

Endoplazmatikus retikulum stressz vizsgálata patkány sejt modelleken

Balogh András

Témavezető: Pap Marianna
Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola
Doktori Iskola vezetője: Sümegi Balázs
Programvezető: Szeberényi József
2014

1 BEVEZETÉS

A krónikus endoplazmatikus retikulum (ER) stressz bimodális stresszor. Nemkívánatos, amikor az ER stressz kiterjedt sejtpusztuláshoz vezet és különböző patológiás folyamatok kialakulásához járul hozzá (pl. atherosclerosis, neurodegeneratív betegségek, diabetes, ischaemia/reperfúzió károsodás esetében), másfelől azonban az ER stressz által indukált sejthalál prosperáló és biztató terápiás célpontja lehet a daganat terápiának.

1.1 FEHÉRJESZINTÉZIS ÉS FOLDING AZ ER-BAN

1.1.1 FOLDING AZ ER-BAN

Az újonnan szintetizált polipeptidláncok térszerkezetének kialakítása (foldingja) a sejtben mind ko-, mind poszttranszlációs szinten történik. A folding egy szigorúan szabályozott és kontrollált komplex mechanizmus, amely során a fehérjék eléri helyes háromdimenziós szerkezetüket. Az ER-ban számos chaperon, foldáz, izomeráz, oxidoreduktáz és ezek kofatorai vesznek részt a folding folyamatában.

Amennyiben a fehérje foldingja nem helyesen megy végbe, úgy misfolded/unfolded fehérjéről beszélünk. Az unfolded fehérjék nem lépnek be az anterográd transzportba. Nem megfelelő folding esetén a hibás fehérjéket chaperonok ismerik fel, és amennyiben a nem megfelelő térszerkezet tartósan fennáll, úgy a hibás fehérje degradálódik.

A misfolded polipeptidek oligomerizálódhatnak, aggregálódhatnak és autofágia által kerülhetnek eltávolításra. A nem aggregálódott molekulák a Sec61 transzloconon keresztül hagyják el az ER-ot, poliubikvitinálódnak és az úgynevezett ER-asszociált protein degradáción (ERAD) esnek át.

A helyes konformációjú fehérjéket cargo receptorok ismerik fel, majd a fehérje-receptor komplex belép az Golgi apparátus irányába tartó anterográd transzportba. A Golgi apparátusban ezek a proteinek szortírozódnak attól függően, hogy membrán-, lizoszomális vagy szekréción fehérjéről van szó.

1.2 UNFOLDED PROTEIN RESPONSE

Amennyiben a folding zavart szenved, úgy unfolded/misfolded fehérjék maradnak és halmozódnak fel az ER lumenében. Mind fiziológias, mind patológias hatások egyaránt a fehérje folding zavarát okozhatják. Ez a proteinek ER-ban történő retenciójához vezethet, ER stresszt okozva. A sejt az ER stresszre adott válasza az úgynevezett unfolded protein response (UPR). Az UPR indukálja a sejt adaptációs folyamatait, növelheti a fehérjeszintetizáló kapacitást, csökkentheti a szekréción útra kerülő fehérjék mennyiségét és elősegítheti a misfolded fehérjék degradációját. Amennyiben az ER stressz krónikus és/vagy igen kiterjedt mértékű, úgy az UPR programozott sejthalált indukálhat.

1.2.1 AZ ER STRESSZ UPR SZENZORAI

Az ER stresszre adott válaszként három, az ER membránjában található szenzorfehérje aktiválódik, következményesen különböző jelátviteli utakat indukálva. Ezek a szenzorok a következők: aktiváló transzkripciós faktor 6 (ATF6), inozitol-függő enzim 1 (IRE1) és a protein kináz R (PKR)-szerű ER kináz (PERK). Ezen fehérjék inaktív állapotukban az ER lumenében a BiP/GRP78/Hspa5 chaperon

fehérjéhez kötötten szekvesztrálódnak. Amennyiben unfolded fehérjék halmozódnak fel az ER lumenében, a BiP molekulák a fent említett fehérjékről disszociálódnak és aktiválódik az UPR három, fent említett (ATF6, IRE1, PERK) jelátviteli útja.

1.2.2 AZ IRE1 ÚTVONAL

Az aktivált IRE-1 molekulák homo-oligomereket képeznek. Az oligomerek monomerjei autofoszforilálódnak és így az IRE1 RNáz aktivitása is megnő. Az IRE1 az X-box binding protein transzkripciósi faktort (XBP1) kódoló mRNS-t hasítja és így bizonyos UPR-gének átírását indukálja. Tartósan fennálló ER stressz esetén tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2)-függő módon az IRE1 a c-Jun N-terminális kináz (JNK) és p38 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) stresszkinázokat aktiválja és apoptózist indukál.

1.2.3 A PERK ÚTVONAL

A PERK egy szerin/treonin specifikus fehérjekináz, amely az eukarióta transzlációs iniciációs faktor 2α -át (eIF2 α) foszforilálva attenuálja a globális fehérjeszintézist. Az eIF2 α következményeként szelektíven megnő az aktiváló transzkripciósi faktor 4 (ATF4) mRNS transzlációja. A képződött ATF4 transzkripciósi faktor UPR-célgéneket indukál, többek között a C/EBP homológ protein (CHOP) mennyiségét növelve meg. Mindhárom UPR-jelátviteli út konvergál a CHOP fehérjéhez és megnöveli annak mennyiségét. A CHOP számos Bcl-2 családba tartozó fehérje expresszióját szabályozza és ezáltal a programozott sejthalálban játszik fontos szerepet.

1.2.4 AZ ATF6 ÚTVONAL

Az ATF6 BiP-től történő disszociációját követően a teljes hosszúságú ATF6 a Golgi apparátusba transzlokálódik. Itt hasítódik, majd a hasított, aktív N-terminális fragmentum (tATF6) a sejtmagba történő transzlokációját követően különböző ER chaperonok (pl. BiP) és ERAD-gének átírását indukálja.

1.2.5 A BCL-2 CSALÁDTAGOK SZEREPE AZ ER STRESSZBEN

Az ER-stressz által indukált apoptózisban számos pro- és antiapoptotikus Bcl-2 családtag vesz részt. A proapoptotikus Bax (Bcl-2-asszociált X protein) és Bak (Bcl-2-agonista/killer) fehérjék kritikus szerepet játszanak az UPR-indukálta apoptózisban. Ezen fehérjék az IRE1 α -val képeznek komplexet és stabilizálják annak aktív formáját. A Bim (Bcl-2-interacting mediator of cell death) és PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) a Bax és Bak oligomerizációján keresztül képesek a mitokondrium külső membránját permeabilizálni következményes citokróm c-kiáramlást okozva és így hozzájárulnak az apoptoszóma kialakulásához.

1.3 A PI-3K/AKT/GSK-3 β JELÁTVITELI UTAK SZEREPE A SEJTTÚLÉLÉSBEN

A foszfatidilinozitol 3-kináz (PI-3K)/Akt jelátviteli út kulcsfontosságú szabályozója számos celluláris folyamatnak beleértve a metabolizmust, fejlődést, proliferációt és sejttúlélést.

A sejtekben növekedési faktorok és bizonyos citokinek hatására a sejtmembrán foszfatidilinozitol (3,4) biszfoszfát és foszfatidilinozitol 3,4,5-tiszfoszfát mennyisége megnő. Ezek a membránlipidek a Pleckstrin homológia (PH) doménnel rendelkező fehérjék (többek között Akt) aktivációját váltják ki.

Az Akt fehérje a Ser473 és Thr308 aminosavakon történő foszforilációja következtében aktív állapotba kerül és foszforilálja célfehérjeit, elősegítve így a sejttúlélést és a proliferációt.

A glikogén szintáz kináz-3 β (GSK-3 β) egy konstitutívan aktív szerin/treonin specifikus fehérjekináz, amely számos kiemelt fontosságú celluláris folyamatot szabályoz (pl. glikogén metabolizmus, transzkripció, transláció, sejtciklus, apoptózis). Számos jelátviteli út (pl. PKA, Akt, PKC, p90RSK, p70S6K) aktiválódása a GSK-3 β következményes gátlásához vezet a GSK-3 β Ser9-es foszforilációján keresztül. A GSK-3 β -nak mindezidáig közel 50 szubsztrátját azonosították. Ezek közül számosnak egy előzetes, ún. „priming” foszforiláción kell átesnie +4-es pozícióban lévő szerin aminosavon ahhoz, hogy a GSK-3 β foszforilálhassa. A GSK-3 β szubsztrátjai között fellelhetőek translációs faktorok, sejtciklust szabályozó fehérjék, az apoptózisban szerepet játszó molekulák és transzkripciós faktorok is. A GSK-3 β ismert szerepet játszik a DNS-károsodás, hypoxia, ER-stressz és növekedési faktor megvonás által indukált programozott sejthalálban.

1.3.1 A CREB TRANZKRIPCIÓS FAKTOR SZEREPE AZ EMLŐS SEJTEKBEN

A cAMP reszponzív elem kötő fehérje (CREB) egy emlős sejtekben ubikviter módon expresszálandó transzkripciós faktor, amely fontos szerepet játszik a neuronális differenciációban, proliferációban, az atherosclerosis kialakulásában és bizonyos daganatok kialakulásában is. A CREB a DNS CRE szekvenciájához homo- vagy heterodimer formában kötődik és célgének expresszióját szabályozza. A CREB Ser133-as (S133) aminosavának foszforilációja által kötődik a CREB-kötő protein vagy a p300 fehérjékhez, így aktiválva a transzkripciót. A S133-as foszforiláció konszenzusszekvenciát hoz létre a CREB Ser129-es (S129), GSK-3 β általi foszforilációjához. Mind a mai napig nem eldöntött kérdés, hogy a CREB S129-es foszforilációja a CREB-függő transzkripcióra milyen hatással van, növeli vagy csökkenti-e a CREB DNS-kötését és transzkripciós aktivitását.

1.4 ER STRESSZOROK

Az ER homeosztázisának megzavarása ER stresszt és következményes UPR-t von maga után. Ez mind *in vivo*, mind *in vitro* kiváltható különböző stresszorok által. EGTA, A23187 ionofór, ionomycin vagy thapsigargin általi kezelés az ER Ca²⁺ pooljának depletálását vonja maga után. A dithiothreitol (DTT) a fehérjék diszulfid hídjainak megzavarásával, a tunicamycin (TM) az N-kötésű glikoziláció gátlásán keresztül okoz *in vitro* ER stresszt. Krónikus alkoholexpozíció hatására a különböző szervezetekben ER stressz lép fel *in vivo* acetaldehid képződés, oxidatív stressz, homociszteinképződés és a Ca²⁺ háztartás zavara miatt.

1.4.1 VÍRUS INDUKÁLTA ER STRESSZ

A vírusok kettősszalú replikációs intermedierjeit a sejtekben a kettősszalú RNS-függő protein kináz (PKR) nevű fehérje ismeri fel. A PKR a PERK homológja. A PERK-hez hasonlóan aktív állapotában képes a globális fehérjeszintézist leállítani. Célmolekulái között szerepel az eIF2 α is, amelynek foszforilációja a globális fehérjeszintézis attenuációját okozza, így gátolva a vírus replikációját. Bizonyos vírusok (pl. flavivírusok, hantavírusok és egyes paramyxovírusok) képesek BIP expressziót indukálni. A különböző ER fehérjék indukációjával a vírusok az ER fehérjeszintézis kapacitását növelik bizonyos határig, amely hatékonyabb víruspartikulum szintézist tesz lehetővé. Azonban az ER egyes vírusok által okozott túlterhelése biztató alternatívája lehet a

daganatterápiának, mivel bizonyos vírusok az ER-stressz segítségével (részben) p53-független úton képesek sejthalált indukálni.

1.5 ONKOLÍTIKUS VÍRUSOK

Az onkolitikus vírusok tumorszelektív ágensek és így biztató eszközei lehetnek a daganatterápiának. Míg a daganatsejtek az onkolitikus vírusok által elpusztulnak, addig a normális sejtek túlélnek a vírusszaporítást. Az onkolitikus vírusok tumorelles hatása az alábbi mechanizmusoknak tudható be:

- virális vektor általi transzgen expressziója,
- vírusreplikáció általi direkt sejtlízis,
- virális fehérje általi direkt citotoxicitás,
- tumorelles immunmoduláció,
- kemo- és radioterápia iránti szenzitivizáció.

Az onkolitikus vírusok között szerepelnek természetesen előforduló, attenuált és genetikailag módosított vírusok is. Az onkolitikus vírusok lehetnek adenovírusok (ONYX-015, H101, CGTG-102, Ad5-Delta24GD, CV706, CV787), reovírusok (pl.: Reolysin), Herpes simplex vírus (Pl., Talimogene, Iaherpaprepvec, NV1020, H103), himlővírusok (JX-594, GL-ONC-1, GM-CSF), picornavírusok (pl.: Seneca Valley vírus), Newcastle betegség vírusok (pl.: MTH-68/H, PV701, NDV-HUJ).

Míg a Newcastle betegség vírus emberben (enyhe, influenzaszerű tünetektől eltekintve) nem okoz megbetegedést, addig a természetes gazdáiban (madarakban) súlyos pandémiákért felelős. Az attenuált MTH-68/H (more than hope-68/Hertfordshire) vakcina szelektív, apoptózist indukáló citotoxikus aktivitással rendelkezik transzformált emlősejtekben. Mindeközéig csak korlátozott információ áll rendelkezésre az MTH-68/H klinikai hatásosságát illetően, azonban az MTH-68/H bizonyos, a konvencionális terápiával szemben rezisztens daganattal rendelkező tumoros betegek túlélését javította. Az MTH-68/H-kezelés az alábbi szempontok miatt lehet ígértes daganatelles ágens:

- az MTH-68/H emberben nem patogén,
- a vírus nem mutatja antigén-rekombinációnak jelét, stabil genommal rendelkezik,
- a vírusgenom nem integrálódik a gazdasejt genomjába, így a random integráció és inszerció mutagenézis valószínűsége kizárt,
- az MTH-68/H p53-független módon képes apoptózist indukálni.

2 CÉLKITŰZÉSEK

Az elvégzett kísérletek célja az ER stressz vizsgálata volt patkány sejt kultúrákon, amelyhez két kísérleti rendszer került felállításra.

I) A TM gátolja az N-kötésű glikozilációt, így ER stresszhez és UPR-hez vezet *in vitro*. A GSK-3 β az irodalmi adatok szerint az ER stressz egyik kulcsmolekulája és képes a CREB fehérjét S129-en foszforilálni. A GSK-3 β ER-stresszben és a CREB fehérje S129-es és S133-as foszforilációjában betöltött hangsúlyos szerepét figyelembe véve a következő kísérleteket kívántuk elvégezni:

- a) PC12 patkány pheochromocytoma sejteket stabilan transzfektálni vad típusú és mutáns CREB-fehérjéket kódoló expressziós plazmidokkal. A mutáns CREB fehérjék S129-es és/vagy S133-as pozícióban nem képesek foszforilálódni (S129A, S133A, és kettős mutáns S129A-S133A).
 - b) Meg kívántuk határozni a TM IC₅₀ és IC₈₀ koncentrációját vtPC12 sejtekben.
 - c) VtPC12 sejtek, vtCREB-et overexpresszáló sejtek és mutáns CREB-et expresszáló sejtek túlélését kívántuk összehasonítani TM-kezelés után apoptózis és ATP esszék segítségével.
 - d) Jellemezni kívántuk ezen sejtvonalakban az ER stressz és UPR jelátviteli utakat TM-kezelést követően.
 - e) Vizsgálni kívántuk ezen sejtekben a GSK-3β ER stresszben betöltött szerepét GSK-3 inhibitor LiCl, SB-216762 és GSK-3-specifikus knock-down kezelések jelenlétében.
 - f) Vizsgálni kívántuk a fent említett sejtekben a különböző Bcl-2 családtagok expresszióját TM-kezelés hatására.
 - g) Jellemezni akartuk a Bim fehérje citoskeletonhoz történő asszociációját konfokális mikroszkópiával.
 - h) Patkány vaszkuláris simaizomsejteket, Rat-1 fibroblasztsejtvonalat és vtPC12 sejteket vtCREB-et kódoló expressziós vektorral történő transzfektálását követően meg kívántuk határozni ezen sejtek túlélését TM-kezelés hatására LiCl jelenlétében.
- II) Ismert, hogy az attenuált MTH-68/H Newcastle betegség vírus vakcina ER-stresszt vált ki vtPC12 sejtekben. Ennek figyelembevételével az alábbi pontokat kívántuk vizsgálni vtPC12 sejtek 12 órás MTH-68/H általi fertőzését követően.
- a) A fertőzött sejtek transzkriptomát akartuk meghatározni MTH-68/H fertőzést követően cDNS chip segítségével.
 - b) A kapott eredményeket qRT-PCR segítségével kívántuk validálni.
 - c) Funkcionális gén-annotációs klaszter eszköz segítségével azonosítani kívántuk a fertőzés hatására megváltozott génextpressziójú jelátviteli utakat.

3 FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 SEJTKULTÚRA

A PC12 sejteket Dulbecco's Modified Eagle's Mediumban (Sigma, St. Louis MO, USA) tenyésztettük 4500 mg/l glükóz, 4 mM L-glutamin, 110mg/l Na-piruvát, 5% főtális borjú szérum és 10% ló szérum jelenlétében (Gibco, Carlsbad, CA, USA), a továbbiakban, mint magas szérumtartalmú médium. A vtCREB-et overexpresszáló vagy mutáns CREB-et expresszáló PC12 sejtvonalak médiumát 200 µg/ml G418-szulfáttal egészítettük ki. A Rat-1 sejtvonalat 10% újszülött borjú szérumot tartalmazó RPMI-1640 médiumban (Sigma) tenyésztettük 90,91 U/ml penicillin (Sigma), 90,91 ng/ml streptomycin (Sigma) és 19,18 ng/ml gentamycin (Sigma) jelenlétében. A primer patkány vaszkuláris simaizom sejteket (RVSM) 7 hetes hím Sprague Dawley patkányból izoláltunk. A sejteket az aorta mechanikus feldolgozását és enzimátikus emésztését követően az izolált simaizom sejteket SmGM médiumban tenyésztettük (Lonza, Basel, Svájc) SmGM-2, EGF, FGF, inzulin

és gentamycin/amphotericin B SingleQuotes-2 (Lonza) additívok jelenlétében. A sejtek fenotípusát simaizom-aktin-specifikus indirekt immuncitokémiával igazoltuk.

3.2 PC12 SEJTEK FERTŐZÉSE MTH-68/H NEWCASTLE BETEGSÉG VÍRUSSEL GÉNEXPRESSZIÓS ANALÍZIS CÉLJÁBÓL

Az exon-chip analízishez 10^6 vtPC12 sejtet fertőztünk az IC_{50} értéknek megfelelő (12,87 partikula/sejt) koncentrációjú MTH-68/H vírussal 12 órán át.

3.3 IRÁNYÍTOTT MUTAGENEZIS

Az irányított mutagenezist Stratagene QuickChange Site-Directed Mutagenesis kittel (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) hajtottuk végre a gyártó utasításait követve. A primerek a következők voltak (a mutációk félkövéren jelölve): S129A forward primer: 5'-GGGAAATTCTT**GCC**AGGAGGCCTTCC-3', S129A reverse primer: 5'-GGAAGGCCTCCT**GGCA**AGAATTTCCC-3', S133A forward primer: 5'-GGAGGCCT**GCCT**ACAGGAAAATTTTG-3', S133A reverse primer: 5'-CAAATTTTCCTGTAG**GC**AGGCCTCC-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A mutagenezist szekvenálással validáltuk.

3.4 STABIL TRANSZFEKCIÓ

24 órával az 5×10^6 vtPC12 sejt kiültetését követően a sejteket 9 μ g pcD/RSV-FlagCREB, pcD/RSV-FlagCREB S129A, pcD/RSV-FlagCREB S133A vagy pcD/RSV-FlagCREB S129A-S133A plazmiddal és 11 μ g egyes szálú lazac sperma DNS-t(ssssDNS) transzfektáltunk kalcium-foszfát precipitációs módszerrel. Három nappal a transzfekeciót követően a transzfekektánsokat 4 héten keresztül szelekciós koncentrációjú 400 μ g/ml G-418-szulfát (Gibco) jelenlétében tenyésztettük. A sejtek szubklónozását követően a klónok vektor-expresszióját Western blot analízissel ellenőriztük, és a legmagasabb expressziójú klónokat választottuk ki a további kísérleteinkhez.

3.5 KONFOKÁLIS MIKROSKÓPIA

10^4 sejtet ültettünk ki poli-L-lizin kezelt fedőlemezt tartalmazó 96-lyukú lemezre magas szérumszertartalmú médiumban, amelyet 24 óra elteltével lecseréltünk 0,5% ló szérumszertartalmú médiumra (továbbiakban alacsony szérumszertartalmú médium). A sejtek kezelését követően a mintákat 4% PBS-pufferelt paraformaldehidben fixáltuk. A minták aspecifikus kötőhelyeit PBS-es mosást követően 10% borjú szérumszert albuminnal (Sigma) blokkoltuk. A mintákat 1:200 végkoncentrációban éjszakán át 4°C-on inkubáltuk CHOP- vagy CREB-ellenes elsődleges antitestekkel (CellSignaling, Danvers, MA, USA). Az inkubálást követően a mintákat újból mostuk, majd faj-specifikus fluorofór-konjugált másodlagos antitesttel (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) inkubáltuk 1:200 végkoncentrációban éjszakán át. Az inkubálás után a mintákat Hoechst 33342 DNS-festékkel (Calbiochem, Darmstadt, Németország) festettük 0,5 μ g/ml végkoncentrációban. A nem kötődött festéket és másodlagos antitestet kimostuk és a minta-fedőlemezeket Vectashield anti-fading mounting médiummal (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) helyeztük tárgylemezre. A sejteket Olympus FluoView 1000 lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal (Olympus, Center Valley, PA, USA) vizualizáltuk szekvenciális és fotonszámláló üzemmódban.

3.6 ATP ESSZÉ

A sejtek viabilitását luciferáz alapú ATP esszével (Promega, Madison, WI, USA) végeztük el. 2×10^3 sejtet ültettünk ki poli-L-lizin kezelt fehér, 96-lyukú lemezre. A következő napon a médiumot alacsony szérumtartalmú médiumra cseréltük le. 24 óra múlva a sejteket TM-nel kezeltük, majd újabb 24 óra múltán 100 μ l médiumot a mintákon hagyva 100 μ l frissen feloldott ATP esszé reagenst pipettáztunk a lyukakba FluoStar Optima plate-olvasóval (BMG Labtech, Offenburg, Németország). A lemezeket 2 percig 300/perc frekvenciával rázattuk, majd 10 perc 25°C-os inkubálást követően mértük a minták fluoreszcenciáját.

3.7 APOPTÓZIS ESSZÉ

10^5 sejtet ültettünk poli-L-lizin kezelt fedőlemezt tartalmazó 24-lyukú lemezre. A kezelési kondíciók a korábbiakkal megegyező módon történtek. A mintákat a kezelést követően 4%-os PBS-pufferelt paraformaldehiddel fixáltuk. A sejtmagokat Hoechst 33342 DNS-festékkel festettük (Calbiochem) 0,5 μ g/ml végkoncentrációban. Mintánként minimum 200, random módon kiválasztott sejt magmorfológiáját értékeltük Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus).

3.8 WESTERN BLOT ANALÍZIS

5×10^6 sejtet ültettünk ki és kezeltünk a korábban említettekkel megegyezően. A sejteket a kezelést követően M-Per emlős protein extrakciós pufferrel lizáltuk (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). 40 μ g fehérjelizátumot szeparáltunk 12%-os SDS-poliakrilamid gélen. A mintákat a gélből PVDF membránra (Amersham, Buckinghamshire, UK) transzferáltuk. A detektáláshoz a következő elsődleges antitestek kerültek felhasználásra: anti-CREB, anti-aktin, anti-BiP, anti-P-JNK, anti-P-p38 MAPK, anti-P-eIF2 α , anti-P-GSK-3 Ser9, anti-P-CREB S133, anti-Bim, anti-Bcl-2, anti-Bcl-w, anti-Bcl-X_L, anti-Bok (CellSignaling, 1:1000 végkoncentrációban), anti-P-CREB S129 (Thermo Scientific, 1:1000 végkoncentrációban), anti-Mcl-1 (Sigma, 1:500 végkoncentrációban), anti-ATF6 és anti-P-IRE1 (AbCam, 1:500 végkoncentrációban). Az elsődleges antitest-jelölt membránokat fajspecifikus HRP-konjugált másodlagos antitestekkel (CellSignaling) inkubáltuk 1:2000 végkoncentrációban. Az immunkomplexeket Pierce ECL Western Blotting szubsztráttal (Thermo Scientific) vizualizáltuk. A detektált fehérjék mennyiségét Kodak 1D szoftverrel (verziószám: 3.5.5.B) kvantitáltuk. A kapott eredményeket aktinra normalizáltuk.

3.9 3.9. GSK-3 β KNOCKDOWN SI-RNS TECHNIKÁVAL

QRT-PCR-hoz 5×10^5 , apoptózis esszéhez és immuncitokémiához $2,5 \times 10^4$ vtPC12 sejtet ültettünk ki 6, illetve 24 lyukú lemezre lyukanként. A következő napon 1 μ l/ml DharmaFECT 1 (Thermo Scientific) transzfekciós reagenst, 5 μ l 20 μ M ON-TARGETplus Non-targeting Pool és GSK-3 β specifikus siGENOME SMARTpool siRNS-t (Thermo Scientific) felhasználva transzfektáltuk a sejteket a gyártó előírása szerint. A következő nap a médiumot alacsony szérumtartalmú, penicillint 87 U/ml és streptomycint (87 ng/ml) tartalmazó médiumra cseréltük le. 24 óra múlva a mintákat 5 μ g/ml TM-nel kezeltük egy napig, kontrollként TM-nel nem kezelt sejteket használtunk. A GSK-3 β géncsillapítást indirekt immuncitokémiával és qRT-PCR-rel validáltuk.

3.10 FRET ANALÍZIS

Immuncitokémiai preparátumokat készítettünk egér tubulin- (Merck, Darmstadt, Németország) és nyúl Bim-ellenes (CellSignaling) elsődleges, valamint Cy5-konjugált anti-egér és Cy3-konjugált anti-

nyúl (Jackson ImmunoResearch Laboratories) másodlagos antitestek felhasználásával 1:200 végkoncentrációban. A mintákat 50%-glicerolt tartalmazó PBS-sel rögzítettük tárgylemezre. A fluorofórokat 90%-os transzmisszivitás mellett He és Ne lézerekkel gerjesztettük photon count üzemmódban Olympus Fluoview 1000 lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal (Olympus). A pre- és post-bleach képeket 1024×1024 felbontásban készítettük 40× UPlan FLN (NA 0,75) objektívvel 10 μs/pixel gerjesztés mellett. Random módon kiválasztott területeket 20 μs/pixel 4× zoom mellett gerjesztettünk az akceptor 90%-os fluoreszcencia csökkenéséig. A FRET hatékonyság és a fluorofórok távolságát FV 10-ASW Ver.01.07.01.00 szoftverrel (Olympus) határoztuk meg.

3.11 TRANZIENS TRANSZFEKCIÓ EXPRESSZIÓS KONSTRUKTOKKAL

5×10⁴ vtPC12, Rat-1 vagy primer RVSM sejtet ültettünk ki poli-L-lizin kezelt fedőlemezt tartalmazó 24-lyukú lemezre 500 μl/lyuk végtérfogatban. Ezt követően a sejteket szuszpenzióban kotranszfectáltuk 3.3-3.3 μg pcDNA3 (LifeTechnologies, Grand Island, NY, USA) és pEGFP-C1 vektorokkal (Clontech, Mountain View, CA, USA) (mock-transzfectált) vagy pcDNA3-FLAG-CREB és pEGFP-C1 konstrukttokkal (CREB-transzfectált) FuGENE HD transzfectációs reagenst (Promega) felhasználva a gyártó előírása szerint. 24 órával a transzfectiót követően médiumot cseréltünk a sejteken, majd egy nap múlva kezeltük a sejteket TM-nel és LiCl-dal a korábban leírtakkal megegyezően. A transzfectió hatékonysága 80% feletti volt.

3.12 EXON CHIP ANALÍZIS

Teljes citoplazmatikus RNS-t izoláltunk kontroll és 12 órán át MTH-68/H vírussal fertőzött vtPC12 sejtekből triplikátumokban Qiagen RNeasy kit (Hilden, Németország) felhasználásával a gyártó ajánlása szerint. A minták Affymetrix platformon kerültek patkány Affymetrix GeneChip Exon 1.0 Array chip (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) segítségével analízisre. A génexpressziós adatok normalizálást követően kerültek kiértékelésre. Párosítatlan T-próba (Benjamini-Hochberg korrekcióval) alapján szignifikánsnak határoztuk meg a minimum kétszeres génexpresszió csökkenést vagy növekedést. A génexpresszió megváltozására DAVID funkcionális génannotációs eszközt használtunk fel a minimum kétszeres mértékben megváltozott 729 indukált és 612 represszált gén megadásával.

3.13 RNS IZOLÁLÁS ÉS KVANTITATÍV REVERZ TRANSZKRIPTÁZ PCR

Össz RNS-t izoláltunk Qiagen RNeasy RNS kit (Qiagen) segítségével a gyártó ajánlásának megfelelően. Az izolált RNS mennyisége és tisztasága NanoDrop-1000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific) került meghatározásra. Az izolált tiszta RNS-t High Capacity cDNA Reverse Transcription kittel (Life Technologies, Carlsbad, CA) írtuk át a gyártó utasításai alapján. A SYBR Green és TaqMan esszéket duplikátumokban végeztük el Applied Biosystems 7500 Sequence Detector (Life Technologies) segítségével 10 μl végtérfogatban. A SYBR esszé mintánként 4 ng cDNS-t, 5 μl Fast SYBR Green Master Mixet (Life Technologies) és 300 nM primert tartalmazott. A TaqMan esszé 4 ng cDNS-t, 5 μl TaqMan Fast Universal Master Mixet (Life Technologies), 300 nM primert és 150 nM próbát tartalmazott. Az amplifikáció specificitását a SYBR Green esszé esetében olvadáspont analízissel igazoltuk. A vizsgált szekvenciák amplifikációját 18S riboszomális RNS-re normalizáltuk.

3.14 STATISZTIKAI ANALÍZIS

A statisztikai analízist GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) és SPSS 13.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) végeztük el. A minták normál eloszlását Kolmogorov-Szmirnov teszttel határoztuk meg. A statisztikai szignifikancia egyutas ANOVA segítségével került meghatározásra, majd szignifikancia esetén Bonferroni posthoc teszt került elvégzésre. Az adatokat átlag \pm SEM-ként fejeztük ki. $P < 0.05$ értéket tekintettünk szignifikánsnak.

4 EREDMÉNYEK

4.1 A CREB MEGNÖVEKEDETT NUKLEÁRIS ELŐFORDULÁSA

VtCREB-et, Ser129Ala-CREB-et, Ser133Ala-CREB-et vagy kettős mutáns Ser129Ala-Ser133Ala-CREB-et (a továbbiakban mint vtCREB, S129A, S133A, S129A-S133A) kódoló konstruktokat expresszáló PC12 sejtek jelentősen megnövekedett, mintegy 1,7-1,8-szoros CREB-expressziót mutattak Western blot analízissel vtPC12 sejtekhez viszonyítva. A további kísérletekhez kiválasztott klónok további immuncitokémiai vizsgálaton estek keresztül CREB-specifikus indirekt jelölést követően. A konfokális képeken vtPC12-sejtekhez viszonyítva a sejtmagokban döntően az eukromatin régióiban megnövekedett CREB-jelét detektáltunk.

4.2 A CREB FEHÉRJE CSÖKKENTI A TM-INDUKÁLTA APOPTÓZIST PC12 SEJTEKBEN

VtPC12 sejtekben ATP-esszé segítségével meghatároztuk a 72 óra alatt a viabilitás 50%-os csökkenéséhez vezető TM koncentrációt (0,01 $\mu\text{g/ml}$, továbbiakban alacsony koncentrációjú TM). Az 5 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció (a továbbiakban magas koncentrációjú TM) teljesen toxikus volt ezen sejtekre.

A továbbiakban a különböző sejtvonalak túlélését hasonlítottuk össze ATP-esszé segítségével magas koncentrációjú, 24 órás TM-kezelést követően. Mind a vtCREB-et overexpresszáló, mind a mutáns CREB egyikét expresszáló sejtek magasabb túlélést mutattak a vtPC12 sejteknél. A S133A mutáns túlélése statisztikailag szignifikánsnak bizonyult.

Az ATP-esszével kapott eredmények apoptózis esszével kerültek validálásra. A különböző sejtvonalakat a fent említett módon és ideig kezeltük TM-nel, majd Hoechst 33342 DNS-festést követően az apoptotikus sejtmagmorfológia szerint meghatároztuk az apoptotikus sejtek arányát. Magas koncentrációjú TM a vtPC12 sejtek mintegy 35%-ban okozott apoptózist. A vtCREB és S133A sejtek mintegy 15%-os, míg S129A és a kettős mutáns CREB-et expresszáló vonalak 22-23%-os apoptotikus rátát mutattak a TM-kezelés hatására.

4.3 A TM-KEZELÉS ER STRESSZT INDUKÁL PC12 SEJTEKBEN

A különböző sejtvonalak 24 órás TM-kezelést követően dóziszfüggő módon megnövekedő BiP expressziót mutattak jelezve a kiváltott ER stresszt és UPR-t. A hasítatlan ATF6 mennyisége mindegyik vizsgált sejtvonalban növekedést mutatott. A hasított, tATF6 szintje nem változott vtPC12 sejtekben, azonban vtCREB és mutáns CREB-et expresszáló sejtekben csökkenést mutatott. Az összes vizsgált sejtvonalban megnőtt a foszforilált, aktív IRE1 mennyisége. A foszforilált JNK és p38 MAPK stresszkinázok mennyisége is változást mutatott. A P-JNK mennyisége mindegyik

sejtvonalban növekedett, azonban a P-p38 MAPK mennyisége vtPC12 sejtekhez viszonyítva a vtCREB-et és mutáns CREB-et expresszáló vonalakban csökkenést mutatott. A P-PERK-függő P-eIF2 α mennyisége is változást mutatott; vtPC12, S129A és S129A-S133A sejtek P-eIF2 α mennyisége kis mértékben nőtt, míg a vtCREB és S133A-CREB sejtvonalakban csökkenést mutatott. A CHOP transzkripciós faktor mindhárom ER stressz jelátviteli út konvergenciós pontja. Ennek tekintetében a sejtek CHOP-expressziós változását vizsgáltuk immuncitokémiai módszerrel. TM-kezelés hatására mindegyik vizsgált sejtvonalban a CHOP expressziójának növekedését figyeltük meg, ami egyértelműen utal a kiváltott ER stresszre és UPR-re.

4.4 A TM-INDUKÁLT APOPTÓZIS A GSK-3 β GÁTLÁSÁVAL KIVÉDHEŐ

A különböző sejtvonalakat 60 perces GSK-3 gátló LiCl előkezelést követően 24 óráig TM-nel kezeltük és apoptózis esszével meghatároztuk az apoptotikus sejtek arányát. A LiCl előkezelés mindegyik sejtvonalban csökkentette a TM-indukálta apoptózis mértékét, amely statisztikailag szignifikánsnak bizonyult vtPC12 és a kettős mutáns S129A-S133A sejtvonalak esetében.

Hasonló eredményt kaptunk a szelektív GSK-3 inhibitor SB-216763 használata esetében is. A sejteket a fentiekkel megegyezően előkezeltük az inhibitorral, majd TM-nel kezeltük 24 óráig és apoptózis esszével meghatároztuk az apoptotikus sejtek arányát. A GSK-3 β SB-216763 általi gátlásával a vtPC12, S129A és S129A-S133A sejtek apoptotikus rátája szignifikánsan csökkent. A GSK-3 β inhibitorok specificitását GSK-3 β specifikus siRNS technikával validáltuk.

Ismert, hogy Akt GSK-3 β Ser9-es foszforilációja gátló hatású a GSK-3 funkciójára nézve. Ezen hatás vizsgálatára a különböző sejtvonalak GSK-3 β foszforilációs szintjét vizsgáltuk. A LiCl megnövelte a P-GSK-3 β Ser9 szintjét. A TM GSK-3 β aktivációt indukált mindegyik sejtvonalban; a foszforiláció mennyisége csökkent a kontroll mintákhoz viszonyítva. A LiCl TM-nel kombinálva csökkentette a GSK-3 β aktivitását a mintákban. A CREB foszforilációját foszfospecifikus antitestekkel vizsgáltuk Western blot analízissel. A CREB fehérje S129-es foszforilációjának növekedését tapasztaltuk a S129A-S133A sejtvonal kivételével mindegyik sejtvonalban. A S129A sejtvonal CREB S129 foszforilációja az endogén CREB foszforilációjának volt betudható. A CREB S133-as foszforilációját figyeltük meg TM-kezelés hatására vtPC12, vtCREB és S129A sejtvonalak esetében. Az endogén CREB expresszió tekintetében nem figyeltünk meg jelentős változást.

4.5 A CREB OVEREXPRESSZIÓJA MEGVÁLTOZTATJA A BCL-2 CSALÁD FEHÉRJÉINEK EXPRESSZIÓJÁT

A proapoptotikus Bcl-2 családba tartozó Bim jelentős szereppel rendelkezik az ER-stresszben. Három splice-variánsa ismert. A leghosszabb, Bim_{EL} a mikrotubulusok dinein-könnyű láncával komplexálódik nyugalmi sejtekben. VtPC12 sejtekben a TM-kezelés Bim_{EL} expressziót indukált, míg a vtCREB-et és mutáns CREB-et expresszáló sejtvonalakban a Bim_{EL} csökkenését figyeltük meg. TM-kezelésre a Bim_L és Bim_S szintje hasonlóképpen megnőtt vtPC12 sejtekben, míg csökkenést figyeltünk meg a vtCREB mintákban. Az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje mennyisége mindegyik sejtvonalban csökkent TM-kezelésre, azonban kontroll esetben is alacsonyabb Bcl-2 szintet figyeltünk meg a vtCREB és S133A sejtvonalaknál. TM-re a vtPC12, vtCREB és S133A sejtek esetében az antiapoptotikus Mcl-1 fehérje mennyiségi csökkenését figyeltük meg. A Bcl-X_L és Bcl-w antiapoptotikus Bcl-2 tagok szintén csak a S133A sejtvonal esetén mutatott kismértékű csökkenést.

VtPC12 sejtekben a TM a proapoptotikus Bok indukciójához vezet, azonban a fehérje 24 óra múlva nem detektálható. VtCREB és S133A sejtek esetében érdekes módon kontroll esetben is kifejezett Bok expressziót tapasztaltunk, amelyet a TM-kezelés nem változtatott meg. A S129A és S129A-S133A vonalak esetében az alap Bok-expresszió a többi sejthez viszonyítva alacsonyabbnak bizonyult, amely mennyisége TM-kezelés hatására indukálódott.

4.6 A CREB FEHÉRJE BEFOLYÁSOLJA A BIM MIKROTUBULUSHOZ TÖRTÉNŐ ASSZOCIÁCIÓJÁT

A Bim képes az aktin és mikrotubulus rendszerekhez asszociálódni nyugalmi sejtekben. A JNK és p38 MAPK stresszkinázok Bim-citoszkeleton disszociációt okoznak és így apoptózist indukálnak. A Bim-citoszkeleton asszociációjának vizsgálatához fluoreszcencia-rezonancia energiatranszfert (FRET) használtunk indirekt Bim- és tubulin-specifikus immuncitokémiai jelölést követően Cy3-Cy5 fluorofór párt használva. Kontroll sejtekben a FRET képeken a Bim-mikrotubulus asszociáció jól megfigyelhető, amely TM-kezelés hatására eltűnik vtPC12 sejtekben. Vt és mutáns CREB-et expresszáló sejtek esetében a Bim-mikrotubulus rendszer disszociációja nem volt tapasztalható FRET analízissel.

4.7 A CREB CSÖKKENTI A TM-INDUKÁLTA APOPTÓZIST A KÜLÖNBÖZŐ PATKÁNY SEJTTÍPUSOKBAN

VtPC12 sejteket, Rat-1 patkány fibroblasztokat és patkány vaszkuláris simaizomsejteket (RVSM) kotranszfektáltunk tranziensen pEGFP-C1 és pcDNA3-CREB vektorokkal. 2 nappal később a sejteket LiCl előkezeléssel 24 óráig TM-nel kezeltük. Az EGFP pozitív sejteket apoptotikus rátáját apoptózis esszével határoztuk meg a korábban leírt módon. A CREB overexpresszió szignifikánsan csökkentette a TM-indukálta apoptózist vtPC12 és Rat-1 sejtvonalakban. A LiCl csökkentette a TM citotoxicitását az RVSM sejtekben. A LiCl és tranziens CREB overexpresszió együttesen csökkentette a TM-indukálta apoptózist mindhárom sejtípusban.

4.8 GÉNEXPRESSZIÓS VÁLTOZÁSOK VTPC12 SEJTEKBE MTH-68/H FERTŐZÉST KÖVETŐEN

VtPC12 sejteket fertőztünk 12 órán át onkolitikus MTH-68/H Newcastle betegség vírussal az IC₅₀ koncentrációnak megfelelő partikulumszámmal, majd össz-RNS-t izoláltunk. A minták génexpressziós profilját cDNS-chipen határoztuk meg. 729 gén (773exon) indukálódott és 612 gén (631 exon) represszálódott minimum kétszeres mértékben. A cDNS-chippel kapott eredményeket qRT-PCR segítségével validáltuk 5 indukált és 4 represszált gént vizsgálva. A megváltozott expressziójú gének klaszteranalízisét DAVID funkcionális annotációs eszközzel végeztük el. Az analízis eredményeként az alábbi funkcionális kategóriákat határoztuk meg:

- I) Veleszületett immunitás klaszterek
 - a) RIG-1-szerű receptor jelátvitel
 - b) Toll-like receptor jelátvitel
 - c) Interferon-stimulált jelátvitel
- II) Növekedési faktor és sejtciklus klaszterek
- III) Celluláris stressz és apoptózis klaszterek
 - a) Intrinzik apoptózis
 - b) Extrinzik apoptózis
 - c) ER stressz

5 MEGBESZÉLÉS

5.1 A GSK-3 β SZEREPE AZ ER STRESSZBEN

A GSK-3 β bizonyítottan szerepet játszik az apoptózis és az ER stressz modulálásában. Számos mechanizmus gátolja a GSK-3 β funkcióját a Ser9-es foszforilációján keresztül. Ezek közül a legjobban jellemzett a PI-3K/Akt jelátviteli út. Az aktív GSK-3 a célmolekuláit foszforilálja, köztük a nukleáris CREB foszfoproteint, amely molekula a különböző sejttípusok túlélésében betöltött igen jelentős szerepét már számos közlemény leírta. Azonban mindeközül nem teljesen ismert annak pontos mechanizmusa, hogy az ER stressz hogyan aktiválja a GSK-3 β -t.

5.2 A CREB FEHÉRJE S129 ÉS S133 AMONOSAVAINAK SZEREPE AZ ER-STRESSZBEN

Az ER stressz által kiváltott mindhárom jelátviteli út (ATF6, IRE1, PERK) aktivációja megfigyelhető volt kísérleteinkben. Minden általunk vizsgált PC12 sejttípusban megfigyelhető volt a BiP chaperon szintjének növekedése, amely indukált adaptációs mechanizmust jelez. A tATF6 szinte csökkenést mutatott, míg a hasítatlan ATF6 szintje a S129A és S129A-S133A sejtekben jelentősen megnövekedett. Az IRE1 és következményes JNK és p38 MAPK aktiváció kimutatható volt mindegyik sejtvonalban. A PERK-függő eIF2 α -mediált globális transzlációs attenuációt a vtCREB és S133A sejtekben detektáltuk. Az ATF4/ATF6-függő CHOP expressziójának növekedését mindegyik phaeochromocytoma sejtben ki tudtuk mutatni, amely aktív, ER-stresszre adott választ mutat.

Annak ellenére, hogy a TM-kezelés ER stresszt vált ki, a vad típusú és különböző mutáns CREB fehérjék képesek a PC12 sejtek TM-indukálta apoptózisát részben kivédeni. A megnövekedett túlélésért több, az alábbiakban részletezett mechanizmus tehető felelőssé.

Az egyik lehetséges mechanizmus a hiányzó S129 és/vagy S133 foszforilációs helyek hiánya. Bemutattuk, hogy a GSK-3 β -nak központi szerepe van az ER stressz jelátvitelében, mivel a GSK-3 β gátlásával (LiCl vagy SB-216763 használatával) részlegesen kivédhető a PC12 sejtek TM-indukált apoptózisa.

Irodalmi adatok szerint a CREB Ser133-as foszforilációja szükséges ahhoz, hogy a CREB transzkripcionálisan aktív legyen. Ismert, hogy a CREB S133-as foszforilációja konszenzus szekvenciát hoz létre a GSK-3 β számára S129-en. Mindeközül csupán néhány közlemény vizsgálta a másodlagos, S129-es foszforiláció következményeit. Igazoltuk, hogy a GSK-3 β PC12 sejtekben CREB S129-es foszforilációt okoz. Ezen foszforiláció a korábbi irodalmi adatok szerint csökkenti a CREB DNS-kötő aktivitását és ezáltal csökkenti a CREB által szabályozott antiapoptotikus gének (pl.: Bcl-2) transzkripcióját. Feltételeztük, hogy a fentieket figyelembe véve a S129A, S133A és S129A-S133A sejtvonalaknak magasabb túlélést kell mutatniuk TM-kezelés hatására, ha a TM-indukálta ER stressz GSK-3 β függő. Ezen feltételezéseinket kísérleteink igazolni látszanak.

Egy másik mechanizmus, ami a vizsgált sejtek megnövekedett túléléséhez vezethetett, a CREB szekvenciákért folytatott kompetíciója a CREB és ATF4/ATF6 transzkripciós faktoroknak. Ismert, hogy a CREB fehérje konstitutívan köti célszekvenciáját mind stimulált, mind nem stimulált sejtekben. Kotranszfekciós kísérletek bizonyították korábban, hogy a CREB gátolja az ATF4 CREB kötését *in vitro*. Vt és mutáns CREB fehérje expressziója csökkentette az ATF4 szintjét kontroll

körülmények között vtPC12 sejtekben. TM-kezelés hatására az ATF4 nem mutatott kolokalizációt a CREB fehérjével egyik klónunkban sem. A megnövekedett CREB szint interferálhat az ATF4 és ATF6 transzkripciós faktorok DNS kötésével, amely magyarázatot adhat a megnövekedett sejttúlélésre tekintet nélkül arra, hogy a sejtben található CREB tartalmaz-e S129 és/vagy S133 foszforilációs helyeket.

5.3 A CREB TRANZKRIPCIÓS FAKTOR ÉS A BCL-2 CSALÁD KAPCSOLATA

VtCREB-et overexpresszáló sejtvonalkunk csökkent mennyiségű Bcl-2 fehérjét expresszált annak ellenére, hogy számos kutatócsoport korábban különböző rendszerekben CREB-függőnek írta le a Bcl-2 expressziót. A sejteket kísérleteink alatt alacsony szérumszintű médiumban tenyésztettük 24 órán keresztül, majd TM-nel kezeltük további 24 óráig szintúgy alacsony szérumszintű médiumban. Ezen körülmények között az GSK-3 β aktív és így a CREB S129-es foszforilációján keresztül hozzájárulhat a Bcl-2 expressziójának csökkenéséhez. Azon sejtvonalakban, ahol a S129-es aminosav intakt volt, (vtCREB és S133A), a Bcl-2 expressziója alacsonyabbnak bizonyult a vtPC12 sejtekhez viszonyítva.

Korábban komputációs analízissel a *bok* promoterében részleges CRE szekvenciát írtak le, habár mindezt SACO (serial analysis of chromatin occupancy) könyvtár konstrukciós kísérletekkel nem sikerült igazolni az irodalmi adatok szerint. A komputációs megfigyelések magyarázatot adhatnak arra, hogy miért mutattak a vtCREB-et overexpresszáló vagy a mutáns CREB-et expresszáló sejtek vtPC12 sejtekhez viszonyítva magasabb proapoptotikus Bok expressziót annak ellenére, hogy ezen sejtek túlélése meghaladta a vtPC12 sejtek túlélését TM-kezelés hatására. A Bok képes az Mcl-1 szelektív kötésére. A megnövekedett Bok expresszió a vtCREB és S133A sejtvonalakban hozzájárulhat az Mcl-1 szekvesztrációjához és mennyiségi csökkenéséhez. A különböző CREB-konstrukciók expressziója időben elnyújtja a Bok expresszióját, hiszen ezen sejtekben vtPC12-hez viszonyítva 24 óra múlva is detektálható mennyiségű Bok-ot mutattunk ki, azonban a TM-kezelés volt nem képes további Bok-indukciót kiváltani. A Bcl-2 család BH3-only csoportjába tartozó proapoptotikus Bim tagja három eltérő splice-variánssal rendelkezik (Bim_{EL}, Bim_L, Bim_S). A Bim_{EL} és Bim_L tagok képesek a dinein könnyű lánchoz kapcsolódni és így szekvesztrálódni nyugalmi állapotú sejtekben, majd JNK és p38 MAPK általi foszforilációt követően disszociálnak a citoskeletonról. Mindhárom méretű splice-variáns képes különböző antiapoptotikus Bcl-2 tagokhoz kötődni és azok funkcióját blokkolni, így hozzájárulva a sejthalálhoz.

5.4 CREB-FÜGGŐ CITOSZKELETÁLIS ÁTRENDEZŐDÉS

A megnövekedett túlélés hátterében álló további mechanizmusként a különböző CREB-et expresszáló sejtvonalkak citoskeletonális rendszerének megváltozása is állhat. A FRET-analízis eredményei azt mutatják, hogy a Bim a mikrotubulus rendszer közelében található nyugalmi állapotban, majd TM-indukálta ER stressz hatására ez az asszociáció jelentősen csökken vtPC12 sejtekben. VtCREB és mutáns CREB-et expresszáló sejtvonalakban ezen interakció stabilnak mutatkozott tartós ER stressz esetében is. VtPC12 sejtekhez viszonyítva a többi PC12 sejtvonalk kisebb mértékű P-p38 MAPK és P-JNK mennyiséget mutattak. Ezen kinázok aktív, foszforilált formájának mennyiségi csökkenése hozzájárulhat a Bim-citoskeleton interakció fenntartásához, interferálva az apoptózissal.

A három splice-variáns közül a Bim_S rendelkezik a legrövidebb féléletidővel, továbbá a különböző stresszhatásokra *de novo* szintetizálódik, valamint mindhárom variáns közül a legtoxikusabb. VtCREB és S133A sejtvonalak jelentősen alacsonyabb Bim_{EL} és Bim_S expressziót mutattak magas koncentrációjú TM-kezelés esetén is, amely megfigyelés párhuzamba állítható ezen sejtek megnövekedett túlélésével. A csökkent, TM-re válaszul adott apoptózis eredménye lehet egy megváltozott Bim homeosztázisnak, csakúgy, mint egy CREB-függő citoszkéletális átrendeződésnek is, hiszen a CRE szekvencia bizonyítottan számos dinein-szerű gén promoterében megtalálható.

5.5 A GSK-3 β /CREB TENGELY ÁLTALÁNOS KÖVETKEZKÉNYEI; A CREB OVEREXPRESSZIÓJA CSÖKKENTI A TM TOXICITÁSÁT RAT-1, VTPC12 ÉS RVSM SEJTEKBEN

Korábbi irodalmi közlemények szerint a GSK-3 β -nak és CREB-nek kiemelt jelentősége van a Rat-1, PC12 és RVSM sejtek túlélésében. Kísérleteink azt mutatják, hogy tranziens vtCREB overexpresszió esetében ezen sejtek túlélése megnő tartós ER stresszben. Mivel a sejteket 36 órával a transzfekció után kezeltük TM-nel, szükséges volt az eredeti kezelési protokollt módosítanunk és az alacsony szérumszámú médiumot magas szérumszámúra cserélnünk. A médium szérumszámú tartalma a növekedési faktor receptorokon keresztül stimulálja a PI-3K/Akt utat, amely sejttúlélés egyik legfőbb jelátviteli útja. A magas növekedési faktor jelenléttel magyarázható, hogy annak ellenére, hogy mindhárom sejtvonalban a TM-kezelés apoptózist indukál, az RVSM sejtek reagáltak legkevésbé apoptózissal a TM-kezelésre.

5.6 AZ MTH-68/H KEZELÉS VELESZÜLETETT IMMUNVÁLASZT ÉS SEJTHALÁLT INDUKÁL VTPC12 SEJTEKBEN

VtPC12 sejteket fertőztünk az onkolitikus NDV MTH-68/H vírussal 12 órán keresztül IC₅₀ koncentráción (12,87 víruspartikulum/sejt). A fertőzés hatására 729 gén indukálódott és 612 represszálódott minimum kétszeres mértékben. Az indukált gének közül több mint 50 esetében az indukció ötvenszeres vagy nagyobb volt, míg 70 gén esetében tíztől-ötvenszeres mértékben indukálódtak a gének. Ezen igen erős génindukció egy kifejezett antivirális reakció eredménye mindamellett, hogy a vírus replikálódik és apoptózist indukál.

A megváltozott génexpressziós eredményeket a DAVID funkcionális annotációs eszköz az indukált gének esetében 176, míg a represszált gének esetében 146, részben átfedő klaszterbe sorolta.

Igen jelentős számú indukált gén a veleszületett immunitásban, gyulladásban, illetve a sejthalálban játszik szerepet a fertőzött sejtekben. Általánosságban elmondható, hogy a sejtciklus és a celluláris metabolizmus génjei általában represszálódtak.

5.7 AZ MTH-68/H FERTŐZÉS INTERFERON-ÚTVONALAKAT STIMULÁL

Számos tumor nem expresszál IFN-t és emiatt igen szelektívnek tűnnek a különböző onkolitikus vírusok számára. Míg a normál sejtek képesek különböző interferonokat expresszálni onkolitikus vírussal fertőzés hatására, a tumorsejtekben ezen antivirális mechanizmus hiányzik, és a daganatsejtek az onkolitikus vírus valamely egyéb, apoptózist indukáló hatása által pusztulnak el. VtPC12 sejtekben a cDNS-chip adatok szerint van IFN válasz, így az IFN hiánya nem állhat az MTH-68/H

citotoxicitásának hátterében. Mindamellet, hogy I-es típusú (IFN α , IFN β), II-es típusú (IFN γ) és III-as típusú (IFN λ) indukciót is megfigyeltünk a következményes interferon-stimulált gének (ISG-k) indukciójával együtt, ezen génindukciók nem elegendőek, hogy a sejteket megvédjék az apoptózistól.

5.8 AZ MTH-68/H FERTŐZÉS A SEJTCIKLUS LEÁLLÁSÁT OKOZZA

Az MTH-68/H fertőzés PC12 sejtekben számos olyan gén expresszióját változtatta meg, amelyek vagy a sejtciklus irányába vagy a sejtciklus ellen hatnak. Mindkettő csoportban találtunk olyan géneket, amelyek indukálódtak és olyanokat is, amelyek represszódtak. Összességében azonban az egyensúly a sejtciklus gátlásának irányába látszik eltolódni, amely az MTH-68/H tumorellenes hatásához járulhat hozzá.

5.9 AZ APOPTÓZIS MTH-68/H ÁLTALI INDUKCIÓJA

Az MTH-68/H PC12 sejtekben tapasztalt citotoxikus aktivitásának hátterében a különböző apoptotikus jelátviteli utak stimulációja is állhat. A cDNS-chip adatok alapján mind az intrinzik, mind az extrinzik és ER-stressz által indukált apoptotikus utak is érintettek a vírusfertőzés által.

Az intrinzik útvonal esetében csak pár gén expressziója változott (*Apaf1*, *Bid*, *Casp7*). Ez nem meglepő annak tekintetében, hogy az apoptózis intrinzik útvonala nagyrészt poszttranszlációs szabályozás alatt áll (pl. foszforiláció, defoszforiláció, oligomerizáció, proteolitikus hasítás).

NDV fertőzés hatására az extrinzik útvonal génindukciója is megfigyelhető volt vtPC12 sejtekben, a sejtek jelentős halálligandot (*Tnf*, *Tnfsf10* [TRAIL], *Faslg*) és extrinzik apoptózis szignalizációs molekulát (pl.: *Ripk2*, *Ripk3*, *Birc2*, *Birc3*, *Fas*, *Tnf-r1*) expresszáltak. Figyelembe véve a tényt, hogy a FasL és receptorának indukciója a vizsgált sejtekben kismértékű volt, a TRAIL tűnik a vírus citotoxicitásának legfontosabb mediátorának.

Korábbi irodalmi adatok szerint az ER stressz-indukálta apoptózisnak kiemelt szerepe van a NDV által okozott programozott sejthalálnak. A cDNS-chip adatok alapján úgy tűnik, hogy mindhárom apoptotikus útvonal szerepet játszik az MTH-68/H onkolízisében. Számos ER stressz által indukált apoptózisban szerepet játszó gén (pl.: *Casp4*, *Casp12*, *Ddit3*, *Atf3*) indukálódott vtPC12 sejtekben MTH-68/H fertőzés hatására.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

- I. Bemutattuk, hogy vtCREB overexpressziója mellett domináns mutáns S129A, S133A és S129A-S133A CREB expressziója megnöveli a PC12 sejtek túlélését tartósan fennálló ER stressz alatt.
- II. Az ER stressz jelátvitelében kísérleteink alapján kiemelt fontosságú szerepe van a GSK-3 β és CREB fehérjéknek. Az általunk vizsgált sejtekben a GSK-3 β farmakológiai gátlásával ezen sejtek túlélése megnőtt és igazolni látszott, hogy a GSK-3 β ígéretes terápiás célpont lehet az ER stresszel kapcsolatos betegségek kezelésében.
- III. A CREB fehérje vizsgált foszforilációs helyei nem kizárólagosan csak a Bcl-2 család expresszióján keresztül segíthetik a sejt túlélést, hanem citoszkeletális változásokat is indukálhatnak számos mikrotubulus-asszociált dinein-szerű gén expressziójának szabályozásán keresztül.
- IV. Bármely általunk vizsgált CREB konstrukt interferálhat az ATF4 és ATF6 transzkripciós faktorokkal és „ellophatja” a CRE kötőhelyeket ezen transzkripciós faktorok elől, amely az ER stressz kimenetelének temperálásához járulhat hozzá.
- V. A kapott eredmények tükrében valószínűsíthető, hogy a CREB fehérje az ER stressz jelátviteli kaszkádjának potens gátlója lehet. A lehetséges jelátviteli mechanizmusok további karakterizálásában az ER stresszel kapcsolatos patológiás folyamatok megértésére nyílik lehetőség és a jövőben ER stresszel kapcsolatos terápiás célpontok azonosíthatóak.
- VI. Az MTH-68/H kezelés erős IFN-választ indukál PC12 sejtekben, azonban ez önmagában nem állhat az MTH-68/H onkolízisének hátterében.
- VII. Az MTH-68/H fertőzés PC12 sejtekben a sejtciklus gátlását okozza és a sejteket citosztatikus és sejthalált indukáló állapot felé irányítja.
- VIII. Az MTH-68/H kezelés PC12 sejtekben képes indukálni az intrinzik, extrinzik és ER-stressz apoptózis jelátviteli utak génjeit.

7 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Pap Mariannak, aki meghívott a CREB lenyűgöző világába, vezetett és támogatott doktori tanulmányaim során. Továbbá szeretnék köszönetet mondani Dr. Szeberényi József Professzor Úrnak is, aki a munkám során végig támogatott és tanáccsal látott el. Hálával tartozom és köszönök mindent a MACIM munkacsoport minden további kedves és remek tagjának, név szerint Németh Máriának és Koloszar Ibolyának, nélkülük Ph.D. értekezésem nem készülhetett volna el. Továbbá köszönöm az együttműködését és a munkáját a PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézet összes munkatársának. Kifejezetten köszönöm Dr. Rékási Zoltán és Dr. Polgár Beáta gyors és igen alapos előbírálását, amellyel nagyban segítették, hogy doktori értekezésem végleges formát öntsön. Szeretnék köszönetet mondani ezúton is Prof. Dominik N. Müllernek, aki lehetővé tette, hogy számos fontos kísérletet a laboratóriumában végezhessenek el. Köszönettel

tartozom továbbá Marta Balognak, Prof. Marija Heffernek és Dr. Markó Lajosnak a barátságukért, biztatásukért és együttműködésükért. Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak minden segítségükért és támogatásukért.

8 PUBLIKÁCIÓS LISTA

Kumulatív impakt faktor idézhető absztraktok nélkül: 31,864

A doktori értekezés az alábbi közleményeken alapul

Impakt faktoral rendelkező közlemények:

Balogh, A., J. Bator, L. Marko, M. Nemeth, M. Pap, G. Setalo, Jr., D. N. Muller, L. K. Csatory, and J. Szeberenyi. "Gene Expression Profiling in Pc12 Cells Infected with an Oncolytic Newcastle Disease Virus Strain." *Virus Res* 185, (2014): 10-22.

IF 2013: 2,827

Balogh, A., M. Nemeth, I. Koloszar, L. Marko, L. Przybyl, K. Jinno, C. Szigeti, M. Heffer, M. Gebhardt, J. Szeberenyi, D. N. Muller, G. Setalo, Jr., and M. Pap. "Overexpression of Creb Protein Protects from Tunicamycin-Induced Apoptosis in Various Rat Cell Types." *Apoptosis* 19, no. 7 (2014): 1080-98.

IF 2013: 3,614

Impakt faktoral nem rendelkező közlemények:

Balogh, A. M. Pap, A simple fluorescent labeling technique to study virus adsorption in Newcastle disease virus infected cells - A novel method to label and track enveloped virus particles, Tecan Young Researcher Award, Budapest, 2011, *konferencia előadás*

Balogh, A. M. Pap, A CREB transzkripció faktor szerepe PC12 sejtek neuronális differenciációjában és túlélésében, Conference of Biologist Doctorandi, Pécs, 2009, *konferencia előadás*

Balogh, A., M. Pap., J. Szeberenyi, CREB foszforilációs helyek szerepe PC12 sejtek proliferációjában, PhD Scientific Days, Budapest, 2009, *konferencia előadás*

Stark, B., A. Harci, **A. Balogh**, G. Berta, G. Setalo Jr., J. Szeberényi, Egy peptidil-aldehid proteaszóma gátló (MG-131) jelátviteli hatásainak vizsgálata patkány feokromocitóma (PC12) sejtekben, PhD Scientific Days, Budapest, 2007, *poszter*

Balogh, A., Z. Németh, B. Stark, A. Harci, A CREB fehérje 129-es és 133-as szerin aminosavainak szerepe PC12 sejtek proliferációjában, XII. Frigyes Korányi Scientific Forum, Budapest, 2007, *konferencia előadás*

Balogh, A., Proliferative effect of the CREB protein in PC12 cells, YES Young European Scientist 2nd Meeting, Porto, 2007, *poszter*

Balogh, A., Z. Nemeth, A. Harci, B. Stark, Proliferative effect of Ser-129 and Ser-133 phosphorilation sites in the CREB protein, ISCOMS - 14th Internation Student Congress of Medical Sciences, Groeningen, 2007, *poszter*

Balogh, A., Z. Németh, A. Harci, B. Stark, Proliferative role of Ser-129 and Ser-133 in the CREB protein, CROSS - 3rd Croatian Student Summit, Zagreb, 2007, *konferencia előadás*

Balogh, A., B. Stark, A. Harci, Z. Németh, A CREB transzkripció faktor Ser-129-es és Ser-133-as foszforilációs helyeinek szerepe PC12 sejtek proliferációjában, V. Interdisciplinary Grastyán Conference, Pécs, 2007, *konferencia előadás*

Balogh, A., A CREB transzkripció faktor Ser-129 és Ser-133 aminosavak foszforilációjának szerepe PC12 sejtek differenciációjában és túlélésében, XI. Frigyes Korányi Scientific Forum, Budapest, 2006, *konferencia előadás*

Balogh, A., M. Pap, Z. Németh, B. Stark, A. Harci, J. Szeberenyi, A CREB transzkripció faktor Ser129 és Ser133 aminosavak foszforilációjának szerepe PC12 sejtek neuronális differenciációjában, proliferációjában és túlélésében, XIV. Cell and Development Biology Days, Balatonfüred, 2006, *poszter*

Balogh, A., A CREB transzkripció faktor szerepe PC12 sejtek proliferációjában, PTE ÁOK TDK Conference, Pécs, 2006, *konferencia előadás*

Pap, M., **A. Balogh**, A CREB transzkripció faktor szerepe PC12 sejtek differenciációjában és apoptózisában, XIII. Cell and Development Biology Days, Eger 2005, *konferencia előadás*

Balogh, A., A CREB transzkripció faktor szerepe PC12 sejtek neuronális differenciációjában és apoptózisában, XXVII. OTDK, Szeged, 2005, *konferencia előadás*

Balogh, A., A CREB transzkripció faktor szerepe PC12 sejtek neuronális differenciációjában és apoptózisában, PTE ÁOK TDK Conference, Pécs, 2005, *konferencia előadás*

Balogh, A., A CREB transzkripció faktor szerepe PC12 sejtek differenciációjában és túlélésében, PTE ÁOK Dean's Essay, Pécs, 2004, *dékáni pályamunka*

Balogh, A., A CREB transzkripció faktor szerepe PC12 sejtek differenciációjában és túlélésében, PTE ÁOK TDK Konferencia, Pécs, 2004, *konferencia előadás*

Idézhető absztraktok, előadások és poszterek, amelyek nem képezték a doktori értekezés alapját:

Magyar, K., I. Takacs, K. Bruszt, **A. Balogh**, K. Hideg, L. Seress, B. Sumegi, R. Halmosi, K. Toth, The potencial role of a PARP-inhibitor in the myocardial stem cell regeneration, Congress of European Society of Cardiology, Munich, Germany, 25 Aug 2012 - 29 Aug 2012, Eur. Heart J, 2012, 33 (Suppl. 1), *idézhető absztrakt*

Deres, L., K. Magyar, I. Takacs, K. Eros, **A. Balogh**, K. Hideg, B. Sumegi, K. Toth, R. Halmosi, A PARP-gátlás csökkenti a vaszkuláris fibrózist spontán hipertenzív patkánymodellben

Magyar Kardiológusok Társasága 2012. évi Tudományos Kongresszusa, 2012. május 9-12. Card. Hung. Suppl. A., 42: A21, *idézhető absztrakt*

Magyar, K., A Riba,, K. Bruszt, **A. Balogh**, K. Hideg, L. Seress, B. Sumegi, K. Toth, R. Halmosi, Az L-2286 jelű PARP-gátló vegyület lehetséges szerepe a miokardialis őssejt regenerációban. Magyar Kardiológusok Társasága 2012. évi Tudományos Kongresszusa, 2012. május 9-12. Card. Hung. Suppl. A., 42:A30, *idézhető absztrakt*

Magyar, K., A Riba, Z. Vamos, **A. Balogh**, L. Deres, K. Hideg, B. Sumegi, A. Koller, R. Halmosi, K. Toth, The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the vasoprotection elicited by PARP inhibition in hypertensive rats, European Society of Congress, Paris, France, 27, Eur. Heart J, 32 (Abstract Supplement), 34, 2011, *idézhető absztrakt*

Magyar, K., A. Riba, Z. Vamos, **A. Balogh**, L. Deres, T. Kalai, K. Hideg, L. Seress, B. Sümegi, A. Koller, R. Halmosi, K. Toth, The role of Akt and mitogen-activated protein kinase systems in the protective effect of PARP inhibition in a chronic hypertensive rat model, *Cardiologia Hungarica* 2011, 41: (Suppl F) p.F37, *idézhető absztrakt*

Magyar, K., A. Riba, Z. Vamos, **A. Balogh**, L. Deres, T. Kalai, K. Hideg, L. Seress, B. Sümegi, A. Koller, R. Halmosi, K. Toth, Az Akt és a MAP-kináz rendszer szerepe krónikus hipertenzív patkány modellben a PARP gátlás által kiváltott védelemben, FAME, Pécs, 2011, *poszter*

Magyar, K., Z. Vamos, K. Bruszt, **A. Balogh**, T. Kalai, K. Hideg, L. Seress, B. Sumegi, A. Koller, R. Halmosi, K. Toth, Inhibition of Poly(ADP-ribose) polymerase reduces hypertension induced vascular remodeling in spontaneous hypertensive rat model. Second international Symposium on Hypertension, november 18-21, 2010, Osijek, Croatia, *Kidney and Blood Pressure Research* 2010; 33: 425, *idézhető absztrakt*

Impakt faktorral rendelkező közlemények, amelyek nem képezték a doktori értekezés alapját:

Kellermayer, Z., M. Mihalj, A. Labadi, T. Czompoly, M. Lee, E. O'Hara, E.C. Butcher, G. Berta, **A. Balogh**, H.H. Arnold., P. Balogh "Absence of Nkx2-3 Homeodomain Transcription Factor Reprograms the Endothelial Addressin Preference for Lymphocyte Homing in Peyer's Patches". *J Immunol* (2014): doi 10.4049/jimmunol.1402016

IF 2013: 5,362

Markó, L., N. Henke JK. Park, B. Spallek, F. Qadri, **A. Balogh**, IJ. Apel, KI. Oravec-Wilson, M. Choi, L. Przybyl, KJ. Binger, N. Haase, N. Wilck, A. Heuser, V. Fokuhl, J. Ruland, PC. Lucas, LM. McAllister-Lucas, F.C. Luft, R. Dechend, D.N. Müller „Bcl10 Mediates Angiotensin II-Induced Cardiac Damage and Electrical Remodeling" *Hypertension* (2014): 64(5), 1032-1039

IF 2013: 7,632

Magyar, K., L. Deres, K. Eros, K. Bruszt, L. Seress, J. Hamar, K. Hideg, **A. Balogh**, F. Gallyas, Jr., B. Sumegi, K. Toth, and R. Halmosi. "A Quinazoline-Derivative Compound with Parp Inhibitory Effect Suppresses Hypertension-Induced Vascular Alterations in Spontaneously Hypertensive Rats." *Biochim Biophys Acta* 1842, no. 7 (2014): 935-944.

IF 2013: 5,089

Berta, G., A. Harci, O. Tarjanyi, M. Vecsernyes, **A. Balogh**, M. Pap, J. Szeberenyi, and G. Setalo, Jr. "Partial Rescue of Geldanamycin-Induced TrkA Depletion by a Proteasome Inhibitor in Pc12 Cells." *Brain Res* 1520, (2013): 70-9.

IF: 2,828

Mikolas, E., J. Cseh, M. Pap, I. A. Szijarto, **A. Balogh**, B. Laczy, V. Beko, V. Fisi, G. A. Molnar, A. Merei, J. Szeberenyi, and I. Wittmann. "Effects of Erythropoietin on Glucose Metabolism." *Horm Metab Res* 44, no. 4 (2012): 279-85.

IF: 2,145

Balogh, A., M. Pap, L. Marko, I. Koloszar, L. K. Csatory, and J. Szeberenyi. "A Simple Fluorescent Labeling Technique to Study Virus Adsorption in Newcastle Disease Virus Infected Cells." *Enzyme Microb Technol* 49, no. 3 (2011): 255-9.

IF: 2,367