, valamint, hogy a domináns sejthalál-típus SNP-kezelt sejtjeinkben az apoptózis.

Az SNP-kezelés kétfázisú ERK-foszforilációt idéz elő

A Ras-ERK út aktivitása hozzájárulhat a PC12 sejtek túléléséhez, bár nem nélkülözhetetlen ahhoz. PC12 sejtekben az SNP-kezelés az alkalmazott dózissal arányos ERK-foszforilációt idézett elő. Az erősen toxikus, 400 μ M-os SNP-kezelés kétfázisú ERK-foszforiláció emelkedést okozott, egy korai, 2-4 óráig, és egy késői, 18 óráig tartó foszforilációs maximummal. Az M-M17-26 sejtvonalban az ERK-foszforiláció nagymértékben gátolt volt. A korai aktiváció teljesen hiányzott, míg a késői foszforiláció megjelent, bár jóval gyengébben, mint a vad-típusú PC12 sejtekben. A kisebb mértékű ERK-foszforiláció hozzájárulhat az SNP megnövekedett citotoxicitásához ebben a sejtvonalban.

Az SNP csak erősen toxikus koncentrációban gátolja az Akt-foszforilációt

Kísérleteinkben az Akt fehérje 473. pozíciójú szerin aminosavon történt foszforilációját csak a legnagyobb alkalmazott koncentrációjú (400 μ M) SNP gátolta, hosszabb idejű kezelés (legalább 18 óra) hatására PC12 sejtekben. A gátlás az M-M17-26 sejtekben is a Ras aktivitásától függetlennek bizonyult. Eszerint Akt-közvetítette túlélési jelátviteli útvonal eltérő aktivitásával a két sejtvonal eltérő SNP-érzékenysége nem magyarázható.

Az SNP stresszkinázok által közvetített jelátviteli utakat aktivál

Az általános celluláris stresszreakció részeként mindkét sejtvonalban az alkalmazott SNP-dózissal arányos és elhúzódó (24 órás kezelés után is kimutatható) JNK és p38MAPK aktivációt detektáltunk. Az endoplazmatikus retikulum stressz jelzésekként mindkét sejtvonalban megfigyelhetővé vált az eIF2 α dózis-függő, tartós foszforilációja, hasonló időbeli lefutással, mint a stresszkinázoké. Az M-M17-26 sejtvonal esetében egyik vizsgált kináz aktivációja sem volt nagyobb mértékű, mint a PC12 sejtek esetében. Ez arra utal, hogy bár mindkét sejtvonal stresszválaszához hozzájárulhatnak a fenti kinázok által aktivált jelátviteli útvonalak, az M-M17-26 sejtek fokozott SNP érzékenységeért viszont nem tehető felelőssé.

A p53 fehérje foszforilációja és stabilizációja SNP-kezelés hatására

A JNK és p38MAPK számára többek között a p53 fehérje 15. szerin aminosava is foszforilációs hely. A 15. pozíciójú szerinen bekövetkezett foszforiláció gátolja a p53 fehérje magból történő exportját, ezáltal a proteasomális lebontását. Az SNP-kezelés hatására bekövetkező foszforiláció dózisfüggő, és hasonló időbeli lefutású, mint a stresszkinázok aktivációja. Kifejezettebb a vad-típusú PC12 sejtvonalban, mint a domináns gátló Ras-t expresszáló sejtekben, így, bár hozzájárulhat a p53 stabilizálásához, nem járul hozzá az M-M17-26 klón fokozott SNP érzékenységéhez.

Kaspázaktiváció SNP-kezelés hatására

A prokaspáz-9 dózissal arányos hasítását detektáltuk legalább 18 órás SNP-kezelés hatására vad-típusú PC12 sejtekben. Az M-M17-26 sejtvonalban a kaspáz-9 aktivációja jóval nagyobb mértékű volt, mint a vad-típusú PC12 sejtekben. A prokaspáz-3 hasítása is kimutatható volt a kaspáz-9 aktivációjával arányosan mindkét sejtvonalban. A fokozott kaspázaktiváció magyarázatul szolgál az M-M17-26 sejtvonal fokozott SNP érzékenységére.

Megbeszélés

A NO antiproliferatív hatása Ras-független

PC12 sejtekben az NGF antiproliferatív hatását a Ras fehérje aktivációján keresztül fejt ki. Ha az NGF antiproliferatív hatása gátolt, nem jön létre PC12 sejtekben differenciáció.

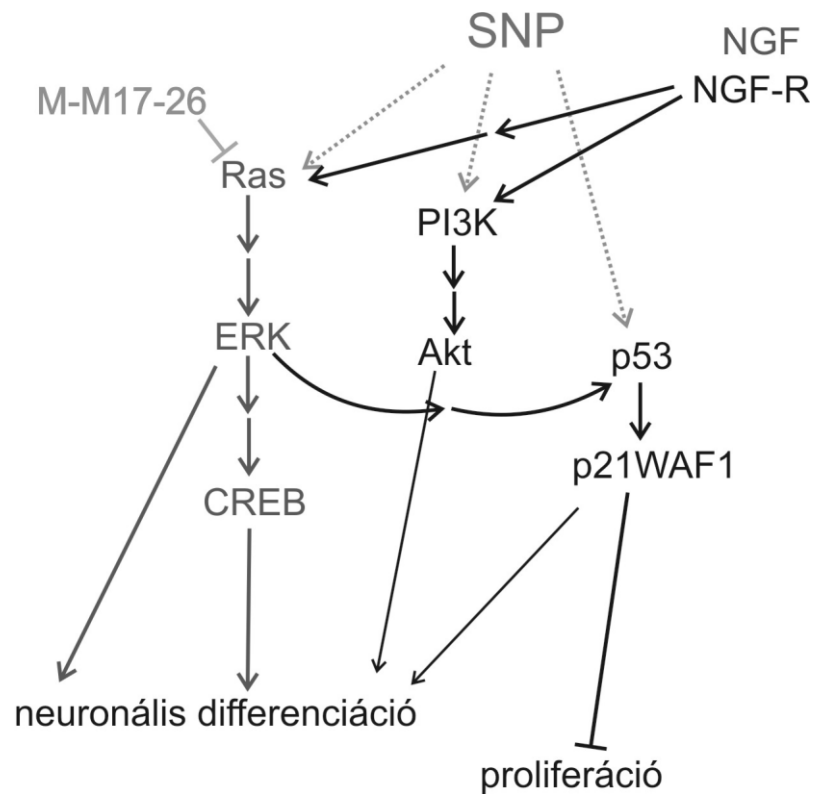
Viszont a proliferatív hatású epidermális növekedési faktor (EGF), antiproliferatív szerek (például dbcAMP, SNP) egyikével adva, PC12 sejtek differenciációjának előidézésére képes. Ezek alapján vizsgáltuk, hogy a Ras fehérje gátlásának negatív hatása a PC12 sejtek neuronális differenciációjára kivédhető-e NO-donor adásával.

Összehasonlítottuk vad típusú PC12 és egy domináns gátló RasH-t expresszáló PC12 szubklón (M-M17-26 sejtek) antiproliferatív válaszát SNP kezelésre. A két sejtvonal közt nincs különbség az SNP hatására bekövetkező p53-indukcióban, valamint a PCNA-expresszió csökkenésében. Eredményeink szerint a Ras fehérjének nincsen szerepe az SNP sejtosztódást gátló hatásának közvetítésében. A NO hatásai dózissal arányosan érvényesülnek, azonban a differenciációs kísérleteknél alkalmazott 50 μ M-nál nagyobb mennyiségű SNP kezelésnek már toxikus hatásai is vannak. Az 5 és 50 μ M SNP még nem indukál sejthalált, amint az a citotoxicitási kísérletekből kimutatható.

Az együttes NGF és SNP kezelés nem idéz elő neuronális differenciációt M-M17-26 sejtekben

5 μ M SNP-kezelés NGF-fel kombinálva kissé felgyorsítja a vad típusú PC12 sejtek differenciációját, azonban végeredményben nem változtatja meg a differenciálódott sejtek arányát. Bár az 50 μ M SNP hatékonyabban gátolja a sejtosztódást, mégis gátolja a PC12 sejtek differenciációját is, feltételezhetően az általa okozott ATP depléció miatt.

Az M-M17-26 sejtek NGF jelenlétében a kezeletlen sejtekhez hasonló mértékben proliferálnak, viszont proliferációjuk kis dózisú SNP-kezeléssel gátolható. Mégsem következik be neuritnövekedés NGF és SNP együttes hatására, tehát a Ras fehérje gátlását NO adásával nem lehet áthidalni. Ennek egyik lehetséges oka, hogy a NO önmagában nem stimulálja az endogén Ras-fehérjék GTP-kötését a domináns gátló Ras jelenlétében. Az M-M17-26 sejtek differenciációja Ras-aktiváció hiányában is előidézhető NGF és különböző másodlagos messenger analógok együttes alkalmazásával. Eszerint a differenciáció elmaradásának másik magyarázata, hogy a NO nem stimulál olyan jelátviteli mechanizmust, amely a Ras-blokkot megkerüli. A kombinált SNP- és NGF-kezelés tanulsága az is, hogy a sejtciklus leállítása, még ha szükséges is a neuritnövekedéshez, Ras által közvetített neuritogén szignálok nélkül nem képes a nyúlványnövekedést elindítani.



1. ábra: Az SNP és NGF-kezelés együttes hatása PC12 és M-M17-26 sejtekben. →: aktiváció/indukció, →→: többlépcsős aktiváció/indukció, | : gátlás

Az SNP-kezelés nem képes oldani az NGF indukálta ERK- és CREB-foszforiláció domináns negatív RasH okozta gátlását

A nem toxikus dózisu SNP által előidézett ERK-foszforiláció jóval kisebb mértékű, mint az NGF hatására bekövetkező ERK-foszforiláció, valamint kombinált kezelése során az SNP az NGF hatását nem fokozza. Kis dózisu SNP-vel kezelt M-M17-26 sejtekben nem foszforilálódik az ERK, és az SNP NGF-fel együtt adva sem képes oldani a Ras-ERK út gátolt aktivációját.

A jelátviteli út további fontos tagja a CREB transzkripciós faktor, mely megfelelő körülmények között ERK-től független jelátviteli utakon keresztül is aktiválható. A mi kísérleti rendszerünkben azonban a CREB-foszforiláció Ras-függőnek bizonyult, nemcsak az NGF, hanem az SNP-kezelés hatására is. Ezek szerint mindkét szer a Ras-ERK út aktiválásával idéz elő CREB-foszforilációt. Egy tanulmány szerint a CREB transzkripciós faktor a PC12 sejtek neuronális differenciációja során indukálódó gének harmadának

promóteréhez kötődik. Ennek ismeretében nem meglepő, hogy a CREB aktivációjának elmaradása a differenciáció elmaradását eredményezi.

A differenciációs kísérletek összefoglalásaként elmondható, hogy a NO hatás részben (antiproliferatív hatás) képes a gátolt Ras-funkciót helyettesíteni, azonban nem aktivál (legalábbis kellő mértékben) a neuritnövekedéshez vezető útvonalakat (1. ábra).

Az SNP többféle jelátviteli úton keresztül indukál sejthalált PC12 sejtekben

Az SNP többféle sejthalált is indukálhat PC12 sejtekben. Amelyik útvonal a sejttenyészet adott sejtjében a legerősebben/leggyorsabban aktiválódik, az lesz felelős az adott sejt pusztulásáért. Ennek morfológiailag látható jele, hogy különböző mikroszkópos megjelenésű, különböző fokban kondenzált kromatinú sejtmagokat láthatunk SNP-kezelt sejteinkben. A kevésbé kondenzált kromatinú sejtmag az apoptózis korai fázisa mellett jele lehet apoptózis-szerű sejthalálnak, kaspáz-független apoptózisnak is. Sejtvonalainkban a kaspáz-aktiváció időben később következik be, mint az első kondenzált kromatinnal rendelkező sejtmagok megjelenése. Ez amellelt, hogy bizonyítja az apoptózis mitokondriális útjának aktiválódását, egyben jelzi azt is, hogy kaspáz-független sejthalál is indukálódik az SNP-vel kezelt sejtekben.

A toxikus koncentrációjú SNP-kezelés a Ras jelátviteli utat használva indukál kétfázisú ERK-foszforilációt

A Ras fehérje aktivációja számos jelátviteli utat aktiválhat, köztük proapoptotikus útvonalakat is. Mivel a PC12 sejtvonal kevésbé érzékeny, mint az M-M17-26 sejtek, a proapoptotikus Ras-effektorok aktivációja nem valószínű. A PC12 sejtvonalban a PI3K-Akt útvonal aktivációja Ras-független, ezt alátámasztja az is, hogy nincs különbség a két sejtvonal között az Akt 473. helyen álló szerin aminosavának foszforilációjában. Az ERK fehérje SNP általi korai aktivációja teljes mértékben Ras-függő, így a korai foszforilációért a nitrozilálódó Ras fehérje, esetleg valamelyik, a jelátvitelben a Ras előtt helyet foglaló fehérje aktivációja tehető felelőssé (például egy, vagy akár többféle Ras-t aktiváló növekedési faktor receptornak a vélhetően nitrozilációval bekövetkező aktivációja). A késői (18 órás SNP-kezelésre bekövetkező) ERK-foszforiláció megjelenik M-M17-26 sejtekben is, tehát részben Ras-független. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy az ERK peroxinitrit jelenlétében a Ras, illetve MKK1 fehérjétől függetlenül is aktiválódhat. A késői ERK-aktiváció ezen kívül lehet a MEKK1, egy, a Ras-út által nem szabályozott MAPKKK aktivációjának következménye.

Ez a fehérje elsősorban a JNK aktivációjáért felelős, másodlagosan a MKK1 foszforilálásával az ERK-et is aktiválhatja.

A toxikus koncentrációjú SNP-kezelés Ras-funkciótól függetlenül stressz-jelátvitelt aktivál

A p38MAPK és a JNK foszforilációja időbeli lefutását tekintve megegyezik a p53 fehérje 15. pozíciójú szerin aminosavának foszforilációjával, így bármelyikük felelőssé tehető a p53 aktivációjáért. A 15. pozíciójú szerin aminosav foszforilációja eredményezheti a p53 fehérje stabilizációját, viszont önmagában nem magyarázza a két sejtvonal eltérő SNP-érzékenységét (2. ábra).

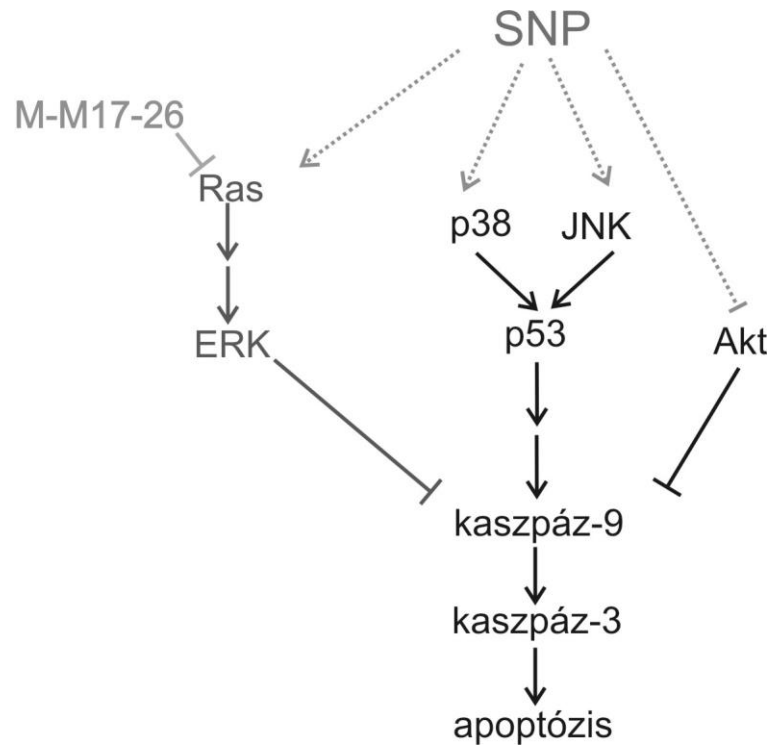
Az SNP-kezelés, valamint a domináns gátló RasH expressziója befolyásolja a p53 fehérje expresszióját

A p53 fehérjének számos izoformája létezik, melyek különbözőképpen szabályozzák a sejtproliferáció, differenciáció, apoptózis folyamatait. Az egyes izoformák egymás jelátviteli hatásait is képesek módosítani. A membránokon detektálható csíkok közül a p53 fehérje „klasszikus”, 53 kDa-os α izoformája mennyiségének emelkedése vad-típusú PC12 és M-M17-26 sejteinkben hasonló mértékű, ez valószínűsíti más izoformák részvételét az M-M17-26 sejtek fokozott apoptózisának kiváltásában. A 46-48 kDa-os izoformák mindegyike részt vehet apoptózis előidézésében, ezek SNP-kezelés hatására mindkét sejtvonalban indukálódnak. A 35 kDa-os $\Delta 133p53\alpha$ izoforma a p53 α domináns gátló fehérjéjeként hat, eszerint a p53 által kiváltott apoptózist is gátolja. A kezeletlen M-M17-26 sejtekben detektálható csík toxikus dóziszú SNP-kezelés hatására eltűnik, így a fehérje gátló hatásának megszűnése segítheti a p53 indukálta apoptózist. Az egyes izoformák megbízható azonosítása monoklonális antitestekkel végzett további kísérleteket igényelne.

Az M-M17-26 klón fokozott érzékenysége az SNP apoptotikus hatására a fokozott kaszpáz-9 és -3 aktiváció következménye

Túlélést serkentő jelátviteli folyamatok gátolják a kaszpázok aktivációját. Többek között a PI3K-Akt útvonal még nem azonosított célfehérjéje és az ERK fehérje foszforilálhatja a prokaspáz-9-et. Mindegyik foszforiláció gátló hatású. Esetünkben az Akt fehérje defoszforilációja megegyező a két sejtvonalban, tehát nem lehet felelős az eltérő kaszpáz-aktivációért. Az ERK fehérjék foszforilációja M-M17-26 sejtekben gátolt, eszerint a

kaszpáz-9 foszforilációja, tehát aktivációjának gátlása sem valósulhat meg (2. ábra), hozzájárulva a sejtvonal fokozott SNP-érzékenységéhez.



2. ábra: Az SNP apoptotikus hatásai PC12 és M-M17-26 sejtekben. →: aktiváció/indukció, →→: többlépcsős aktiváció/indukció, | : gátlás

Összefoglalás

A nem toxikus koncentrációjú SNP-kezelések alapján:

- Az SNP antiproliferatív hatása Ras-független.
- Az NGF és SNP kombinált kezelés nem idéz elő neuronális differenciációt M-M17-26 sejtekben.
- Az SNP-kezelés nem képes oldani az NGF indukálta ERK- és CREB-foszforiláció domináns negatív RasH okozta gátlását.

A toxikus koncentrációjú SNP-kezelés többféle jelátviteli utat aktivál:

- A Ras jelátviteli utat használva kétfázisú ERK-foszforilációt indukál.
- A Ras-funkciótól függetlenül stressz-jelátvitelt aktivál.
- Az SNP-kezelés, valamint a domináns gátló RasH expressziója befolyásolja a p53 expresszióját.
- Az M-M17-26 klón fokozott érzékenysége az SNP apoptotikus hatására a fokozott kaspáz-9 és -3 aktiváció következménye.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Szeberényi József professzor úrnak a kísérletek technikai kivitelezésétől kezdve a cikkek és disszertáció megírásáig nyújtott minden támogatásáért. Úgy tanított, hogy közben nagy teret engedett a saját elképzeléseimnek, terveimnek, ugyanakkor fáradhatatlanul korrigálta, finomította azokat.

Szeretnék köszönetet mondani Varga Juditnak, aki közvetlen munkatársamként tudományos diákkörös kora óta velem dolgozik. Kísérleti eredményeinek rendelkezésre bocsátásával, türelmes támogatásával nagymértékben megkönnyítette a munkámat. Szintén köszönöm Varga Juditnak és Dr. Galgóci Szilviának a disszertáció átolvasását, véleményezését.

Köszönet illeti Potzné Árvai Zitát, munkacsoportunk asszisztensét, a kísérletek technikai kivitelezésében nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom Dr. Berta Gergelynek a statisztikai elemzések betanításáért, ifj. Dr. Sétáló Györgynek az immuncitokémiai preparátumok konfokális mikroszkópos vizsgálata során nyújtott segítségéért és Dr. Kiss Katalinnak, aki rendelkezésemre bocsátotta az előbírálati anyagában szereplő, még nem publikált kísérleti eredményeit, segítve ezzel saját eredményeink értelmezését.

Szeretnék köszönetet mondani az Orvosi Biológiai Intézet minden dolgozójának, aki munkájával hozzájárult a kutatásunk sikereihez.

Ezúton is szeretném megköszönni Dr. Ábrahám Hajnalka és Dr. Polgár Beáta gondos előbírálását. Észrevételeikkel sokat segítettek a disszertáció végleges formába öntésében.

A PhD-kutatás keretében született publikációk

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Bátor. J., Varga. J., Berta. G., Barbakadze. T., Mikeladze. D., Ramsden. J., Szeberényi, J.: Sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, fails to bypass the block of neuronal differentiation in PC12 cells imposed by a dominant negative Ras protein. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2012 Sep; 17(3): 323-332. **IF: 1.953**

Bátor, J., Varga, J., Szeberényi, J.: The effect of sodium nitroprusside on survival and stress signaling in PC12 rat pheochromocytoma cells expressing a dominant negative RasH mutant protein. *Biochem. Cell Biol.* 2013. Aug; 91(4): 230-235. **IF: 2.915 (2012)**

Előadások és poszterek

Bátor J., Oláh G., Szeberényi J.: Ras-fehérjék farnezilációjának és nitrozilációjának szerepe az NGF jelátvitelében, XI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2003.

Szeberényi, J., Bátor, J.: The role of Ras farnesylation and nitrosylation in nerve growth factor signaling, XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2004. (Absztrakt: E-35)

Bátor J., Varga J., Szeberényi J.: Nitrogén-oxid hatása PC12 sejtek jelátvitelére, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, 2005. (Absztrakt: E85)

Bátor, J. and Szeberényi, J.: The effect of farnesylation and nitrosylation on NGF signaling in PC12 cells, 30th FEBS Congress - 9th IUBMB Conference, Budapest, Magyarország, 2005., *FEBS J.* 272. 326, 2005. (Abstract E4-009P)

Bátor J., Varga J., Harci A., Stark B., Tarjányi O., Szeberényi J.: Nitroziláció hatása PC12 sejtek neuronális differenciációjára, Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006.

Varga J., Bátor J., Tarjányi O., Szeberényi J.: A Ras fehérje szerepe PC12 sejtek nitrogén-oxid indukálta apoptózisában, Semmelweis Egyetem PhD Tudományos Napok, Budapest, 2009. (Absztrakt: E-VIII/6)

Bátor J., Varga J., Szeberényi J.: Ras-függő és Ras-független jelátviteli utak szerepe PC12 sejtek nitrogén-monoxid indukálta apoptózisában, XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, 2009. (Absztrakt: ES04)

Bátor J., Varga J.: Nitrogén monoxid neuronális differenciációt és apoptózist befolyásoló jelátvitelének Ras-függése, *Biológus Doktoranduszok Konferenciája*, Pécs, 2009.

Bátor, J., Varga, J., Szeberényi, J.: Pro-apoptotic and pro-survival effects of sodium nitroprusside in PC12 cells expressing a dominant inhibitory RasH protein, 1st International Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2012. (Absztrakt O-03)

Bátor, J., Varga, J., Szeberényi, J.: Effect of sodium nitroprusside on nerve growth factor induced differentiation of PC12 cells, 2nd International Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2013. (Absztrakt O-13)

Egyéb, a témához nem kapcsolódó közlemények

Barbakadze, T., Zhuravliova, E., Sepashvili, M., Zaalishvili, E., Ramsden, J. J., Bátor, J., Szeberényi, J., Mikeladze, D.: Production of homocysteine in serum-starved apoptotic PC12 cells depends on the activation and modification of Ras. *Neurosci Lett.* 2005 Dec 31; 391(1-2): 56-61
(IF: 1.898)

Szeberényi, J., Bátor, J., Berta, G., Fábrián, Z., Kiss, K., Komáromy, L., Pap, M. and Sétáló, G. Jr.: Experiments in Molecular Cell Biology: A Problem-oriented Basic Science Course in a Medical Curriculum. In: „Problem-based Learning 2004: A Quality Experience? (eds. H.Crabtree, A. Darvill, K. Holland, S. Mackay, M. McLoughlin, D. Oakey, J. Supple) pp. 80-89. University of Salford, 2006.

Előadások és poszterek

Horváth G., Bátor J., Szeberényi J.: A RasN és RasK fehérjék szerepe az idegsejt növekedési faktor jelátvitelében, IX. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2000. (Absztrakt P21)

Bátor, J., Szeberényi, J.: The role of Ras farnesylation in NGF signal transduction in PC12 cells, XII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2004. (Absztrakt: P-34)

Bátor, J., Szeberényi, J.: The effect of a farnesyl transferase inhibitor on NGF signaling in PC12 cells, 7th International Conference of Anticancer Research, Korfu, Görögország, 2004., *Anticancer Res.* 24. 3430, 2004. (Abstract #31)

Bátor J., Varga J., Szeberényi J.: Manumycin kezelés hatása PC12 sejtek NGF indukálta differenciációjára, Semmelweis Egyetem PhD Tudományos Napok, Budapest, 2006. (Absztrakt: P-II/18.)

Varga J., Bátor J., Stark B., Harci A., Tarjányi O., Szeberényi J.: Nitrogén-oxid szerepe PC12 patkány phaeochromocytoma sejtek apoptózisában, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007. (Absztrakt: P114.)

Varga J., Harci A., Stark B., Péter M., Bátor J., Szeberényi J.: p53 fehérje szerepe PC12 patkány phaeochromocytoma sejtek nitrogén-oxid indukálta apoptózisában, Semmelweis Egyetem PhD Tudományos Napok, Budapest, 2007. (Absztrakt: P-II/5.)

Bátor, J., Varga, J., Péter, M., Pap, M., Szeberényi, J.: The role of p53 protein in nitric oxide induced cell death of PC12 cells, EMBO Meeting on Cellular Signaling and Molecular Medicine, Horvátország, Cavtat, 2008. (Absztrakt: P48)

Varga J., Bátor J., Szeberényi J.: Nitric oxide-induced apoptosis of PC12 cells, 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, Athén, Görögország, 2008. (Absztrakt: PP7A-90)

Varga J., Bátor J., Péter M.: A p53 fehérje szerepe PC12 sejtek nitrogén-oxid indukálta apoptózisában, Biológus Doktoranduszok Konferenciája, Pécs, 2009

Bátor, J., Fábrián, Z., Pap, M., Sétáló G. Jr., Csatáry, L. K., Szeberényi, J.: Defects in endoplasmic reticulum stress and interferon signaling in Newcastle disease virus resistant PC12 cells, 6th Swiss Apoptosis Meeting, Bern, Svájc, 2010. (Absztrakt: No. 04.)

Bátor J., Fábrián Z., Pap M., ifj. Sétáló G., Csatóry K. L., Szeberényi J.: Az interferon jelátvitel és az endoplazmatikus retikulum stressz jelátvitelének zavarai Newcastle betegség vírusra rezisztens PC12 sejtekben IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011. (Absztrakt O092)

Varga J., Bátor J., Péter M., Pap M., ifj. Sétáló G., Szeberényi J.: Domináns gátló p53 fehérjét expresszáló PC12 sejtek fokozottabban érzékenyek a nitrogén-oxid apoptotikus hatására, IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011. (Absztrakt O093)

Varga J., Bátor J., Pap M., ifj. Sétáló G., Szeberényi J.: PC12 cells expressing a mutant p53 protein are more susceptible to the cytotoxic effects of sodium nitroprusside, 2nd International Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2013. (Absztrakt O-12)