

Kémiailag előidézett TrkA-expresszió változás hatásai PC12 sejtekben

Doktori (PhD) értekezés tézisei

dr. Berta Gergely

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs

Programvezető: Prof. Dr. Szeberényi József

Témavezető: ifj Dr. Sétáló György



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Biológiai Intézet

2014.

Összefoglalás

Munkánk során olyan mechanizmusok felderítése volt a célunk, melyek megmagyarázhatják, hogy a Hsp90 hősokkfehérje kémiai kiiktatása milyen módon gátolja az NGF (nerve growth factor, idegi növekedési faktor) jelátvitelét patkány pheochromocytoma sejtekben. A geldanamycin elnevezésű antibiotikumot eredetileg azon tulajdonsága alapján fedezték fel, hogy képes kötődni a Hsp90-hez. Ez a kölcsönhatás a Hsp90-t tartalmazó multimolekuláris komplexek széteséséhez vezethet, a disszociált partnerfehérjék működése gátlódhat, illetve a proteinek le is bontódhatnak. Bizonyos rendszerekben, például PC12 sejtek esetében, ez apoptózist is okozhat. A kezdeti apoptotikus események bekövetkezése előtt azonban az ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase, azaz extracelluláris szignál által szabályozott kináz 1 és 2) és a proteinkináz B/Akt aktivációjának jelentős csökkenése figyelhető meg ebben a sejttypusban, mely együtt jár a nagy affinitású idegi növekedési faktor receptor, a TrkA (tropomyosin receptor kinase, tropomiozin receptor kináz A; gyakran: tropomyosin-related kinase, tropomiozinnal rokon kináz A) csökkent expressziójával. Az MG-132 nevű proteaszóma gátló képes hatékonyan ellensúlyozni a TrkA expresszió geldanamycin által kiváltott csökkenését, az ERK1/2 foszforilációját pedig újra indukálhatóvá teszi NGF által. Ez utóbbi hatás a proteinkináz B/Akt esetében azonban nem volt megfigyelhető. A TrkA fehérje sejten belüli eloszlása megváltozott a geldanamycinnel és proteaszóma gátlóval egyaránt kezelt PC12 sejtekben, ezzel pedig részben megmagyarázható, hogy az NGF kezelés ekkor miért nem hatásos a proteinkináz B/Akt aktiváció szempontjából. A proteinkináz B/Akt stimuláció elmaradása viszont részben oka lehet annak, hogy az NGF kezelés miatt nem menti meg a PC12 sejteket a geldanamycinnel kiváltott programozott sejthaláltól. Megfigyeléseink segíthetnek abban, hogy jobban megértsük a geldanamycin hatásmechanizmusát, ami azért is fontos lehet, mert e szer és különféle származékai komoly terápiás potenciállal bírnak, akár az emberi gyógyászatban is.

Bevezetés

A geldanamycin és a Hsp90

A geldanamycint, mely az ansamycin antibiotikum család tagja, eredetileg *Streptomyces* baktériumokból izolálták. A Hsp90 (heat-shock protein 90) hősokkfehérje egy

nagy mennyiségben expresszált, ubikviter, homodimer, ATP-függő molekuláris dajkafehérje, azaz chaperone, melyet a geldanamycin célmolekulájaként azonosítottak, affinitáskromatográfia segítségével. Multimolekuláris komplexek részeként a Hsp90 számos fehérjét, többek között jelátviteli szerepet betöltő proteinkinázokat tart a funkcionális szempontból helyes konformációjukban.

A Hsp90 tartalmú komplexeknek sokféle szubsztrát proteinje lehet, a legismertebbek a különböző szteroid receptorok (melyekről a dajkafehérjék a hormon bekötődése, s a receptor-hormon komplexnek a magba való transzlokációja után leválnak), és a különböző jelátviteli folyamatokban részt vevő proteinkinázok. Ez utóbbiak közt, sejttípustól függően, ott vannak az ERK kaszkád egyes elemei is. Irodalmi közlések említik még a Ras-t, a Raf-ot, a MEK-et. A proteinkinázok általában katalitikus régiójukkal kapcsolódnak a Hsp-90 N-terminálisában található kötőhelyéhez. Az így kialakuló Hsp90 komplexek nélkülözhetetlen tagjai a p23 és a CDC37/p50 proteinek.

Az ansamycin antibiotikumok hatékonyan, kompetitív módon gátolják a 90 kDa molekulásúlyú chaperonok ATP kötését. Ez a hőshockfehérje, illetve dajkafehérje funkció károsodásához vezet, mely a Hsp90 tartalmú komplexek szétesését okozhatja, vagy megváltoztathatja sejten belüli elhelyezkedésüket, ami a stabilitásukat veszélyezteti. A Hsp90 geldanamycint vagy származékait kötő állapotában már nem a kliens fehérjék helyes konformációjának újbóli kialakítását, hanem azok lebontását segítheti elő. A Hsp90 passzív, ATP vagy ADP kötéstől független chaperone funkcióra is képes.

A Ras-ERK és a proteinkináz B/Akt jelátviteli utak PC12 sejtekben

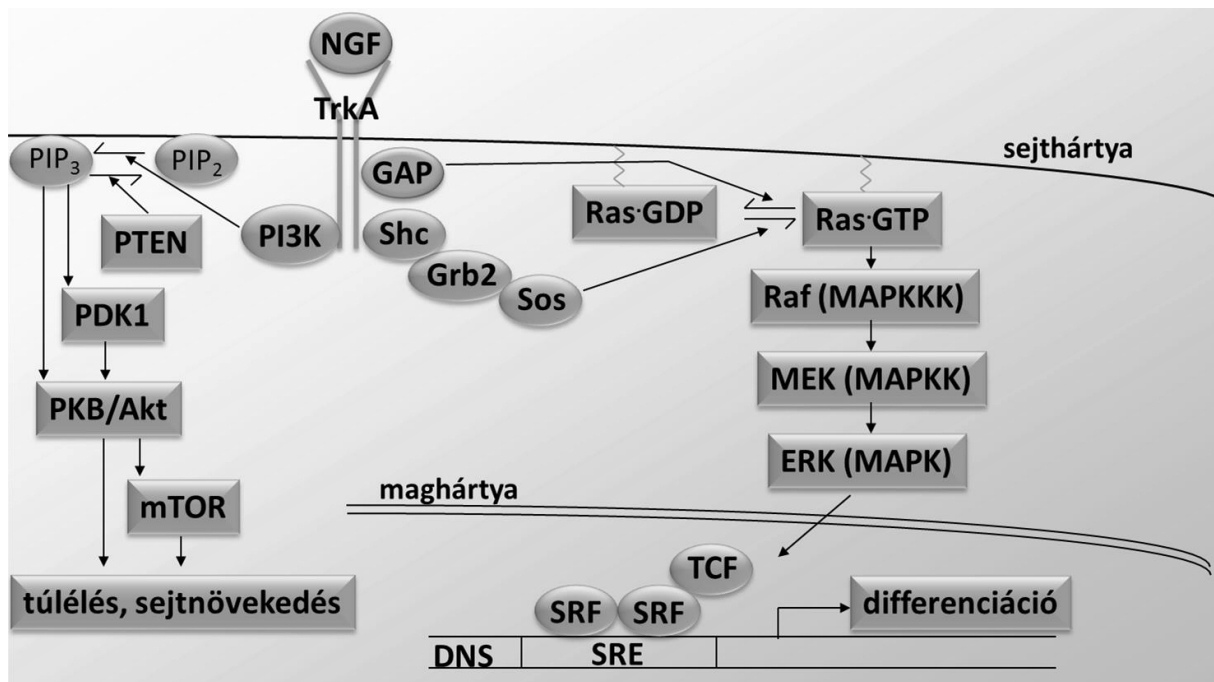
A PC12 patkány pheochromocytoma sejtvonal népszerű modell rendszere az idegsejt irányú differenciáció *in vitro* tanulmányozásának. Szérumot is tartalmazó tenyésztőmédiumban a PC12 sejteknek nincs szüksége NGF-re a túléléshez, de annak hatására a sejtek szimpatikus idegsejtekhez hasonló fenotípust vesznek fel. A ligand megkötődése utána a TrkA nagy affinitású NGF receptor transzfoszforilációja (autofoszforilációja) és aktivációja az ERK-kaszkád elnyújtott aktivációját váltja ki PC12 sejtekben, mely a differenciációt eredményezi.

A ligand bekötődésének hatására a nagy affinitású TrkA NGF receptor molekula dimerizáció után tirozin proteinkináz aktivitása segítségével foszfortirozin kötőhelyeket hoz létre önmagán SH2 doménnel rendelkező jelátviteli fehérjék számára. A folyamat eredményeként több jelátviteli út is elindul, többek közt adapter proteinek (pl. Shc és Grb2)

működésbe hoznak egy guanin nukleotid kicserélő faktort (Sos) (**1. ábra**). Ez a sejtmembrán belsejébe rögzült G-proteint, a Ras-t aktiválja, melynek inaktiválódásához a GAP nevű GTP-áz aktiváló protein szükséges. Ennek hatására a Ras az általa megkötött GTP-t GDP-vé alakítja vissza. Még ez előtt azonban, GTP kötött, aktív állapotában a Ras elindít egy egymást foszforiláló proteinkinázokból álló láncolatot, az ERK kaszkádot, mely a MAPK kaszkádok egyik típusa. Ennek sorban következő elemei a Raf (egy MAPKKK), a MEK (mely a MAPKK osztályba sorolható), és a névadó ERK (extracelluláris szignál-regulált kinázok). Ez utóbbiak citoplazmatikus célfehérjék foszforilálásán kívül a sejtmagba jutva transzkripciós faktorokat is működésbe képesek hozni, például a Serum Response Factor-t és a Ternary Complex Factor-t. Ez által az ERK enzimek, a transzkripció befolyásolásán keresztül, a differenciációt előmozdító génexpressziós változásokat indukálhatnak. A leghamarabb reagáló korai- majd ezt követően a késői válasz gének aktiválódása végül fenotípus változáshoz, szimpatikus neuronális differenciációhoz vezet.

Korábban kimutatták a TrkA interakcióját Hsp90-nel emberi neuroblastoma, és akut leukémiás sejtekben. A növekedési faktorok megvonása aktiválja a programozott sejthalál gépezetét PC12 sejtekben is, míg az NGF általi stimuláció a TrkA receptoron keresztül indirekt módon aktiválja többek között a proteinkináz B/Akt fehérjét ezzel meggátolva az apoptózist (**1. ábra**). Ezen az úton az aktivált TrkA a foszfatidilinozitol-3 kináz enzimet működésbe hozva a egy többszörösen foszforilált lipid származék, a foszfatidilinozitol-triszfoszfát (PIP₃) képződését serkenti foszfatidilinozitol-biszfoszfátból (PIP₂). Ez a PKB/Akt foszforilációjának és működésének fokozódásához vezetve a sejttúlélést mozdítja elő.

A vizsgált sejttípustól függően a geldanamycin kezelés eredménye lehet differenciáció, vagy programozott sejthalál. A PC12 sejtek apoptózisát például kiválthatja a geldanamycin. Érdekes módon ez akkor is lejátszódott, ha a geldanamycin kezeléssel együtt NGF-et is adtak a sejtekhez.



1. ábra: Az ERK-kaszád és a PKB út általános sémája. GAP: GTP-ase activating protein = GTPáz aktiváló fehérje, a G-fehérjék GTP bontó aktivitását serkenti. Shc, Grb2: adapter fehérjék. Sos: egy guanin-nukleotid kicserélő faktor, mely a G-fehérjék által kötött GDP-nek GTP-re történő cseréjét segíti. Ras: egy monomer G-fehérje. Raf, MEK (MAPK/ERK kináz), ERK (extracelluláris szignál által szabályozott kináz), PKB/Akt (proteinkináz B), PDK1 (foszfatidilinozitol-függő kináz 1), mTOR (mammalian target of rapamycin, rapamicinnel gátolható fehérje): proteinkinázok. SRE: serum responsive element, szérumszponzív-elem = egy enhancer. SRF: serum responsive factor, szérumszponzív faktor = az SRE régióhoz kötődő transzkripciós faktor. TCF: ternary complex factor, hármas komplex faktor, = az SRF segédfaktora. PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase, foszfatidilinozitol 3-kináz: egy lipidkináz. PIP₃: phosphatidylinositol trisphosphate, egy lipidtermészetű másodlagos hírvivő molekula, mely PIP₂-ből (phosphatidylinositol bisphosphate) képződik. PTEN: phosphatase and tensin homolog, foszfatáz és tenzin homológ: egy lipidfoszfatáz.

Célkitűzések

Munkánk során olyan mechanizmusokat próbáltunk azonosítani, melyek megmagyarázhatják, hogy a geldanamycin kezelés hogyan befolyásolja a TrkA receptoron keresztül történő NGF szignalizációt. Geldanamycinnel kezelt PC12 sejteinkben meg kívántuk vizsgálni:

- a TrkA nagy affinitású NGF receptor, mint Hsp90 kliens fehérje szintjének változását, és ennek hatását a proteinkináz B/Akt és ERK1/2 jelátviteli utakra;
- a TrkA-t és Hsp90-t tartalmazó komplexek esetleges szétesését;
- az MG-132 proteaszóma gátló azon hatását, mely szerint képes lehet a TrkA koncentráció változását befolyásolni;

- a proteinkináz B/Akt fehérje aktiválhatóságát MG-132-vel kombinált geldanamycin kezelések során, melynek kapcsán magyarázatot találhatnánk a geldanamycin kezelés apoptotikus következményeire;
- a TrkA sejten belüli eloszlásának esetleges eltérését a kontroll sejtektől, mely megváltozott jelátviteli folyamatok hátterében állhat;
- munkacsoportunk további kutatásai során elemezte a proteaszóma gátló ERK1/2 foszforilációt kiváltó hatását.

Anyagok és módszerek

Reagensek

Minden vegyszer a Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) terméke volt, hacsak külön nem szerepel más jelzés. Az NGF származási helye az Alomone Labs (Jeruzsálem, Izrael).

Sejtkultúra

A PC12 patkány pheochromocytoma sejteket (G.M. Cooper ajándéka), melyek 5 és 15 közötti passzázsszámmal rendelkeztek, műanyag tenyésztőedényekbe illetve Thermanox (Nalgene Nunc International, Rochester, NY, USA) fedőlemezekre ültettük ki 50%-os és 30%-os konfluenciát elérve. A megfelelő letapadás érdekében 24 óráig a sejteket 10% ló- és 5% magzati borjúsérumot is tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük. A kultúrákat 37 °C-os hőmérsékletre beállított és 5% CO₂-ot tartalmazó párasított atmoszférájú termosztátban tartottuk. Másnap a sérumban található növekedési faktorok által aktivált jelátviteli események csillapítása érdekében a médiumot 0,5% lószérumot tartalmazóra cseréltük a kezeléseket megelőző 24. órától.

Immunprecipitáció és Western blot

Kezelések után a sejtkultúrákat jégen tartott lízispufferben gyűjtöttük össze (50 mM Tris bázis, pH 7,4, 150 mM NaCl, 10% glicerin, 1 mM EGTA, 1 mM Na-ortovanadát, 5mM ZnCl₂, 100 mM NaF, 10 mg/ml aprotinin, 1 mg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100), majd -20 °C-on tároltuk. A kiolvasztott mintákat 20 másodperces vortexezéssel homogenizáltuk. A lizátumokat 40,000 x g -vel centrifugáltuk 20 percen át 4 °C-on, majd meghatároztuk a felülúszók fehérjekoncentrációját (Lowry szerint, detergens kompatibilis esszé kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A kaszpáz-3 aktivitás méréseihez a sejteket Chaps sejtextraktációs pufferben homogenizáltuk és az antitest forgalmazója (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) által javasolt utasítások szerint dolgoztuk fel.

Az immunprecipitációhoz a minták egyenlő mennyiségű fehérjét (kb. 0,5 mg) tartalmazó térfogatait 0,5 µg/µl koncentrációra hígítottuk lízispufferrel, majd 2 órán át immunprecipitációt végeztünk 1 µg anti-TrkA antitesttel (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 4 °C-on, lassú forgatás mellett. Az immunkomplexeket ezután protein A/G PLUS-agarózgyöngyök felszínén (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) kötöttük meg és néhány másodperces centrifugálással gyűjtöttük össze. A tisztító mosás a gyártó leírásának megfelelően történt, a nonspecifikus Hsp90 szennyeződés minimalizálásának érdekében a munkacsoport által korábban leírt módon változtattunk a feltételeken.

Az egyenlő mennyiségű (az immunprecipitációnál említett módon, illetve egyszerű Western blothoz, TrkA kimutatáshoz 50 µg, a többi esetben 25 µg) összfehérjéből hígított lizátumokat Laemmli-pufferrel (a 4x törzsoldat: 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 40 v/v% glicerin, 27,74 mM SDS, 10mM EDTA, 10 mM EGTA és 0,01 v/v% brómfenolkék) kevertük össze és 100 °C-on denaturáltuk. A mintákat ezután SDS-tartalmú, 10%-os (TrkA-hoz 7,5%-os, a hasított kaszpázhoz 18%-os) poliakrilamid géltre töltöttük és elektroforézissel molekulatömeg alapján szeparáltuk. A géleket PVDF membránokra (Hybond-P, GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) elektroblottoltuk.

A keresett fehérje immunológiai kimutatásához először a membránokat TBS -Tween-ben (10 mM Tris bázis, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,2% Tween-20) oldott 3% zsírmentes tejjel blokkoltuk, majd éjszakán át inkubáltuk a megfelelő elsődleges antitesttel [anti-foszfo-p44/42 MAP kináz antitest a foszfo-ERK1/2 detektálásához, anti-Akt és foszfo-Akt (Ser 473), béta-aktin és foszfo-TrkA (Tyr490), hasított kaszpáz-3 (Asp175), (Cell Signaling Technology), ERK-1 (C-16), vagy ERK-2 (C-14), Trk (C-14), Hsp90 (Santa Cruz Biotechnology)], melyet a blokkoló oldatban hígítottunk. Az antiszérumokat 1:1000 arányban hígítottuk. Előkísérletek során ennél a hígításnál az antigén-deficiens (nnr5) sejtekből izolált mintáknál (anti-TrkA vagy anti-foszfo-TrkA esetében), vagy az elsődleges antitest elhagyásakor (minden esetben) specifikus immunjel nem volt tapasztalható a várt molekulatömeg-tartományban. A nem specifikusan kötődött antitesteket 5-ször 15 perc TBS-Tween-es mosással távolítottuk el. A membránokat ezután tormagyökér peroxidázzal kapcsolt, kecske anti-nyúl másodlagos antitesttel (Pierce, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA) inkubáltuk, melyet 1:10,000 arányban hígítottunk a blokkoló oldattal. TBS-Tween-es mosásokat követően röntgenfilm expozícióval detektáltuk a kemilumineszcens (Immobilon Western, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) jelet. A digitális dokumentáció után a denzitometriát az ImageJ szoftverrel végeztük el (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

A Western blot eredmények kiértékelése

A dolgozatban bemutatott grafikonok a relatív denzitásokat mutatják a kezeletlen kontrollhoz képest, az aktin töltési kontroll, vagy foszforilált fehérje vizsgálatánál a nem foszforilált forma értékeire normalizálva (egyes esetekben mindkettőre). Az ábrázolt számértékek négy (TrkA, foszfo-TrkA) vagy öt (foszfo-ERK1/2, foszfo-Akt) független kísérlet átlagai \pm S.D. (standard deviation, szórás). Többszörös összehasonlítások során a különbségek szignifikanciáját ANOVA módszerrel és Bonferroni korrekcióval vizsgáltuk. A $P < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

A DNS fragmentáció analízise elektroforézissel

A letapadó, és az úszó/halott sejteket kaparással a saját médiumukban egyaránt összegyűjtöttük, majd 15 ml-es műanyag csövekben centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a sejtes frakciót 0,5 ml lízispufferrel (5 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,5 % Triton-X 100) jégen homogenizáltuk. A detergensben nem oldódó törmelékét centrifugálással távolítottuk el (40,000 x g-vel, 30 percig 4 °C-on), a lizátumot ezután fehérjéitől kétszeri fenolos, majd egyszeri kloroformos extrakcióval mentesítettük. A DNS-t éjszakán át, -20 °C-on, 50 μ l 3 M-os nátrium-acetát (pH 5,5) és 1 ml abszolút alkohol keverékével kicsaptuk, majd centrifugálással kiülepítettük (100,000 x g, 30 percig 4 °C-on). Ezután 0,5 ml 70%-os etilalkohollal sómentesítettük a DNS-üledéket, majd azt vákuumban megszáritottuk, végül 20 μ l Tris-EDTA pufferbe (pH 7,4) vettük fel. Az esetleges szennyező RNS-t RNáz A kezeléssel (2 mg/ml, 37 °C, 60 perc) lebontottuk. A megmaradt DNS fragmentumokat 1,8%-os agaróz gélben elektroforézissel szeparáltuk, és százszorosán hígított SYBR Gold nukleinsav festék (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) segítségével láthatóvá tettük.

Fluoreszcencia mikroszkópia

A kezeléseket egy gyors 37 °C-os PBS-sel (1,37 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,43 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,14 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) végzett mosással állítottuk le, amit 1 órás fixálás követett szobahőmérsékleten, 4% paraformaldehidet tartalmazó PBS oldatban (pH 7,4). A felesleges fixálószeret háromszor egymás után PBS-sel, majd szintén háromszor TBS-sel (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl) mostuk ki. A nonspecifikus kötőhelyeket TBS-ben oldott 5% zsírmentes tejjel blokkoltuk 1 órán át 4 °C-on enyhe rázás mellett. Az elsődleges antitesteket (TrkA: R&D Systems, Hsp90: Santa Cruz Biotechnology, foszfo-ERK1/2: Cell Signaling Technology) 1:500 arányban hígítottuk a blokkoló oldattal egy éjszakán át 4 °C-on, ismét enyhe rázás mellett. Ezt ötszöri mosás követte TBS-ben. A fluoreszcens jelet a Cy3-mal konjugált, számar, anti-nyúl antitest (Jackson Immuno Research, Cambridgeshire, UK) hozzáadása biztosította, melyet 1:500 arányban kevertünk a blokkoló oldathoz. Ennél a

hígítási aránynál az antigén-deficiens (nrr5) sejtekből (az anti-TrkA-nál) illetve a primer antitest hozzáadása nélkül (az összes mintánál) nyert metodikai kontroll preparátumok nem mutattak immunfluoreszcens jelet a mikroszkóp beállított leképezési paramétereinek mellett. A sejtmagokat Hoechst 33342 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) alkalmazásával festettük meg.

A mintákról egy Olympus FV-1000 lézer-pasztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkóp-rendszerrel készítettünk digitális felvételeket. A reprezentatív területekről egy-egy síkban képeztünk le optikai metszeteket a 40X fáziskontraszt objektíven keresztül.

A P-ERK1/2 immuncitokémia esetében a felvételeken megállapítottuk a sejtmagok területén található képpontok átlagos intenzitását ImageJ szoftver segítségével (National Institutes of Health, Bethesda, USA), majd ezt az adott képek átlagos háttérintenzitásához viszonyítva grafikonon ábráztuk. A különbségek szignifikanciáját ANOVA módszerrel és Bonferroni korrekcióval elemeztük, a $P < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

Korábbi megfigyeléseink ismételten igazolták, hogy a dimetil-szulfoxid, a geldanamycin és az MG-132 vivőanyaga nem gyakorolt hatást a megfigyelt paraméterekre az alkalmazott koncentrációkban (0,025 v/v % a külön, és 0,05 v/v % az együttes kezeléseknél).

1. A geldanamycin hatása a PC12 patkány pheochromocytoma sejtekre idő- és dózisfüggő.

A PC12 sejtek idő- és dózisfüggő módon reagáltak a geldanamycinre. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan mi is azt tapasztaltuk, hogy ha a sejteket folyamatosan az antibiotikum nagyobb, 1,78 μM -os (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dóziséval kezeltük, azok már 16 óra elmúltával apoptózissal reagáltak, ahogy ezt a kaszpáz-3 aktiváció is mutatta Western blotunkon. Ezen dózis tizedének (0,178 μM) legalább 24 óráig jelen kellett lennie a kultúrákban, hogy a kaszpáz-3 a hasítás kezdeti jeleit mutassa, viszont csupán 16 óráig alkalmazva biztonságosnak bizonyult és nem követte programozott sejthalál. Ezeket az eredményeket a DNS fragmentáció analízisével is alátámasztottuk: az apoptózis jelei 1,78 μM (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) geldanamycin jelenlétében észlelhetőek voltak 24 óra elmúltával, a kisebb, 0,178 μM dózis esetén 16 óránál viszont még nem.

2. *A geldanamycin csökkenti a TrkA szintjét.*

Ezután megvizsgáltuk a geldanamycin hatását a TrkA NGF receptor expressziós szintjére az említett, apoptózist nem okozó kísérleti feltételek mellett. A sejthalált még nem kiváltó kezelés a TrkA receptor koncentrációjának jelentős csökkenéséhez vezetett a PC12 sejt kultúrában Western-blotjaink tanúsága szerint.

3. *A proteaszóma gátló részlegesen visszaállítja a TrkA fehérje mennyiségét PC12 sejtekben*

Amikor az MG-132 specifikusan proteaszómákat gátló vegyületet együtt alkalmaztuk geldanamycinnel, ez utóbbinak a TrkA mennyiségét csökkentő hatása lényegesen gyengébb volt, ahogy ezt Western blotjaink segítségével megállapíthattuk.

4. *TrkA és Hsp90 disszociációja geldanamycin kezelés hatására*

A Hsp90 gátlás hatására bekövetkezett TrkA szint csökkenést látva úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk a nagy affinitású NGF receptor és a 90 kDa-os dajkafehérje egymáshoz való kötődését ko-immunprecipitációs technika segítségével. Míg a TrkA és a Hsp90 kezeletlen PC12 sejtekből származó mintákban együtt precipitálódtak a kísérlet során, geldanamycin kezelés után interakciójuk már nem volt megfigyelhető. Proteaszóma gátló és a Hsp90 gátló együttes hozzáadása esetén ez a kapcsolat nem jött újra létre. A TrkA receptorhoz kötődő chaperone mennyiségének csökkenését nem a dajkafehérje sejten belüli koncentrációjának megváltozása eredményezi.

5. *A proteaszóma funkció gátlása visszaállítja az NGF indukálta TrkA foszforilációt geldanamycinnel kezelt PC12 sejtekben*

Annak érdekében, hogy megtudjuk, a lebontástól MG-132 által „megmentett” TrkA fehérje még mindig aktiválható-e NGF-fel, Western-blot vizsgálatokat végeztünk a TrkA foszforilált formájára specifikus antitestekkel a geldanamycin és MG-132 kezeléseket követően. A geldanamycinnel blokkolt TrkA foszforiláció NGF általi indukálhatósága a proteaszóma egyidejű gátlásával sikeresen visszaállítható volt. Sőt, a geldanamycinnel és MG132-vel egyaránt kezelt mintákból származó lizátumokban a TrkA foszforiláció NGF általi indukálhatósága még erősebbnek is mutatkozott, mint ahogy azt a növekedési faktoron kívül más szerrel nem kezelt kontroll tenyészetekben láttuk. Ez a megfigyelés összhangban áll a Song és mtsai (2009, 2011) által az MG-132-nek a TrkA-ra gyakorolt hatásáról leírtakkal.

6. Az ERK 1 és 2 foszforiláció csökkenése geldanamycin kezelést követően

Ezek után további Western blotok segítségével megvizsgáltuk, a visszatért NGF általi TrkA aktiváció sikeresen átadódik-e a jelátviteli úton lejjebb található proteinkináz kaszkád tagjainak geldanamycinnel és MG-132-vel egyaránt kezelt sejtekben. Az ERK 1 és 2 foszforilációjának kimutatása, mely az NGF jelátviteli hatásának könnyen megfigyelhető fokmérője, felfedte, hogy az apoptózist még nem okozó alacsony dózisú és rövidebb idejű geldanamycin kezelés már jelentősen meggyengítette az NGF által indukált ERK 1 és 2 aktivációt.

7. A proteaszóma funkció gátlása helyreállítja az NGF által indukált ERK1/2 foszforilációt geldanamycinnel kezelt PC12 sejtekben.

Western blotok tanúsága szerint Hsp90-gátlóval együtt adott MG-132 proteaszóma gátló vissza tudta állítani az ERK1/2 NGF hatására létrejövő aktivációját a pusztán geldanamycinnel és NGF-fel kezelt sejt kultúrákhoz képest. Az ERK foszforiláció proteaszóma gátlásnál némileg megemelkedett alapszintje az MG-132 ERK aktivációt kiváltó hatásával magyarázható meg. A membránok újbóli vizsgálata a nem foszforilált, azaz teljes ERK1/2 frakcióra kizárta, hogy az ERK 1/2 foszforiláció megjelenített különbségeit gélöltési eltérések, vagy egyéb technikai hibák okozták volna.

8. A geldanamycin kezelés gátolja az Akt foszforilációt.

A Hsp90 dajkafehérje gátlása miatt nemcsak az ERK1/2, hanem a proteinkináz B/Akt NGF által kiváltott aktivációja is sérült. Az Akt alapszintű foszforilációja is lecsökkent egy alig érzékelhető szintre geldanamycin kezelés után. (Western blot)

9. A proteaszómák gátlása nem állítja helyre a proteinkináz B/Akt NGF által indukált foszforilációját geldanamycinnel kezelt PC12 sejtekben.

Western blotjaink tanúsága szerint, amikor az MG-132 proteaszóma gátlót a geldanamycinnel együtt ugyanolyan körülmények között alkalmaztuk, mint amelyek hatására az NGF által okozott ERK1/2 aktiváció visszatért, a proteinkináz B/Akt foszforiláció növekedés nem állt helyre NGF adása után. Az alapszintű Akt aktiváció azonban magasabb volt proteaszóma gátlóval történt előkezelés után, ahogy ezt korábban Moises és mtsai (2009) is kimutatták.

10. A TrkA fehérje sejten belüli eloszlása megváltozik geldanamycinnel és MG-132-vel kezelt PC12 sejtekben (immuncitokémia).

Az MG-132 proteaszóma gátló és a geldanamycin együttes alkalmazása hatékonyan megvédte a degradációtól a TrkA fehérjék jelentős hányadát, ahogy ezt Western blotjaink is mutatták. A „megmentett” TrkA intracelluláris lokalizációja azonban drámai különbségeket mutatott a kezeletlen PC12 sejtek immunpozitív mintázatához képest. A nem kezelt kontroll sejtekben a TrkA jelentős hányada a sejtthártya közvetlen közelében volt megfigyelhető. A Hsp90 gátló geldanamycinnel kezelt sejtek TrkA jele az egyes sejtek szintjén alig detektálható volt. A geldanamycinnel és az MG-132 proteaszóma gátlóval együttesen kezelt kultúrák sejtjeiben a TrkA immunreaktivitás visszanyerte a kontrollban látott erősségét, de az már nem a sejtthártya mentén volt intenzívebb, hanem egyenletesen megoszlott az egész citoplazmában. Az önmagában alkalmazott proteaszóma gátlás nem volt hatással a TrkA eloszlás sejten belüli mintázatára a kezeletlen kontrollhoz képest. (A P-TrkA intracelluláris lokalizációját sajnos nem tudtuk megvizsgálni, mert a Western blot során használt antitest a gyártó leírása szerint nem alkalmas immuncitokémiai módszerek véghezvitelére, amit ismételten sikertelen saját próbálkozásaink is alátámasztottak.)

11. A Hsp90 PC12 sejteken belüli megoszlása megváltozik geldanamycin és MG-132 kezelés hatására (immuncitokémia).

Miután észleltük a TrkA eloszlás változásait, megvizsgáltuk a Hsp90 sejten belüli elhelyezkedésének változásait is. Kezeletlen sejtekben és geldanamycin hatására a Hsp90 immunjel főleg a citoplazma feletti, egyenletes megoszlást mutatott. Miután azonban a geldanamycin kezelést MG-132-vel is kombináltuk, a Hsp90 inkább a citoplazma periferiájára helyeződött át. Az egyszerű proteaszóma gátló kezelés nem volt hatással a Hsp90 immunjel intracelluláris mintázatára a kezeletlen kontrollhoz képest. A Hsp90 fehérje szintjét nem befolyásolták a geldanamycin és/vagy MG-132 kezelések, ezt a korábbi Western blotjaink is igazolták.

12. Az MG-132 proteaszóma gátlóval kiváltott ERK1/2 foszforiláció kinetikája PC12 sejtekben

Az önmagában történő MG-132 kezeléseknél észlelt ERK1/2 aktivációt Hashimoto és mtsai (2000) nyomán kutatócsoportunk további munkája során tüzetesebben is vizsgáltuk. A sejtek különböző idejű MG-132 kezelése után anti-foszfo-ERK1/2 antitestekkel végeztünk Western blot vizsgálatokat. Az ERK1/2 a kezeletlen kontrollhoz képest emelkedett

foszforilációja már 15 perc elteltével észlelhető és ezután elnyújtott jellegű volt, a mérsékelt szintről felemelkedve a 6 órás előkezelésnél jelentkező csúcscsal. 24 óra elteltével az aktiváció szintje még mindig magasabb volt, mint a kezeletlen tenyészetekben. A különböző minták teljes ERK1/2 tartalmát ugyanazon a membránon megvizsgálva normalizáltuk a denzitometriás analízis értékeit.

13. A foszforilált ERK1/2-nek a PC12 sejtek magjába történő áthelyeződése az MG-132 proteaszóma gátló hatására

A foszfo-ERK1/2 sejten belüli megoszlásának változását MG-132 előkezelés után fluoreszcens immuncitokémia segítségével vizsgáltuk. Kezeletlen tenyészetekben a gyenge jel főleg citoplazmatikus elhelyezkedésű volt. A 6 órás MG-132 proteaszóma gátló kezelés megnövelte a citoplazmatikus és a sejtmagban található aktivált ERK1/2 mennyiségét, hasonlóan a 3 órás NGF kezeléshez. A foszfo-ERK1/2 magba történő ezen áthelyeződése és fenntartott aktivációja alátámasztja azt a jelenséget, mely szerint az MG-132 kezelés az NGF-hez hasonlóan nyúlványok növekedését eredményezi PC12 sejtekben.

Diszkusszió

Kutatásunk eredményeivel igazoltuk, hogy a vad-típusú PC12 patkány pheochromocytoma sejtek geldanamycinnel való kezelése a TrkA fehérje szintjének csökkenéséhez vezet, még jóval a programozott sejthalál folyamatának kezdete előtt. A különböző sejtvonalak, például a PC12 sejtek érzékenysége a szerre a klonális különbségek, a passzázsszám és a tenyésztési körülmények függvényében változhat. A geldanamycin általunk alkalmazott dózisa csak tizede volt annak, amit más kutatócsoportok apoptózis kiváltására használtak. Az általuk leírt kezelési időket továbbá körülbelül harmadával csökkentettük. Az enyhébb kezelés ellenére az NGF okozta ERK1/2 és proteinkináz B/Akt stimuláció egyaránt gátlódott ezen körülmények között.

Az MG-132 proteaszóma gátló egyidejű hozzáadása segített magasabban tartani a TrkA koncentrációját, mint ahogy azt a csupán geldanamycinnel kezelt kultúrákban láttuk, valamint a receptor NGF általi foszforilációját ismét lehetővé tette. A TrkA NGF-fel kiváltott aktivációja még intenzívebb is volt a geldanamycin és proteaszóma gátló kettősével kezelt, mint az előkezelésben nem részesült PC12 sejtekben. Az MG-132 proteaszóma inhibitor NGF hatást felerősítő képességét Song és mtsai (2009, 2011) is feltárták. Mindazonáltal az NGF

Trk-re kifejtett aktiváló hatása a geldanamycinnel és MG-132-vel egyaránt előkezelt kultúrákban csak az ERK1/2 irányába vezetődött tovább a jelátviteli utakon, a proteinkináz B/Akt-ra viszont nem.

Kezeletlen PC12 sejtekben a TrkA jel intracelluláris eloszlása az előzetes elvárásoknak megfelelően citoplazmatikus volt, miközben az immunpozitivitás jelentős része a periféria felé, a sejtthártya közvetlen közelében tömörült. A Western blot eredményeknek megfelelően a TrkA immunjel geldanamycin hatására jelentősen gyengébb lett, de visszanyert erősségéből, ha a Hsp90 antagonistá kezeléssel egyidejűleg az MG-132 proteaszóma gátló is jelen volt. A visszatérő intenzitás ellenére a TrkA eredeti, sejtmembránhoz asszociált frakcióját az MG-132 nem állította helyre a geldanamycinnel kezelt sejtekben. A TrkA ezen újonnan szerzett sejten belüli pozíciója felveti annak lehetőségét, hogy ez lehet a jelátviteli utak mentén lefelé mutató kapcsolódások megváltozásának hátterében. Érdekes módon, a geldanamycinnel és MG-132-vel együtt kezelt sejtekben a Hsp90 egy ellenkező irányú eltolódást mutatott a sejtthártya felé. Jelenleg csak találgathatjuk ez utóbbi megfigyelés jelentőségét. Lehetséges, hogy az MG-132 egy igen hidrofób vegyületként elsősorban a citoplazma perifériás régióit éri el diffúzióval. Itt a Hsp90 partner fehérjéinek felgyülemlését okozhatja, melyeket a geldanamycin kiszakított a dajkafehérjével alkotott komplexből, de az MG-132 megmentett a proteaszómális lebomlástól. Ezen fehérjék felhalmozódása a Hsp90 kompenzatórikus átrendeződését eredményezheti ugyanabba az irányba. Ez egy olyan jelenség, mely méltán számíthat további figyelmünkre.

Ismeretes, hogy a multimolekuláris komplexek szerveződése jelentősen növeli a sejten belüli jelátvitel hatékonyságát. A TrkA megváltozott intracelluláris elhelyezkedése geldanamycinnel és MG-132-vel együttesen kezelt sejtekben felveti annak lehetőségét, hogy a TrkA proteinek jelentős hányada nincs elég közel a sejtthártyához ahhoz, hogy összes célfehérjéjét és jelátviteli útjai további kaszkádjait hatékonyan stimulálni tudja. Jullien és mtsai (2003) leírták, hogy a gp140 TrkA a TrkA egyetlen olyan formája, mely a PC12 sejtek felszínén detektálható. Vizsgálataik során az NGF kezelés megkezdése után 15 perccel a receptor ezen típusának 70%-a eltűnt a sejt felszínéről. Grimes és mtsai (1996) hasonló eredményei szerint a korábban a sejt felszínén megjelölt receptorok 66%-a az NGF kezelés 20. percében már a sejt belsejében tartózkodott. Jelenleg nem tudjuk pontosan megmondani, hogy a geldanamycinnel kezelt sejtekben proteaszóma gátlással megmentett TrkA receptorok miért nem tértek vissza eredeti, sejtthártyához asszociált pozíciójukba. Több olyan pont is létezik a TrkA szokásos és mindemellett dinamikus forgalmában, ahol a proteaszómák gátlása beavatkozhat a történésekbe. Sommerfeld és mtsai (2000) kísérleteiben a TrkB, az agyi

neurotrofikus faktor (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) receptora a ligand kötődését követően szintcsökkenést mutatott. Ez a folyamat a proteaszómák gátlásával megelőzhető volt. NGF adagolása után a TrkA gyorsan és tranziens módon ubikvitinálódik, és már kimutatták, hogy proteaszómák segítségével történő de-ubikvitinálódása után lizoszómálisan lebomlik. Itt a p62 nevű strukturális protein ingázó fehérjeként működik közre a TrkA internalizációjában és transzportjában. A sejtbe való bejutás után a következő lépcső a korai a késői endoszómába való átjutás, majd multivezikuláris testecskékbe, végül a lizoszómális degradáció következik. Ez utóbbi alternatívája lehet a TrkA visszajutása a korai endoszómából a sejtthártyába recirkuláló endoszómák segítségével.

Zhang és mtsai (2000) tanulmánya szerint a PC12 sejtek neuronális differenciációját a sejtben belüli endoszómákban elhelyezkedő katalitikusan aktív Trk fehérjék segítik elő. Ezzel ellentétben a túlélési válaszokat az aktivált receptorok sejt felszínén elhelyezkedve kezdeményezik, ahonnan a proteinkináz B/Akt elnyújtott aktivációját idézik elő. A TrkA és az intracelluláris jelátvivő molekulák közötti kölcsönhatást mind az aktivált receptorok foszfortirozin oldalláncai, mind a TrkA fehérje elhelyezkedése befolyásolja. Az aktiválódott receptor alegységek foszforilálódott tirozinjaik segítségével több enzimet és egyéb jelátvivő fehérjét tartalmazó komplex felépülését teszik lehetővé. A TrkA megváltozott sejtben belüli eloszlása, a fehérjelokalizáció szempontjából legalábbis, megmagyarázhatja, hogy a receptor NGF okozta aktivációja miért nem vezetett a proteinkináz B/Akt foszforilációjához az említett körülmények között.

Az MG-132 hatásainak felderítéséhez munkacsoportunk tovább folytatta kísérleteit, melynek nyomán fény derült arra, hogy a proteaszóma gátló az NGF-hez hasonló módon elnyújtott jellegű ERK1/2 foszforilációt váltott ki annak sejtmagba történő áthelyeződésével párhuzamosan. Az ERK ezen viselkedése PC12 sejtekben neuritnövekedéshez, illetve idegi irányú differenciációjához vezet, így nem meglepő módon az MG-132 kezelés szintén nyúlványképződést indukált ezekben a sejt kultúrákban. Tovább vizsgáltuk azt is, hogy az NGF receptor- ERK kaskád tengely mely elemei szükségesek a leírt aktivációhoz, külön figyelmet fordítottunk a Src nonreceptor-tirozin proteinkinázra.

Kísérleteinkkel rávilágítottunk arra, hogy a fehérje-fehérje interakciók, a multiprotein komplexek létrejötte, ezen belül is az ubikviter Hsp90 fehérjét tartalmazó heteromultimerek szerveződése létfontosságú a jelátviteli folyamatok szempontjából. Úgy hisszük, hogy megfigyeléseink elősegíthetik a geldanamycin és az MG-132, e két jelentős emberi terápiás potenciállal rendelkező szer hatásmechanizmusainak megértését.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok témavezetőmnek, ifj. Dr. Sétáló Györgynek, aki nélkül nem ijöhetett volna létre ez a dolgozat. Tudományos Diákkörös témavezetőmként lehetővé tette, hogy elkezdjem a munkámat ebben a témakörben, azóta is tanácsaival és iránymutatásával támogatja tevékenységemet szoros együttműködésünk során munkacsoportunkban.

Szeretnék köszönetet mondani programvezetőmnek, Dr. Szeberényi József professzor úrnak, amiért lehetővé tette munkámat az Orvosi Biológiai Intézetben. A dolgozat elkészítése közben is nagyon sok segítséget kaptam részéről, a tőle megszokott alaposággal mutatott rá a hiányosságokra és hibákra.

Nagyon köszönöm Dr. Tarjányi Oktáviának, hogy közös munkánk során hatékony együttműködése lehetővé tette, hogy kerek egészé formáljam téziseimet.

Hálásan köszönöm Dr. Ábrahám Hajnalkának, Dr. Mikó Évának és Dr. Pétervári Erikának gondos munkájukat az előbírálati dolgozatom értékelése során.

Megköszönöm a rengeteg áldozatos laboratóriumi munkát munkacsoportunk asszisztensének, Vecsernyés Mónikának. Fáradhatatlan technikai hozzájárulása nélkül nem tudtam volna hatékonyan megosztani időmet a különböző kutatási és az oktatási tevékenységeim között.

Köszönöm Dr. Bátor Juditnak, hogy megosztotta velem tapasztalatait a PhD eljárással és a dolgozat megírásával kapcsolatban, és segített a hibák kigyomlálásában. Remélem, a jövőben még lesz lehetőségünk egy másik kutatási témában is együtt dolgozni.

Nagyon köszönöm a segítséget az Orvosi Biológiai Intézet többi munkatársának, akik tevékenyen részt vettek a kutatási projektben, vagy háttérmunkával, anyagok előkészítésével és tanácsaikkal segítettek munkám során.

Nagyon örülök és hálás vagyok számos kooperációs partnerünknek, hogy ennyiféle különböző érdekes projektben vehettem részt, melyekben szaktudásommal értékes segítséget nyújthattam. Szerencsésnek érzem magam, hogy ilyen sokféle biológiai problémával találkozhatok munkám során, melyek újra és újra lenyűgöznek.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak, mindenekelőtt drága feleségemnek, Farkas Zitának, hogy számunkra és két gyermekünk számára az otthon megteremtésével és áldozatvállalásával biztos háttérrel nyújtott, hogy a megfelelő időben figyelmemet zavartalanul a munkámra fordíthassam.

A PhD munka során létrejött publikációk

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények (IF: 5,538)

Berta Gergely, Harci Alexandra, Tarjányi Oktávia, Vecsernyés Mónika, Balogh András, Pap Marianna, Szeberényi József, Sétáló György Jr: Partial rescue of geldanamycin-induced TrkA depletion by a proteasome inhibitor in PC12 cells. *Brain Research* 1520: pp. 70-79. (2013) **IF: 2.879**

Tarjányi Oktávia, Berta Gergely, Harci Alexandra, Bacsa Eszter, Stark Borbála, Pap Marianna, Szeberényi József, Sétáló György Jr: The role of Src protein in the process formation of PC12 cells induced by the proteasome inhibitor MG-132. *Neurochemistry International* 63:(5) pp. 413-422. (2013) **IF: 2.659**

Egyéb közlemények (IF: 23,893)

Szeberényi József, Bátor Judit, Berta Gergely, Fábrián Zsolt, Kiss Katalin, Komáromy László, Pap Marianna, Sétáló György Jr: Experiments in Molecular Cell Biology: A Problem-oriented Basic Science Course in a Medical Curriculum. In: Crabtree H, Darvill A, Holland K, MacKay S, McLoughlin M, Oakley D, Supyk J (szerk.): *Problem-based Learning 2004: A Quality Experience*. Salford: Univ. of Salford, 2006. pp. 80-89.

Talabér Gergely, Boldizsár Ferenc, Bartis Domokos, Pálincás László, Szabó Mariann, Berta Gergely, Sétáló György, Németh Péter, Berki Tímea: Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *International Immunology* 21:(11) pp. 1269-1276. (2009) **IF: 3.403**

Bátor Judit, Varga Judit, Berta Gergely, Barbakadze Tamar, Mikeladze David, Ramsden Jeremy, Szeberényi József: Sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, fails to bypass the block of neuronal differentiation in PC12 cells imposed by a dominant negative Ras protein. *Cellular & Molecular Biology Letters* 17:(3) pp. 323-332. (2012) **IF: 1.953**

Hafner Dóra, Bodnár Zsófia, Horvatovich Katalin, Berta Gergely, Kovács Melinda: Preliminary investigations into the effect of feeding mannan oligosaccharide (MOS) on the genotoxic effect of T-2 toxin in rabbits measured by comet assay. *Acta Agriculturae Slovenica* 100:(Suppl. 3) pp. 351-355. (2012)

- Hamar János, Sólymár Margit, Tanai Edit, Cséplő Péter, Springó Zsolt, Berta Gergely, Debreceni Béla, Koller Ákos: Bioassay-comparison of the antioxidant efficacy of hydrogen sulfide and superoxide dismutase in isolated arteries and veins. *Acta Physiologica Hungarica* 99:(4) pp. 411-419. (2012) **IF: 0.882**
- Kiszler Gábor, Várhalmi Eszter, Berta Gergely, Molnár László: Organization of the sensory system of the earthworm *Lumbricus terrestris* (Annelida, Clitellata) visualized by DiI. *Journal Of Morphology* 273:(7) pp. 737-745. (2012) **IF: 1.602**
- Halász Melinda, Polgar Beáta, Berta Gergely, Czimbalek Lívია, Szekeres-Barthó Júlia: Progesterone-induced blocking factor differentially regulates trophoblast and tumor invasion by altering matrix metalloproteinase activity. *Cellular And Molecular Life Sciences* 70:(23) pp. 4617-4630. (2013) **IF: 5.615**
- Horvatovich Katalin, Hafner Dóra, Bodnár Zsófia, Berta Gergely, Hancz Csaba, Dutton Mike, Kovács Melinda: Dose-related genotoxic effect of T-2 toxin measured by comet assay using peripheral blood mononuclear cells of healthy pigs. *Acta Veterinaria Hungarica* 61:(2) pp. 175-186. (2013) **IF: 1.173**
- Karsai Gergely, Pollák Edit, Wacker Matthias, Vömel Matthias, Selcho Mareike, Berta Gergely, Nachman Ronald J., Isaac R. Elwyn, László Molnár, and Wegener Christian: Diverse in- and output polarities and high complexity of local synaptic and non-synaptic signaling within a chemically defined class of peptidergic *Drosophila* neurons. *Frontiers In Neural Circuits* 7: Paper 127. 22 p. (2013) **IF: 3.333**
- Dénes Viktória, Czotter Nikoletta, Lakk Mónika, Berta Gergely, Gábrriel Róbert: PAC1-expressing structures of neural retina alter their PAC1 isoform splicing during postnatal development. *Cell And Tissue Research* 355:(2) pp. 279-288. (2014) **IF: 3.677**
- Kellermayer Zoltán, Fisi Viktória, Mihalj Martina, Berta Gergely, Kóbor József, Balogh Péter: Structural characteristics and cellular constituents of the follicular deposition of marginal zone macrophage receptor MARCO in the mouse spleen. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 62(6):436-449 (2014) **IF: 2,255**

Az értekezés témájában készült posztterek, előadások, absztraktok

György Sétáló ifj., Gergely Berta, József Szeberényi: The role of 90 kDa chaperones in PC12 cells. FEBS Special Meeting 2003 on Signal Transduction, Bruxelles, 3-8 July 2003.

György Sétáló Jr., Gergely Berta, Borbála Stark, Oktávia Tarjányi and József Szeberényi: The effect of proteasome inhibition on PC12 rat pheochromocytome cells. 30th

FEBS Congress 9th IUBMB Conference, Budapest, 2-7 July 2005. Published abstract: FEBS Journal Volume 272 Supplement 1 July 2005 pp315

Ifj. Sétáló György, Berta Gergely és Szeberényi József: Geldanamycin hatása PC12 sejtekben. XI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2003. április 15-17.

Berta Gergely, Ifj. Sétáló György, Stark Borbála és Szeberényi József: Geldanamycin és MG-132 hatásai patkány feokromocitóma (PC12) sejtekben. XII Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2004. április 16-18.

Berta Gergely, Stark Borbála, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: Proteaszómagátlás hatásának vizsgálata PC12 patkány feokromocitóma sejtekben. XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, 2005. április 10-12.

Stark Borbála, Berta Gergely, Tarjányi Oktávia, Harci Alexandra, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: Proteaszóma gátlás hatása PC12 patkány feokromocitóma sejtek differenciációjára és túlélésére. 36. Membrán-Transzport konferencia, Sümeg, 2006. május 23-26.

Stark Borbála, Berta Gergely, Tarjányi Oktávia, Harci Alexandra, Varga Judit, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: MG-132 jelátviteli és morfológiai hatásai patkány feokromocitóma tenyészetekben. A Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30-szeptember 2.

Stark Borbála, Harci Alexandra, Balogh András, Berta Gergely, Ifj. Sétáló György, Szeberényi József: Egy peptidil-aldehid proteaszóma gátló (MG-132) jelátviteli hatásainak vizsgálata patkány feokromocitóma (PC12) sejtekben. Semmelweis Egyetem PhD Tudományos Napok, Budapest, 2007. április 12-13.

Harci Alexandra, Berta Gergely, Stark Borbála, Ifj. Sétáló György, Szeberényi József: Patkány feokromocitóma (PC12) sejtek differenciációjának vizsgálata proteaszóma gátló (MG-132) és Src-inhibitorok (PP1, PP2) jelenlétében. Semmelweis Egyetem PhD Tudományos Napok, Budapest, 2007. április 12-13.

Harci Alexandra, Berta Gergely, Stark Borbála, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: Proteaszóma gátló (MG-132) és Src-inhibitorok (PP1, PP2) differenciációs hatásainak vizsgálata patkány feokromocitóma (PC12) sejtekben. XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007. április 15-17.

Stark Borbála, Harci Alexandra, Berta Gergely, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: Egy peptidil-aldehid Proteaszóma gátló (MG-132) jelátviteli hatásainak vizsgálata patkány feokromocitóma (PC12) sejtekben. XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007. április 15-17.

Berta Gergely, Stark Borbála, Tarjányi Oktávia, Harci Alexandra, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: MG-132 proteaszóma gátló differenciációs és apoptotikus hatása PC12 sejtekben. A Magyar Humángenetikai társaság VII. Kongresszusa, Pécs, 2008. július 11-13.

Harci Alexandra, Berta Gergely, Stark Borbála, Ifj. Sétáló György, Szeberényi József: Patkány feokromocitóma (PC12) sejtek differenciációjának vizsgálata proteaszóma gátló (MG-132) és Src-inhibitorok (PP1, PP2) jelenlétében. PhD Tudományos Napok, Budapest, 2009. március 30-31.

Gergely Berta, Alexandra Harci, Oktávia Tarjányi, Mónika Vecsernyés, András Balogh, Marianna Pap, József Szeberényi and György Sétáló, Jr.: Partial rescue of geldanamycin-induced TrkA depletion by a proteasome inhibitor in PC12 cells. 2nd International Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, september 11-12. 2013.