

Az extracelluláris szignál-regulált kináz ösztrogén általi aktivációja differenciálódó idegsejtekben

PhD értekezés tézisei

Készítette: Ifj. Sétáló György

Témavezető: Szeberényi József

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biológiai Intézet

Pécs, 2002

Tudományos háttér

Az extracelluláris szignál-regulált fehérjekináz kaszkád és működése

Az extracelluláris szignál-regulált kinázok (ERK) a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) családjába tartozó fehérjék. Eukarióta sejtekben megtalálható izoformáik közül a legtöbb figyelmet az 1-es és 2-es izoformák kapták (ERK1 és 2). Ezek az enzimek tipikusan sejt felszíni, katalitikus aktivitással bíró receptorok ingerületét közvetítik a citoplazma különböző fehérjei, illetve megfelelő körülmények között a sejtmag felé, egy többlépcsős kaszkád folyamat végrehajtóiként.

A sejt felszíni receptorokról a jel először adapter és guanin nukleotid-kötő fehérjéken keresztül, mint például a Ras fehérjék, a Raf fehérjekináz család tagjaihoz jut el. A Raf fehérjék közül a c-Raf-1 izoforma jelen van a legtöbb sejtfeleségben, míg a B-Raf előfordulása korlátozottabb, de az idegrendszer sejtjeiben megtalálható. Működését tekintve a Raf egy szerin/treonin kináz, mely a kaszkádban, az alatta elhelyezkedő mitogén-aktivált/extracelluláris szignál-regulált kináz kináz (MEK) enzimes család tagjait foszforilálja és aktiválja. A MEK-ek számos képviselője közül szintén az 1-es és 2-es izoforma a legjobban ismertek. Aktivitásukat illetően kettős specificitású kinázok, melyek szubsztrátjukat, az ERK1- és 2-t, treonin és tirozin aminosavakon foszforilálják. Az így aktivált ERK1/2 ezután citoplazmatikus, vagy magfehérjéket foszforilál szerinen és treoninon. Ezek közül az egyik a riboszómális S6 kináz (Rsk) fehérje, mely az ERK1/2-általi foszforiláció-/aktivációját követően bejuthat a sejtmagba, s ott transzkripciós faktorok működésének módosításával vehet részt a génaktivitás szabályozásában. A génexpresszió hasonló szabályozására az ERK1/2 közvetlenül is képes, ehhez azonban ezeknek a kinázoknak is be kell jutniuk a sejtmagba. Ennek a nukleáris transzlokációként is ismert folyamatnak a pontos mechanizmusa az ERK1/2 esetében még ismeretlen. Különösen érdekes, hogy ezeken az enzimeken nem sikerült azonosítani nukleáris lokalizációs szignált, ami egyéb, sejtmagba bejutni képes fehérjéken jelen van, s azok magba jutását irányítja. Az ERK1/2 sejtmagba jutásának az egyik feltétele az enzim megfelelően elnyújtott időkinetikával történő aktivációja. A fibroblaszt eredetű (FGF) és idegsejt növekedési faktorok (NGF) képesek az ERK1/2 ilyen jellegű aktiválására, és nukleáris transzlokációjának előidézésére patkány feokromocitóma, PC12 sejtekben. A rövidebb ideig tartó, csak átmeneti ERK-aktivációt előidéző hám eredetű növekedési faktorról (EGF) történő kezelést követően az ERK1/2 ugyanebben a sejt típusban a citoplazmában marad. Érdekes módon a kezelések végső kimenetele is teljesen eltérő a kétféle aktivációs kinetikát követően. FGF és NGF hatására a PC12 sejtek szaporodása megáll, majd nyúlványnövekedéssel kísért differenciálódással szimpatikus idegsejtekhez hasonlóvá válnak, míg EGF adására ellenkezőleg, az osztódás fokozódásával reagál, és nem differenciálódik ez a sejtvonal.

A MAPK kaszkád hagyományos, polipeptid növekedési faktorok általi aktivációja mellett az utóbbi időben az enzimpláncolat alternatív serkentési lehetőségeiről is jelentek meg közlemények. Így a munkánk egyik központi témáját képező ösztrogén általi ERK aktivációt is leírták különféle rendszerekben.

A 90 kilodalton molekulatömegű hősokkfehérje szerepe a szteroid receptor és fehérjekináz jelátvitelben

A 90 kilodalton molekulatömegű hősokkfehérje, a Hsp90 egy ubikviter, magas expressziójú, a sejt teljes fehérjekészletének akár 0,5-1%-át is kitevő protein. Funkcióját tekintve a molekuláris "chaperone"-ok közé tartozik, azaz egyéb fehérjemolekulákhoz kapcsolódva, azok normális működőképességéhez az előnyös térszerkezet fenntartásában segédkezik.

Szinte valamennyi szteroid receptor működéséhez nélkülözhetelen a receptorhoz asszociált Hsp90. A hősokk fehérje meghatározhatja a receptor sejten belüli elhelyezkedését, és azt a ligand fogadására kész konformációban tartja.

Ezen kívül számos fehérjekinázról is ismert, hogy Hsp90-hez kapcsolt állapotban fordul elő a sejtben. Ez esetben a Hsp90 a kináz partner stabilitását, illetve térszerkezetének helyes kialakulását és megtartását hivatott biztosítani.

Az ösztrogén neuritogén hatása

Egér és patkány különféle agyterületeiből, a születést követő korai időszakban készített organotipikus (szeletszerű) idegszövet tenyészetek erősebb nyúlványnövekedést és gazdagabb nyúlványelágazódást mutatnak, ha tenyésztőfolyadékuk 17- β -ösztradiolt tartalmaz. Az ösztrogén e neuritogén hatása a hetvenes évek vége óta ismert, de a jelenség mögött húzódó molekuláris mechanizmus ma sem teljesen tisztázott. Több, a nyúlványnövekedésben struktúrális szereppel bíró fehérjéről kimutatták, hogy génje ösztrogén érzékeny szabályozó szekvenciát tartalmaz. E transzkripciót módosító hatáson kívül az ösztrogén képes fehérjekinázok működését is befolyásolni (lásd később), melyeknek szintén lehet a neuritogenezissel kapcsolatos szerepe.

Az ösztrogén és receptorai a nagyagykéregben

A központi idegrendszer több területéről tudott, hogy sejtjei ösztrogén receptorokat tartalmaznak. Az ösztrogén a szervezetben több formában is jelen van, leghatásosabb változata a 17- β -ösztradiol. Bár nőkben az ösztrogén fő termelődési helye a petefészek, a hormonnak az idegsejtekben történő receptorokhoz kötődése és *in vitro* neuritogén hatása nem mutat nemi specificitást. Kisebb mennyiségű ösztrogén hím állatokban is termelődik, ezen felül a szervezetben keringő tesztoszteront az idegsejtek a bennük jelenlévő aromatáz enzim segítségével ösztrogénné képesek alakítani, ami ezt követően a célsejteken belüli ösztrogén receptorokhoz kötődve fejti ki hatását. A klasszikus értelmezés szerint az aktivált, ösztrogént már kötő receptor célpontja a transzkripció szabályozása. E mechanizmus viszonylag lassú, latenciája 20-30 perc, valamint új RNS és fehérje molekulák szintézisét igényli.

Hosszú ideig csak egy ösztrogén receptor volt ismert, néhány éve azonban azonosítottak egy újabb izoformát. A klasszikus, 67 kilodaltonos receptor az alfa, az új, kb. 54 kilodalton molekulásúlyú változat pedig a béta nevet kapta. A két receptor meglehetősen nagy (95%) szekvencia homológiát mutat a DNS-kötő régióban, kisebb (58%) a hasonlóság a ligand-kötő régióban, a legnagyobb eltérés pedig a

transzkripció apparátussal legközvetlenebb kapcsolatban lévő transzaktivációs doménben van. A két receptor szerkezeti eltérései jól párhuzamba állíthatók azoknak, a különböző ösztrogén származékokra adott, a transzkripció szabályozására kifejtett eltérő hatásaival.

Az agykéregben az ösztrogén receptor mRNS expresszió szintjén a béta izoforma dominál a klasszikus, alfa változat felett, ahogy azt in situ hibridizációs vizsgálatok mutatják. Magáról a receptor fehérjéről kevesebbet tudunk megállapítani, főleg az alfa-receptor expresszió alacsony foka, és a béta izoformára specifikus, megbízható antitest hiánya miatt. Mindezek ellenére a nagyagykéreg neuronjainak ösztrogénkötő képességét az egyedfejlődés meghatározott, korai fázisában radioaktív liganddal végzett autoradiográfiás vizsgálatok egyértelműen igazolták.

Ösztrogén-aktivált fehérjekinázok

Az ösztrogén a transzkripció módosításán felül képes egyéb utakon is kifejteni hatását. A hormon számos ilyen alternatív effektusa fehérjekináz enzimek aktivációján keresztül valósul meg.

Az adenilát cikláz (AC)-proteinkináz A (PKA), illetve a kalcium/kalmodulin-függő proteinkináz (CaMK) rendszer szerepére utalnak azok a megfigyelések, miszerint ovariektomizált állatok bizonyos agyterületein ösztrogén szisztémás adását követően a ciklikus adozin monofoszfát (cAMP)-érzékeny válasz elemkötő fehérje (CREB) gyorsan, mintegy 15-30 percen belül foszforilálódik.

A proteinkináz C (PKC) izoformáinak részvételét támasztja alá a hasonló körülmények közti ösztrogén adását követően észlelt PKC aktivitás növekedés ösztrogén érzékeny agyterületek fehérjekivonatában.

A témával kapcsolatban felvetett kérdéseink

Ismerve az ösztrogén fenti, fehérjekinázokat aktiváló, illetve neurit növekedést serkentő képességét, és az ERK idegsejt differenciációjában betöltött szerepét, kézenfekvőnek tűnt, hogy megvizsgáljuk, létrejön-e ösztrogén hatására ERK aktiváció az ösztrogénérzékeny agyszövetből készített primer kultúrákban.

Pozitív eredmény esetén eldöntendő továbbá, hogy:

a.: milyen jelétviteli úton vezet az ösztrogén kezelés ERK aktivációhoz

b.: milyen ösztrogén, vagy egyéb receptor(-ok)-on keresztül hatva fejt ki a hormon ezt a hatását

c.: milyen az organotipikus tenyészetekben ösztrogén kezelésre ERK foszforilációval reagáló sejtek fenotípusa és ezekben a foszforilált ERK nukleo-citoplazmatikus eloszlása

Kísérleti anyagok és módszerek

Szövettenyésztés

A kísérleti állatok (egér vagy patkány) nagyagyából a születésüket követő napon, az agyburkok eltávolítása után, 360 μm vastagságú koronális szeleteket készítettünk. Az agy frontális pólusától számított első hat szeletet használtuk kísérleteinkhez. A szeletek bal és jobb felét szétválasztottuk, a nagyagykérgi részeket izoláltuk, majd a frontális pólustól számított 1-3-5, vagy 2-4-6 sorrendben azokat hármassával, kollagénnel bevont fedőlemezekre ültettük ki. Ezt követően a szövetet egy hétig forgó csökultúrában tartottuk, 5% CO_2 légkörben. A szteroid- és fenol vörös-mentes tenyésztő médiumot (25% herélt lószérum, 22.5% Hank's BSS, 50% BME, 7.5mg/ml glukóz, 2mM L-glutamin és 50 $\mu\text{g/ml}$ aszkorbinsav) 2 nM 17- β - öszt radiollal (Sigma) komplettáltuk a tenyészetek növekedésének optimalizálása végett. A 6. naptól a tenyésztést öszt trogén-mentes médiumban folytattuk, majd 24 óra elteltével a tenyészetek átestek a megfelelő kezeléseken (10nM 17- β - öszt radiol, neurotrofinok, mint NGF, BDNF, NT-3, vagy NT-4/5 egymagukban, vagy keverve, komponensenként 100 ng/ml, (Intergen), 100 μM PD98059, 5 órás előkezelés [New England Biolabs], 16- α -jodo-17- β - öszt radiol [R.B. Hochberg ajándéka, Yale University], genistein [Upstate Biotechnology], 30 $\mu\text{g/ml}$ cikloheximid, 1 órás előkezelés [Sigma], 1 $\mu\text{g/ml}$ geldanamycin, 24 órás előkezelés [Calbiochem]). Antibiotikumokat a tenyésztési periódusban sosem használtunk. Az összes használt egyéb vegyszer az elérhető legtisztább finomsági fokozatú volt (Fisher, vagy Sigma).

Immunprecipitáció és Western blot

A kultúrákat jéghideg PBS-sel történő öblítést követően lízis pufferben (50mM Tris-bázis, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1mM EGTA, 1mM Na-ortovanadát, 5mM ZnCl_2 , 100mM NaF, 10mg/ml aprotinin, 1mg/ml leupeptin, 1mM PMSF, 1% Triton X-100) homogenizáltuk, vékony (21 G) injekciós tűn történő hússzori áthúzással. Koimmunprecipitációs kísérletek során a detergenst elhagytuk a lízis pufferből. A homogenátumokat 100000 g-vel 4°C-on 15 percig ultracentrifugáltuk, majd meghatároztuk a felülúszó fehérjekoncentrációját (BioRad, detergens kompatibilis esszé kit). A minták kísérletenkénti egyenlő fehérjemennyiségeit azonos (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) koncentrációra állítottuk be, majd immunprecipitáltuk a megfelelő antitest (nyúl, normál IgG kontroll, B-Raf, MEK 2, ERK 1, ERK 2, Santa Cruz Biotechnology, MEK 1, Upstate Biotechnology, pan-Trk antitest dr. David Kaplan-tól, ER- α antitest az NIH-től (ER715), illetve dr. Margaret Shupnik-től) 1 μg -jával. A precipitátumokat protein A-szefaróz, vagy Dynal immuno-mágneses gyöngyök segítségével gyűjtöttük össze, majd háromszor mostuk lízis pufferben, végül ugyanebben még egyszer, de 0.05% Tween-20 detergens jelenlétében. A precipitátumokat ezt követően Laemmli-pufferben felforraltuk, alkotóikat poliakrilamid gélelektroforézissel szétválasztottuk, majd PVDF membránra elektroblottoltuk.

A használt ellenanyagok esetleges nem specifikus kötődését TBS-Tween-ben (10 mM Tris-bázis, pH 8.0, 150mM NaCl, 0.2% Tween-20) oldott 5% zsírmentes tejjel, vagy foszfo-tirozin detektálásakor 3% marha szérum albuminnal blokkoltuk, majd az így előkezelt membránt inkubáltuk a megfelelő elsődleges antitesttel (fent említettek, illetve foszfo-ERK, New England Biolabs, Hsp90, Santa Cruz Biotechnology, MEK 1 és MEK 2, Transduction Laboratories, foszfo-tirozin, 4G10-es klón, Upstate Biotechnology), melyet a blokkoló oldatban hígítottunk 1:1000, illetve a MEK 2 ellenanyagot 1:2500 arányban. A nem specifikusan kötődött antitesttől 5-ször 15 perc TBS-Tween-es mosással szabadultunk meg. A másodlagos, tormagyökér peroxidázzal kapcsolt antitestet (Pierce) blokkoló oldatban, 1:50000 hígításban tettük a membránra, majd TBS-Tween-es mosásokat követően autoradiográfiával detektáltuk a kemilumineszcens (ECL, Amersham) jelet.

A Western blotok hasonlóképp készültek, blonként azonos mennyiségű fehérje lizátumoknak a géltre történő közvetlen töltését követően.

Immun-kináz esszé

A B-Raf- és MEK-esszé kiteket a gyártó (Upstate Biotechnology) utasítása szerint használtuk, a vizsgálandó fehérje fentiek szerinti immunprecipitációját követően. A végső szubsztrátként szolgáló mielin bázikus fehérjébe épült foszfor radiokativitását folyadék szcintillációs számlálással mértük (Searle Model Delta 300).

Immunhisztifluoreszcens detektálás konfokális mikroszkóppal

A kezelt tenyészeteket 37 °C-os, pH 7.4-es PBS-sel öblítettük, majd fixáltuk ugyanilyen PBS-ben oldott, és még 2,5% DMSO-t tartalmazó 4%-os paraformaldehiddel. A felesleges fixálószer 3-szori PBS-es, majd 3-szori TBS-es mosással távolítottuk el. A szövet nem specifikus antitestkötő helyeinek blokkolása 5% zsírmentes tejjel és 10% normál számár szérum TBS-Triton-os (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 0.5% Triton X-100) oldatában történt, 2,5% DMSO jelenlétében. Az elsődleges antitesteket (foszfo-ERK, New England Biolabs, MAP2B, Transduction Laboratories, ERK 1, ERK 2 és Hsp90, Santa Cruz Biotechnology) a blokkoló oldatban 1:200 hígítva tartottuk a mintákon 48-72 óráig, 4°C-on, enyhe mozgatás mellett. A nem specifikus antitestektől 5-szöri TBS-Triton-os mosással szabadultunk meg, majd a blokkoló oldatban hígított másodlagos, antitesttel (kecske- α -nyúl 1:100, Jackson Immunochemicals) történő inkubáció következett. Ismételt TBS-Triton-os mosások után a fluoreszcens festékekkel konjugált antitest(ek)et (számár- α -kecske, vagy α -egér, 1:200, Jackson Immunochemicals) adtuk a mintákhoz, blokkoló oldatban. TBS-Triton-os mosásokat követően a magokat zöld fluoreszcens festékekkel (Sytox, Molecular Probes) jelöltük, majd egy Zeiss Axiovert lézer konfokális rendszerrel gyűjtöttük a minták optikai metszeteit 63x-os vizes immerziós objektívvel.

Eredmények és következtetések

Az ösztrogén képes aktiválni az ERK 1/2-t ösztrogén érzékeny agyszövetben

Az agykérgi területekből kiültetett szövetszeleteket 10nM 17- β -ösztradiollal kezelve az ERK 1 és 2 aktivitása 15 perc elteltével már jól láthatóan emelkedett a nyugalmi állapothoz képest, egy órával a kezelés után érte el maximális értékét és még 2 óra elteltével sem állt vissza teljesen az alap szintre. Aktivációja során az ERK 1/2 kettős, treonin és tirozin aminosavakon egyaránt létrejövő foszforiláción esik át, minek következtében magának az ERK1/2 enzimeknek a foszfát csoport beépítő kináz aktivitása is fokozódik. Az ERK 1/2 aktivitásának mérését célzó, gélben végzett kináz esszé a foszfo-specifikus ERK 1/2 antitesttel végzett Western blotok eredményeihez hasonlóan az ERK 1/2 gyors és elnyújtott időkinetikájú aktiválódását mutatták. Az ilyen kinetikájú ERK aktiváció a neuronális differenciáción áteső sejtekre jellemző.

Az ösztrogén általi ERK aktiváció MEK függő

A 17- β -ösztradiol fenti hatásának mechanizmusát elemezve először az ERK 1/2 enzimek közvetlen aktivátorát, a MEK-et vizsgáltuk közelebbről. A PD98059 nevű, a MEK működését gátló vegyülettel sikerült kivédnünk az ösztrogén által okozott ERK foszforilációt. A szer ugyancsak csökkentette a kontroll neurotrofinok által indukált ERK aktivációt és az ERK alapaktivitását is.

Az ösztrogén aktiválja a B-Raf enzimet

Logikus lépésnek látszott a MEK felett elhelyezkedő Raf enzimes család szerepének vizsgálata is az ösztrogén általi ERK aktiváció folyamatában. Az elvégzett immun-kináz esszé tanúsága szerint a B-Raf izoforma aktivitása jelentősen emelkedett az egyórás ösztrogén kezelés hatására. Ez a Raf izoforma a fontosabb az idegsejtek differenciálódásához, szemben a c-Raf-1-gyel, melynek általánosabbak a funkciói, s mely alak nem is aktiválódott az ösztrogén, csak a kontroll neurotrofin kezelés hatására.

Ösztrogén hatására nem foszforilálódik a Trk neurotrofin receptor

Ezeknek a típusosan neurotrofin-aktivált jelátviteli elemeknek az ösztrogén általi stimulációja láttán felvetődött a kérdés, vajon lehetséges-e, hogy az ösztrogén hatására endogén neurotrofinok szabadulnak fel a kultúrából, s ennek eredményeként aktiválódik az ERK kaszkád. Ha ez így történne, akkor a felszabaduló neurotrofinoknak először aktiválniuk kellene receptorukat a Trk fehérjét. E folyamat során a Trk tirozin oldalláncokon foszforilálódik. A kezeléseken átesett tenyészetekből ezért immunprecipitáltuk a Trk receptort, és a precipitátumot foszfo-tirozinra specifikus antitesttel teszteltük. Az alapszintet meghaladó tirozin foszforilációt csak a kontroll, neurotrofinnal kezelt tenyészetekben láttunk, az

ösztrogénnel kezelt mintákban nem. Ezzel kizárhattuk az endogén neurotrofinokat az ösztrogén általi ERK aktiváció hátterében.

A B-Raf komplexet alkot az ösztrogén receptor α -val és a Hsp 90-nel

A továbbiakban azt kutattuk, mely ponton kapcsolódhat be az ösztrogén által beindított jelátvitel az ERK kaskád láncolatába. Egymást aktiváló molekulák gyakran alkotnak preformált komplexeket a sejtben. Megfelelő módszerekkel fizikai kapcsolatuk kísérletesen is kimutatható. Ko-immunprecipitációs technikával azt vizsgáltuk, hogy az ERK kaskád mely elemei alkotnak esetleg komplexet az ösztrogén receptorral. Vizsgálataink idején az ösztrogén receptorok közül még csak a klasszikus, alfa változat elleni antitest volt kereskedelmileg elérhető. Ezzel az ellenanyaggal sikerült ko-immunprecipitálnunk az ösztrogén receptor α -t és a B-Raf-ot, valamint a Hsp90-et, mely utóbbiról már korábban kimutatták, hogy külön-külön a komplex mindkét másik tagjához kapcsolódva megtalálható a sejtben.

Ez a molekuláris "csomópont" tetszetős lehetőségként kínálta magát az ösztrogén jelátvitel és az ERK kaskád kapcsolódására. Az α -ösztrogén receptor és a B-Raf kapcsolódásának tényét megerősítette az a megfigyelés is, miszerint az α -ösztrogén receptorra specifikus antitesttel gyűjtött precipitátumok B-Raf aktivitása szignifikánsan magasabb volt, mint ugyanez az aktivitás nem immun savó használata esetén.

Ösztrogén általi ERK aktiváció ösztrogén receptor- α gén-fosztott mutáns egér szövetben

Az ösztrogén általi ERK aktivációért felelős szteroid receptor azonosítása céljából megismételtük az ERK aktivációs esszéket olyan egér agykéreg kultúrákon is, melyekben a klasszikus, alfa ösztrogén receptor génje nem működött. Nagy meglepetésünkre az ösztrogén ezekben a tenyészetekben is aktiválta az ERK-et, s az aktiváció mértéke még jelentősen meg is haladta a vad típusú kultúrákban tapasztaltat. Ez az eredmény megcáfolta azt, a ko-immunprecipitációs kísérletekből merített elméletünket, miszerint az alfa ösztrogén receptor B-Raf-fal alkotott komplexe közvetítené az ösztrogén-általi ERK aktivációt.

Az ösztrogén receptor- α hiányos szövetben lezajló ERK aktiváció is a B-Raf-MEK útvonalon halad

Egyéb vonatkozásaiban a vad típusú szövetben tapasztaltakhoz hasonlított az α -ösztrogén receptor génjüktől megfosztott mutáns egerekben mérhető ERK aktiváció is. Ebben a rendszerben szintén gátolni tudtuk a folyamatot a MEK kémiai inhibitorának alkalmazásával, és a B-Raf aktivációja is jól megfigyelhető volt ösztrogén hatására a hiányzó alfa receptor ellenére.

Az ERK aktiváció vizsgálata alfa, illetve béta ösztrogén receptor specifikus ligandokkal

Az alfa és béta ösztrogén receptorok szerepének további elemzése céljából olyan ösztrogén származékokkal is megvizsgáltuk az ERK aktiválhatóságát, melyek specifikusan csak az egyik ösztrogén receptor típushoz kötődnek.

A 16-alfa-jodo-17-béta ösztradiol kellően alacsony koncentrációban (10nM, vagy az alatt) adva csak az alfa ösztrogén receptorhoz kötődik. Ilyen feltételek mellett nem tapasztaltunk ERK aktivációt a vad típusú agyszövetből készített explantátumokban. Mi több, az alfa receptor szelektív stimulációját követően az ERK foszforiláció enyhe csökkenését kaptuk. Ez a megfigyelés, az alfa ösztrogén receptor-hiányos egerekben látott erőteljesebb, ösztrogén-indukált ERK foszforilációval együtt, érdekes módon azt sugallja, hogy a klasszikus ösztrogén receptor szerepe az ösztrogén általi ERK aktiváció során inkább gátló jellegű.

Hasonlóan kis koncentrációban (10nM, vagy az alatt) alkalmazva egy másik ligand, a genistein csak a béta ösztrogén receptor változathoz kötődik. Ilyen feltételek mellett genistein hatására azonban ERK foszforiláció változást vad típusú agyszövetből készített kultúránkban nem tapasztaltunk. A genistein nagyobb koncentrációját (100µM) ösztrogénnel együtt adva a genistein közismert, foszforilációt gátló hatása érvényesült. Ez a megfigyelés ellene mond annak a lehetőségnek, miszerint az ösztrogén általi ERK foszforiláció serkentését a béta ösztrogén receptor közvetítené.

A fenti eredmények tükrében nem mondhatunk bizonyosat az ösztrogén által kiváltott ERK foszforilációt közvetítő receptor azonosságát illetően. Eddig még azonosíthatatlan receptor, vagy alternatív mechanizmus, esetleg direkt membrán hatás tűnik a legvalószínűbb lehetőségnek.

Az ösztrogén-indukált foszfo-ERK sejten belüli megoszlása

Eddigi vizsgálataink során a kapott eredmények mindegyikét csak az organotípusos tenyészetek egészére vonatkoztatva írhattuk le. A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a foszforilált ERK milyen eloszlásban található a kultúrák egyes reagáló sejtjeiben az ösztrogén kezelést követően. A foszforilált ERK sejten belüli megoszlásának ugyanis meghatározó jelentősége lehet az ERK aktiváció végső következményeit illetően. A PC12 sejtvonalon az ERK aktív alakjának citoplazmatikus felhalmozódását a sejtosztódás fokozódása követi, míg ugyanebben a rendszerben a nukleárisan megjelenő foszfo-ERK szignált a neuronális differenciáció fontos kezdeti lépésének tekintik.

Az agykérgi eredetű szövet kultúrákban, ösztrogén kezelést követően, a foszfo-ERK jelet a reagáló sejtek citoplazmájában, nyúlványaiban és magjában egyaránt megtaláltuk. A kontroll neurotrofin kezelés hatására a foszfo-ERK ugyanilyen eloszlásban volt észlelhető ebben a sejtípusban.

Az ösztrogén adására ERK foszforilációval reagáló sejtek neuronális eredetét a mikrotubulus-asszociált protein 2B-vel történő festődésük igazolta. Az a tény, hogy ösztrogén hatására ugyanolyan sejten belüli eloszlásban jelentkezett a foszforilált ERK, mint egy ismert idegsejt differenciációt előmozdító neurotrofin hatására, az ösztrogén neurotrofikus potenciálját látszik alátámasztani az általunk vizsgált ösztrogénre érzékeny idegsejtípusokban.

Az egyedi sejt szintjén a foszfo-ERK jelek erőssége összemérhető volt az ösztrogén, illetve neurotrofin kezelést követően. A fő különbség a reagáló idegsejtek számában mutatkozott, mely sokkal nagyobb volt a neurotrofin kezelést követően. Ez a megfigyelés egybevág azzal a korábban már észlelt jelenséggel, miszerint a Western blotokon is mindíg erősebb foszfo-ERK jelet kaptunk a neurotrofinnal kezelt pozitív kontrollban, mint az ösztradiollal kezelt mintában.

Az aktív ERK sejten belüli megoszlásával kapcsolatban újabb érdekes lehetőség adódott abból a Western blotokon tett megfigyelésünkből, hogy az ösztrogén általi ERK foszforiláció folyamata függetlennek bizonyult fehérjék újonnan történő szintézisétől. Az aktív ERK sejtmagban történő felhalmozódásáról viszont leírták, hogy az nem jön létre fehérjeszintézisükben gátolt sejtekben. Ha a sejtet tenyészetek fehérjeszintetikus folyamatait cikloheximiddel gátoltuk, a sejtmagban történő foszfo-ERK felhalmozódás a mi rendszerünkben is elmaradt. Ez alátámasztja azt a más szerzők által felvetett mechanizmust, miszerint az ERK sejtmagon belüli felhalmozódásához rövid életidejű, fehérje természetű "rögzítő" faktorokra lenne szükség.

Az ERK komplexet képez a Hsp90-nel

Azon kísérleteink során, melyekkel egy ösztrogén általi ERK aktivációt közvetíteni képes makromolekuláris komplexet próbáltunk azonosítani, megfigyeltük, hogy az ERK 1 és 2 is ko-immunprecipitálódtak a Hsp90-nel. Az ERK 1, illetve 2-re specifikus antitesttel gyűjtött csapadékok lényegesen több Hsp90-et tartalmaztak, mint az azonos fajú, nem-immun savóval kicsapott kontroll. Ez a megfigyelés az ERK1/2 és a Hsp90 sejten belüli kapcsolódására utal.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy az ezzel a chaperone-nal való kapcsolatnak milyen szerepe lehet az ERK sejten belüli funkcióira nézve.

Az ERK-Hsp90 kapcsolat a geldanamycin antibiotikummal felbontható.

A tenyészetek 24 órás, 1 μ g/ml-es geldanamycin kezelését követően az ERK1/2-vel ko-precipitálódó Hsp90 mennyisége a kontroll szintjére esett vissza. A geldanamycin tehát alkalmasnak tűnt az ERK-Hsp90 asszociáció felbontására.

A geldanamycin gátolja az ERK foszforilációját.

Geldanamycin előkezelés hatására az ösztrogénnel kiváltható ERK foszforiláció megszűnt, s a kontroll neurotrofin hatása is jelentősen gyengült. Ez az eredmény a Hsp90-nek az ERK aktivációjában betöltött szerepére utal.

A geldanamycin nem befolyásolja az ERK és a Hsp 90 sejten belüli elhelyezkedését

Kezeletlen tenyészetekben az ERK1 és 2 dominánsan a citoplazmában volt található, s a Hsp90 is erre a sejt-kompartmentre szorított. Geldanamycin adására e fehérjéknek a sejten belüli elhelyezkedése nem változott. Geldanamycin adását követően az ERK foszforiláció alapszintje csökkent, ösztrogén hatására ERK foszforiláció fokozódást nem észleltünk, a neurotrofin kezelt kontrollban viszont továbbra is volt némi ERK foszforiláció növekedés, melyet detektálni tudtunk az egyes sejtek szintjén is. Bár a jel erőssége gyengébb volt a geldanamycinnel elő nem kezelt ugyanilyen mintához képest, az észlelt foszfo-ERK nukleocitoplazmatikus megoszlása nem tért el a geldanamycin kezelés nélküli esetektől. Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy az ERK-hez kapcsolódó Hsp90-nek nincs szerepe az ERK és a foszfo-ERK sejten belüli elhelyezkedésében.

A geldanamycin nem befolyásolja a MEK, ERK és a Hsp 90 fehérjék sejten belüli szintjét

Kísérleti eredményeink értelmezéséhez fontos információ volt, hogy geldanamycin hatására nem történt észrevehető változás a MEK1/2, ERK 1/2 és Hsp90 fehérjék sejten belüli mennyiségében.

Az ösztrogén hatását a MEK 2 közvetíti

A geldanamycin ERK foszforilációt gátló hatásának értékeléséhez meg kellett vizsgálnunk, hogy a geldanamycin kezelésnek van-e következménye a jelátviteli láncolatban az ERK felett elhelyezkedő MEK enzim aktivitására nézve. Ennek eldöntésére immun kináz esszé végeztünk. A MEK 1-re specifikus esszé során a neurotrofin kontroll hatására erős MEK 1 aktivációt láttunk, az ösztrogénnel kezelt mintában viszont nem volt szignifikáns eltérés az alapaktivitáshoz képest. Ez meglepő eredmény volt, különösen annak ismeretében, hogy korábban a MEK kémiai gátlószerét alkalmazva az ösztrogén általi ERK aktiváció MEK függőnek bizonyult. E korábbi kísérletek során viszont a MEK gátlószerének olyan dózist alkalmaztunk, mely mind a MEK 1-et, mind pedig a MEK 2-t gátolta. Minthogy az egyedfejlődés korai szakasza során a 2-es MEK izoforma expressziója dominálhat az 1-esé felett, egy másik esszében a MEK 2 esetleges szerepét vizsgáltuk meg. Ebben a kísérletben a MEK 2-t az ösztrogén aktiválta erőteljesen, s a neurotrofin kontroll volt hatástalan. Itt tehát a jelátviteli utak egy érdekes elágazódását látjuk, amennyiben a BDNF a MEK1-en, míg az ösztrogén a MEK 2-n keresztül vezet ERK aktivációhoz.

A geldanamycin kezelés gátolta mind az ösztrogén, mind a neurotrofin általi MEK aktivációt, s a MEK 1 alapaktivitást is. Érdekes módon a MEK 2 alapaktivitás viszont szignifikáns emelkedést mutatott a geldanamycinnel nem kezelt mintához képest. Ennek ellenére ugyanilyen körülmények között az ERK alap szintű foszforilációja némileg csökkent. Az a megfigyelés, miszerint geldanamycin kezelést követően a MEK 2 alapaktivitás emelkedett, az ERK foszforiláció alapszintje viszont ennek ellenére csökkent, aláhúzza az ERK-hez kapcsolódó Hsp90 esetleges

kulcsfontosságú szerepét a MEK aktivitásnak az ERK-re történő sikeres áttevődésében.

Az eredmények összefoglalása

10nM ösztrogén kezelés hatására a fejlődő patkány és egér nagyagykéreg organotipikus tenyészeiben már néhány (15) percen belül kimutatható, időben elnyújtott kinetikájú (legalább 2 órán át tartó) ERK foszforiláció fokozódást észleltünk, mind az egész tenyészetet, mind a tenyészetek egyes sejtjeinek szintjén.

E reakció elmaradása a PD98059 nevű MEK-gátlószer alkalmazását követően, illetve a MEK immunkináz esszék eredményei is azt jelzik, hogy a fenti folyamatot a MEK 2-es izoformája közvetíti az ERK 1/2 felé. A BDNF hatása ugyanezekhez a kinázokhoz viszont a MEK 1-en át jut el.

A kétféle ágens a Raf enzim vonatkozásában is eltérő preferenciát mutat, amennyiben az ösztrogén hatására csak a B-Raf, a c-Raf-1 izoforma viszont nem aktiválódott. A neurotrofin kontrollok ugyanakkor mindkét Raf működésfokozódását indukálták.

Az ösztrogén ERK aktiváló hatását közvetítő receptor azonosítása az ösztrogén receptor izoformáira specifikus ligandokkal, vagy az alfa receptor változatot nem tartalmazó genetikai mutáns szövet használatával sem sikerült. A Trk receptor ösztrogénhatásra elmaradó foszforilációja viszont kizárja, hogy az ösztrogén a szövetből neurotrofinokat felszabadítva váltaná ki az ERK kaszkád működésfokozódását.

A tenyészetek ösztrogén hatására ERK foszforilációval reagáló sejtei morfológiai megjelenésük, méretük és a MAP2B fehérjére mutatott immunpozitivitásuk alapján is neuronoknak tűnnek.

A foszfo-ERK az egyes ösztrogénre reagáló sejteken belül kimutatható volt a citoplazmában, a sejtnyúlványokban és a sejtmagban is, a fehérjeszintézis gátlását követően azonban már csak a citoplazmára korlátozódott.

Az ERK 1 és 2 enzimeket koprecipitációs módszerrel a Hsp90 hősokk fehérjével asszociált formában találtuk kísérleti rendszerünkben. E kapcsolatot a geldanamycin antibiotikummal felbontva arra a következtetésre jutottunk, hogy a Hsp90 nem befolyásolja az ERK1/2 stabilitását, vagy sejten belüli megoszlását, de szükséges az ERK1/2-nek a MEK-2-általi aktiválásához.

A munka jelentősége

Munkánk során elsőként mutattuk ki egy típusosan polipeptid növekedési faktorok (mint például a neurotrofinok) által használt jelátviteli láncolat elemeinek (B-Raf - MEK 2 - ERK 1/2) ösztrogén általi aktivációját fejlődő idegszövetből készült primer nagygyékérgi kultúrákban (lásd az összefoglaló ábrát).

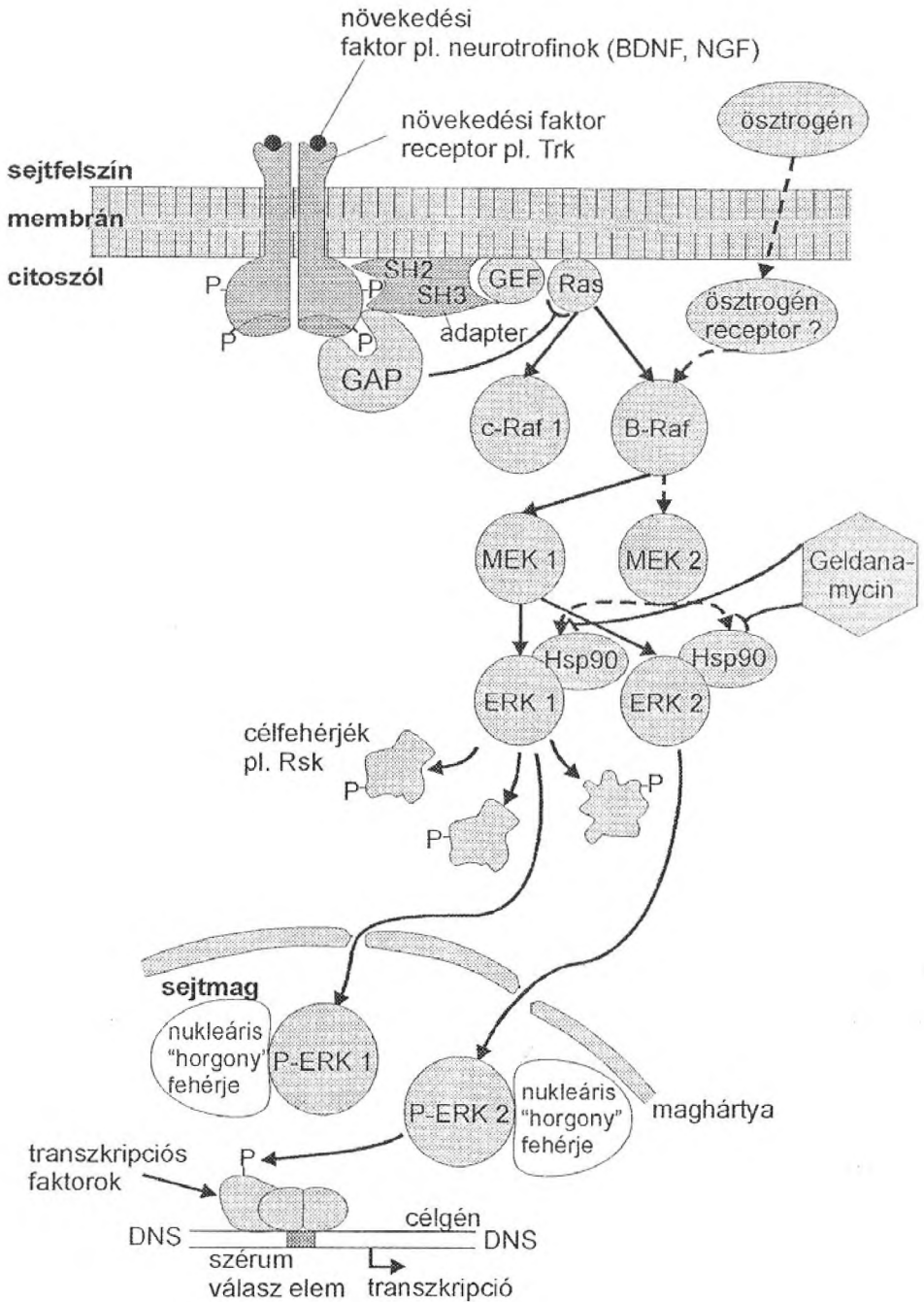
A hasonlóságok mellett a neurotrofin, illetve ösztrogén által kiváltott jelátviteli történések specifikus jellemzőiből is azonosítanunk sikerült néhányat (a neurotrofinok B-Raf és c-Raf-1, valamint MEK 1 aktivációja szemben az ösztrogén B-Raf-, illetve MEK 2 preferenciájával).

Az ERK1/2-Hsp90 kapcsolat megfigyelésével tovább bővültek ismereteink e chaperone fehérje makromolekuláris kapcsolatok szervezésében betöltött szerepét illetően.

Az ösztrogén-indukált foszfo-ERK nukleáris felhalmozódásának kimutatásával pedig rávilágítottunk, hogy e hormonnak nagyobb lehet a jelentősége az idegrendszer korai differenciációs és génexpressziós folyamataiban, mint eddig gondoltuk.

Az ösztrogén leírt hatásait közvetítő receptor mibenlétének kétsége ugyanakkor felveti további, eddig még azonosítatlan receptorok létezésének, illetve fontos, alternatív hatásmechanizmusok működésének lehetőségét.

Eredményeink segíthetnek az idegrendszer korai, komplex neuroendokrin hatások alatt zajló bonyolult fejlődésének jobb megértésében. Bár a felnőtt idegrendszer ösztrogén érzékenysége jóval mérsékeltebb a fejlődőhöz képest, sérülést követően (trauma, neuritszakadás, hormonális depriváció menopauzát, vagy gonadektómiát követően) gyakran tér vissza a fejlődés korai stádiumaiban tapasztalt hormonális érzékenység. Terápiás oldalról így a napjainkban egyre gyakoribb ösztrogén szubsztitúció összetett hatásrendszerének központi idegrendszeri vonatkozásai válhatnak érthetőbbé megfigyeléseink tükrében.



Összefoglaló ábra. A MAPK kaszkád és az ösztrogén jelátvitel párbeszéde kísérleti rendszerünkben.

Közlemények jegyzéke

A munkához felhasznált saját közlemények:

Singh, M, **Sétáló, G, Jr**, Guan, XP, Warren, M, and Toran-Allerand, CD. (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J. Neurosci* **19**: 1179-1188.

Toran-Allerand, CD, Singh, M, **Sétáló, G, Jr**. (1999) Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol* **20**: 97-121.

Singh, M, **Sétáló, G, Jr**, Guan, XP, Frail, DE, Toran-Allerand, CD. (2000) Estrogen-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor- α knock-out mice. *J. Neurosci* **20**: 1694-1700.

Sétáló, G, Jr, Singh, M, Guan, XP, Toran-Allerand, CD. (2002) Estradiol-induced phosphorylation of ERK1/2 in explants of the mouse cerebral cortex: the roles of heat shock protein 90 and MEK2. *J Neurobiol* **50**: 1-12.

Hazai konferenciákon szereplés:

Boglári G., **ifj. Sétáló Gy.**, Pap M., Nusser N., Szeberényi J.: Ras fehérjék szerepe az NGF-indukálta korai-gén expresszióban. Pószter bemutató, Magyar Genetikusok Harmadik Konferenciája, 1994 December, Debrecen.

Pap M., Boglári G., **ifj. Sétáló Gy.**, Nusser N., Szeberényi J.: A korai válasz-gén expresszió és a korai válasz-gén termékek foszforilációjának Ras-függő és -független szabályozása NGF-kezelt PC12 sejtekben. Pószter bemutató, Harmadik Sejt- és Fejlődésbiológiai Szimpózium, 1995 Január, Pécs.

Ifj. Sétáló Gy., Singh M., Guan XP. és Toran-Allerand CD. Újszerű ösztrogén jelátviteli mechanizmus egér agyszelet kultúrában. Előadás, VIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2000, január 17-19

Nemzetközi konferenciákon szereplés:

Sétáló, G, Jr, Boglári, G, Pap, M, Nusser, N, Szeberényi, J. Differential role of H-Ras in the expression of early-response genes induced by NGF in PC12 cells. Pószter bemutató, FEBS Advanced Course: Single Cell Techniques in Signal Transduction Research, 1995 április 29 - május 5, Leiden, Hollandia.

Sétáló, G, Jr, Singh, M, Warren, M, Toran-Allerand, CD. Direct association of heat shock protein Hsp90 and the extracellular signal-regulated kinases ERK1/2. A possible link between estrogen and neurotrophin signaling. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1997; **23**: 1710

Singh, M, Warren, M, **Sétáló, G, Jr**, Toran-Allerand, CD. The estrogen receptor exists in a multimeric complex consisting of at least B-Raf, Mek and Hsp90 in explants of the cerebral cortex. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1997; **23**: 1709

Sétáló, G, Jr, Singh, M, Warren, M, Toran-Allerand, CD. The role of heat shock protein 90 in estrogen-neurotrophin crosstalk within cerebral cortical explants of the mouse. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1998; **24**: 1295

Singh, M, **Sétáló, G, Jr**, Guan, XP, Warren, M, Toran-Allerand, CD. Estrogen-induced ERK phosphorylation in the cerebral cortex of estrogen receptor- α knockout (ERKO) mice. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1998; **24**: 1295

Guan, XP, Singh, M, **Sétáló, G, Jr**, Toran-Aerand, CD. The cortical estrogen receptor as part of a caveolar complex. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1999; **25**: 508

Singh, M, Guan, XP, **Sétáló, G, Jr**, Toran-Allerand, CD. Evidence of a novel estrogen repeter in the developing cerebral cortex. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1999; **25**: 508

Sétáló, G, Jr, Singh, M, Warren, M, Toran-Allerand, CD. Regional and intracellular distribution of phosphorylated ERKs following estradiol and neurotrophin treatment in the cerebral cortex. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1999; **25**: 508

Sétáló, G, Jr, Singh, M, Guan, XP, Toran-Allerand, CD. Novel and unique aspects of estrogen signaling in the developing brain. Pószter bemutató, International Congress on Schizophrenia Research, Neuroplasticity and Schizophrenia, 2000, szeptember 9-12, Zinal, Svájc.

Sétáló, G, Jr, Singh, M, Guan, XP, Toran-Allerand, CD. Estrogen-induced phosphorylation of ERK in explants of the developing mouse cerebral cortex: the roles of Hsp90 and MEK2. Előadás, Pannon Symposium, 2000, szeptember 28-29, Pécs, Magyarország.

Egyéb saját közlemények:

Szeberényi, J, Boglári, G, Komáromy, L, Nusser, N, Pap, M, Sebők, Á, **Sétáló, G, Jr**, Tigyi, A. (1996) Problem-oriented teaching of molecular cell biology at the University Medical School of Pécs, Hungary. *Medical Education* **30**: 232-234.

Szeberényi, J, Boglári, G, Komáromy, L, Nusser, N, Pap, M, Sebők, Á, **Sétáló, G, Jr**, Tigyi, A. (1996) The way we teach molecular cell biology at the University Medical School of Pécs, Hungary. *Medical Teacher* **18**: 213-218.

Használt rövidítések jegyzéke

AC, adenylyl cyclase = adenilát cikláz

BDNF, brain derived neurotrophic factor = agyi eredetű neurotrofikus faktor

BME, basal medium of Eagle = alap tápfolyadék Eagle receptje szerint keverve

B-Raf = a B izoformája a Raf nevű fehérjekináznak

CaMK, calcium/calmodulin-dependent protein kinase = kalcium/kalmodulin-függő fehérjekináz

cAMP, cyclic adenosine monophosphate = ciklikus adenosin monofoszfát

CHX, cikloheximid = egy fehérjeszintézis gátlószer

c-Raf-1 = a c-izoformája a Raf nevű fehérjekináznak, melyet Raf-1-nek is neveznek, vagy a két nevet összevonva c-Raf-1-nek

CREB, cAMP response element-binding protein = ciklikus adenosin monofoszfát-érzékeny válaszelem-kötő fehérje

EGF, epidermal growth factor = hám eredetű növekedési faktor

ERK, extracellular signal-regulated kinase = extracelluláris szignál-regulált kináz

FGF, fibroblast growth factor = fibroblaszt növekedési faktor

GA, geldanamicin = egy, a Hsp90-hez kötődő antibiotikum

GAP, GTP-ase activating protein = GTP-áz aktivátor fehérje

GEF, guanine-nucleotide exchange factor = guanin nukleotid kicserélő faktor

Hank's BSS, Hank's balanced salt solution = sóoldat Hank receptje szerint keverve

Hsp90, heat shock protein 90 = egy hő sokkfehérje, melynek molekulatömege 90 kilodalton

MAP2B, microtubule-associated protein 2B = mikrotubulus-asszociált protein 2B

MAPK, mitogen-activated protein kinase = mitogén-aktivált proteinkináz

MBP, myelin basic protein = mielin bázikus fehérje

MEK, mitogen-activated/extracellular signal-regulated kinase kinase = mitogén-aktivált/extracelluláris szignál-regulált kináz kináz

NGF, nerve growth factor = idegi növekedési faktor

NT, neurotrofin = idegi növekedési faktorok gyűjtőneve

NT-3, neurotrofin-3 = egy neurotrofin féleség

NT-4/5, neurotrofin-4/5 = egy neurotrofin féleség

PC12, phaeochromocytoma 12 = patkány mellékvesevelő eredetű sejtvonal 12-es számú klónja

PKA, protein kinase A = proteinkináz A

PKC, protein kinase C = proteinkináz C

Raf = egy fehérjekináz

Ras = egy GTP-kötő fehérje

Rsk, ribosomal S6 kinase = riboszómális S6 kináz

SH2 és 3, Src homology 2 és 3 = a Src nevű fehérjekináz 2-es és 3-as doménjeivel homológ szerkezetű fehérjerészletek