

**Nitrogén-oxid által indukált intracelluláris jelátviteli folyamatok
vizsgálata PC12 patkány phaeochromocytoma sejtek apoptózisában**

Doktori (PhD) értekezés

Varga Judit

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs
Témavezető és programvezető: Prof. Dr. Szeberényi József

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Biológiai Intézet

Pécs
2016

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
I. Bevezetés	6
1. Nitrogén-oxid	6
2. Celluláris stressz / stressz-jelátvitel / MAPK-kaszádok.....	8
2.1. Stressz-jelátvitel a JNK- és a p38MAPK-úton.....	9
2.2. Az ERK-út.....	10
3. Apoptózis	11
3.1. Az apoptózis extrinsic útja / Extrinsic apoptózis-jelátvitel	12
3.2. Az apoptózis intrinsic útja / Intrinsic apoptózis-jelátvitel.....	13
3.2.1. A Bcl-2 fehérjecsald	14
3.2.2. A p53 fehérje	16
4. A PC12 sejtvonala.....	24
II. Célkitűzések.....	25
III. Anyagok és módszerek.....	26
1. Sejtvonalak	26
2. A sejtek életképességének vizsgálata	26
3. DNS-fragmentáció vizsgálata	26
4. Western blot analízis	27
5. Citokróm c-felszabadulás vizsgálata	28
6. Apoptotikus magmorfológia vizsgálata	28
7. Immuncitokémia.....	29
8. TUNEL-analízis	29
IV. Eredmények	30
1. A p143p53PC12 sejtvonala érzékenyebb a nagy dózisú SNP-kezelésre mint a vad típusú PC12 sejtek.....	30
2. Domináns negatív p53 fehérjét expresszáló sejtekben az SNP-kezelés fokozottabb stressz kináz-aktivációt vált ki	32
3. A p143p53PC12 sejtvonala fokozott PKR-hasítással és eIF2 α -foszforilációval reagál a 400 μ M SNP-kezelésre.....	34
4. 400 μ M SNP erőteljes p53-foszforilációt és -indukciót vált ki p143p53PC12 sejtekben.....	36

5. Toxikus dózisú SNP-kezelés következtében csökken a Bcl-2 fehérje mennyisége.....	38
6. A p143p53PC12 sejtvonalon fokozottabb a 400 μ M SNP hatására bekövetkező citokróom c-felszabadulás és kaszpáz-aktiváció.....	39
7. 400 μ M SNP-kezelést követően nem figyelhető meg a p53 fehérje sejtmagba történő transzlokációja	41
8. Kis dózisú SNP-előkezeléssel csökkenthető a 400 μ M SNP-kezelés apoptotikus hatása PC12 sejtekben.....	42
9. A 100 μ M SNP-előkezelés mérsékli a széruméheztetés, ciszplatin-, tunikamicin- és anizomicin-kezelések által kiváltott internukleoszómális DNS-fragmentációt	44
10. 100 μ M SNP-előkezelés csökkenti egyes kezelések pro-apoptotikus hatását	45
11. A kis dózisú SNP-előkezelés mérsékelheti a különféle, apoptózist okozó kezelések által előidézett fehérje-foszforilációt és kaszpáz-aktivációt.....	47
12. 100 μ M SNP-előkezelés csökkenti a sejtenyészítő médiumban található TRAIL-molekulák mennyiségét.....	49
V. Megbeszélés	50
1. Nitrozatív stressz.....	50
2. Mutáns p53 fehérjék és lehetséges szerepük az apoptózisban	52
3. A NO serkenti az intrinsic apoptózis-jelátvitelt PC12 sejtekben	53
4. A p143p53PC12 sejtvonalon érzékenyebben reagál a NO toxikus hatására	54
5. 100 μ M SNP-előkezelés csökkenti egyes pro-apoptotikus hatások erősségét.....	55
6. Az SNP-előkezelés fokozza az anizomicin-indukálta sejtpusztulás mértékét	57
7. A TRAIL fehérje lehetséges szerepe PC12 sejtek apoptózisában.....	57
8. A munka gyakorlati jelentősége.....	58
VI. A munka során tett új megfigyelések	61
Köszönetnyilvánítás	62
Felhasznált irodalom	63
Közlemények	74

Rövidítések jegyzéke

AIF: apoptosis-inducing factor
ALS: amyotrophiás lateral sclerosis
Apaf-1: apoptotic peptidase-activating factor-1
ASK1: apoptosis signal-regulating kinase 1
Bad: Bcl-2-associated death promoter
Bak: Bcl-2 antagonist/killer
Bax: Bcl-2 associated X protein
Bcl-2: B cell lymphoma-2
Bcl-xL: B cell lymphoma-extra large
Bid: BH3 interacting-domain death agonist
Bim: B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death
CBP: CREB-binding protein
cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát
CHOP: C/EBP-homologous protein
CREB: cAMP response element binding protein
DR4/5: death receptor 4/5
eIF2 α : eukarióta iniciációs faktor 2 α -alegység
ERK: extracelluláris szignál-regulálta kináz
FADD: Fas associated death domain containing protein
GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
HRP: horse radish peroxidase/tormagyökér-peroxidáz
JNK: c-Jun N-terminális kináz
MAPK: mitogén-aktivált protein-kináz
MAPKK: mitogén-aktivált protein-kináz-kináz
MAPKKK: mitogén-aktivált protein-kináz-kináz-kináz
Mcl-1: myeloid cell leukemia 1
Mdm2: mouse double minute 2
NLS: nukleáris lokalizációs szignál
NO: nitrogén-(mon)oxid
NOS: nitrogén-oxid-szintáz
Omi/HtrA2: high temperature requirement protein

PDI: protein-diszulfid-izomeráz

PKG: protein kináz G

PKR: protein kináz R

Puma: p53 upregulated modulator of apoptosis

RNS: reaktív nitrogén származék

ROS: reaktív oxigén származék

Smac/DIABLO: second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI

SNP: nitroprusszid-nátrium

TAD: transzaktivációs domén

TBP: TATA-kötő fehérje

TNF: tumor nekrozis faktor

TRADD: TNF receptor associated death domain containing protein

TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

I. Bevezetés

1. Nitrogén-oxid

A gáz halmazállapotú nitrogén-oxid (nitrogén-monoxid; NO) neurotranszmitterként és jelátviteli molekulaként számos fiziológias és patológias folyamatot befolyásolhat a sejtben. Termeléséért *in vivo* a nitrogén-oxid-szintáz (NOS) családba tartozó enzimek felelősek, melyek az L-argininből oxigén felhasználásával NO-ot és L-citrullint hoznak létre (Martínez-Ruiz és mtsai, 2011). Az intracellulárisan képződött NO egyszerű diffúzióval képes átjutni a sejtthártyán, majd a sejtből kijutva autokrin és parakrin módon fejti ki hatását (Benhar, 2015; D'Atri és mtsai, 2009; Toledo és Augusto, 2012).

A NO intracellulárisan többféleképpen befolyásolhatja a sejtek életét/működését. Egyrészt képes fehérjék poszttranszlációs módosítására, az ilyen jellegű modifikációnak két típusa van: az S-nitroziláció és a nitráció. S-nitroziláció esetén a NO kovalensen kötődik az érintett fehérjében található cisztein aminosavhoz (annak tiol/szulfhidril-csoportjához) (Akhtar és mtsai, 2012), ezáltal megváltoztatva az érintett fehérje aktivitását; ez járhat a szóban forgó fehérje aktivitásának gátlásával (például kaszpáz-3; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein) és fokozásával (Ras fehérjék) is (Martínez-Ruiz és mtsai, 2013). Míg az S-nitroziláció reverzibilis változást jelent (Akhtar és mtsai, 2012), addig a nitráció, mely esetben a NO tirozinhoz kapcsolódik, irreverzibilis modifikáció (Martínez-Ruiz és mtsai, 2013). A nitrozilált cisztein aminosavakról a NO denitrozilációval (esetleg transznitrozilációval, melynek során a NO egy másik fehérje cisztein aminosavára kerül át) enzimatis úton távolítható el; végrehajtásáért többféle enzim is felelős lehet, például a tioredoxin és a protein-diszulfid-izomeráz (PDI) (Akhtar és mtsai, 2012; Martínez-Ruiz és mtsai, 2013; Nakamura és Lipton, 2013). A denitroziláció nem-enzimatis úton is végbemehet (Evangelista és mtsai, 2013). Másrészt a NO átmeneti fémeket tartalmazó fehérjékhez is kapcsolódhat, ilyenek például a hemoglobin, a mioglobin (Heinrich és mtsai, 2013), a mitokondriumban található citokróm c oxidáz (Martínez-Ruiz és mtsai, 2011) vagy a szolubilis guanilát-cikláz (Toledo és Augusto, 2012). Továbbá, a NO aktiválhatja a szolubilis guanilát-cikláz enzimet (kötődik a benne lévő hemben található vashoz; Toledo és Augusto, 2012), az ennek következtében képződő másodlagos messenger

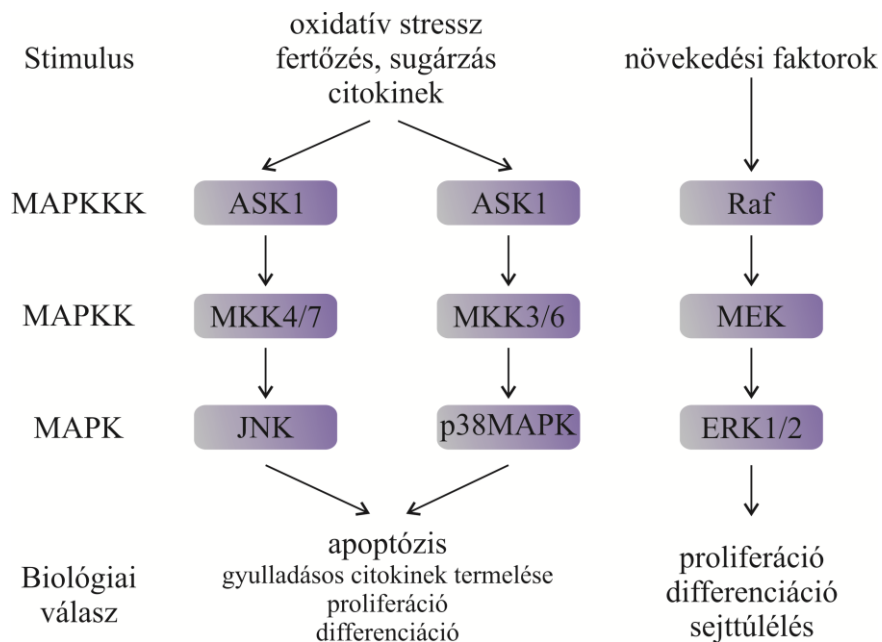
ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) pedig a protein kináz G (PKG) enzimeken keresztül érvényesíti hatását. A PKG-aktiváció következménye lehet többek között az erek falában található simaizmok relaxációja, trombocita-aggregáció vagy sejtproliferáció (Martínez-Ruiz és mtsai, 2011).

A NO hatását sejttípus- és koncentráció-függő módon fejti ki. Kis mennyiségben főként protektív hatású (például az NMDA-receptor S-nitrozilációja esetén idegsejtekben), de szerepe lehet a tanulás és a memória folyamatában is (Nakamura és Lipton, 2013; Nakamura és mtsai, 2015), míg nagy koncentrációban gátolja a mitokondriális respirációt (Martínez-Ruiz és mtsai, 2011) és pro-apoptotikus hatással bír. Utóbbi hatásait a NO gyakran közvetett módon fejti ki; míg önmagában kevésbé reakcióképes, más molekulákkal reagálva reaktív nitrogén-származékokat (reactive nitrogen species, RNS) képez. Ilyen például a peroxinitrit anion, amely a NO szuperoxiddal való reakciója során képződik (Hirst és Robson, 2010; Martínez-Ruiz és mtsai, 2011). A képződő peroxinitrit képes reagálni lipidekkel és a DNS-sel, emellett apoptózist indukálhat a mitokondrium membránjának átjárhatóvá tétele révén (Martínez-Ruiz és mtsai, 2011). Nitrozatív stressz esetén egyes fehérjék fokozott S-nitrozilációja szintén citotoxikus hatású; számos neurodegeneratív kórkép hátterében kimutatták a PDI és a XIAP fehérjék S-nitrozilációja következtében kialakuló idegsejtkárosodást (Nakamura és Lipton, 2013). A parkin nevű fehérje egy ubikvitin-ligáz, ami S-nitrozilált formában nem képes szuppresszálni a p53-at; Parkinson-kórban megnő az S-nitrozilált parkin és a p53 fehérjék mennyisége az agyban (Wang és mtsai, 2014).

Kísérleti körülmények között a gáz halmazállapotú NO alkalmazása nehezen kivitelezhető, ezért a sejtek kezelése során elterjedt különféle NO-donor vegyületek alkalmazása; az általunk használt szer a nitroprusszid-nátrium (SNP). Vad típusú PC12 patkány phaeochromocytoma sejtekben és domináns gátló fehérjéket expresszáló PC12 szubklónokban a nagy dózisban (400 μ M) alkalmazott SNP-kezelés sejthalált indukál (Bátor és mtsai, 2013; Varga és mtsai, 2014). Hasonlóan a NO-hoz, az SNP is képes kiváltani a guanilat-cikláz aktivációját és ennek következtében a cGMP szintjének emelkedését (Arnold és mtsai, 1977).

2. Celluláris stressz / stressz-jelátvitel / MAPK-kaszkádok

A sejteket számos környezeti hatás érheti; az ezekre adott válasz függ az adott behatás típusától és intenzitásától, az aktiválódott jelpályáktól és a sejt típusától is. A különféle környezeti ingerek/szignálok sejten belüli hatásainak közvetítésében fontos szerepe van a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) kaszkádoknak. Ezek a kaszkádok eukarióta sejtekben három szintre tagolhatóak; minden szintet egy fehérje-család tagjai képviselnek. Elsőként a mitogén-aktivált protein-kináz-kináz-kináz (MAPKKK) családba tartozó fehérjék aktiválódnak, majd ezt követően szerin és treonin aminosavak foszforilációja révén aktiválják a sorban következő mitogén-aktivált protein-kináz-kinázokat (MAPKK). Ez utóbbi fehérjék tirozin és treonin aminosavakon foszforilálják célfehérjéiket, a MAPK-család tagjait, melyek szintén szerin/treonin-specifikus kinázok. A MAPK-ok célfehérjéi között számos transzkripciós faktor van, melyek foszforilációja a sejt génexpressziós mintázatának megváltozásával jár, ez eredményezi az adott hatásra bekövetkező biológiai választ. Emlős sejtekben a MAPK-családnak három fontos alcsaládja ismert: a c-Jun N-terminális kinázok (JNK1-3), a p38MAPK-ok (p38 α - δ) és az extracelluláris szignál-regulálta kinázok (ERK1/2); a JNK és a p38MAPK fehérjék stressz kinázokként is ismertek (Darling és Cook, 2014; Kim és Choi, 2010; Munshi és Ramesh, 2013; Peti és Page, 2013; Shiizaki és mtsai, 2013).



1. ábra: A MAPK-kaszkádon keresztül történő jeltovábbítás összefoglalása (a részleteket lásd a szövegben).

2.1. Stressz jelátvitel a JNK- és a p38MAPK-úton

A JNK és a p38MAPK fehérjékhez kapcsolódó jelátvitelt számos hatás aktiválhatja, többek között az oxidatív és az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz, fertőzés (lipopoliszacharidok), halál ligandok/gyulladásos citokinek (például tumor nekrozis faktor, TNF), UV- és ionizáló sugárzás, kemoterápiás szerek, illetve a citoplazmában a Ca^{2+} szintjének emelkedése (Darling és Cook, 2014; Hayakawa és mtsai, 2012; Kim és Choi, 2010; Munshi és Ramesh, 2013; Shiizaki és mtsai, 2013). A felsorolt hatások a MAPKKK-ok családjába tartozó ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) fehérje aktivációját okozhatják; ennek következményeképpen a MKK4 és MKK7 fehérjék a JNK, míg a MKK3 és MKK6 enzimek a p38MAPK foszforilációval történő aktivációjáért felelősek (Darling és Cook, 2014; Hayakawa és mtsai, 2012; Manieri és Sabio, 2015; Munshi és Ramesh, 2013; Peti és Page, 2013; Shiizaki és mtsai, 2013). Az ASK1 fehérjén keresztül megvalósuló jeltovábbítás eredményezhet apoptózist, de emellett szerepe van a veleszületett immunitásban és a hypoxiához történő adaptálódásban is (Shiizaki és mtsai, 2013). Hasonlóképpen, a JNK- és a p38MAPK-aktiváció sem eredményez szükségszerűen sejtpusztulást; a sejt proliferációval, differenciációval és gyulladásos citokinek termelésével (Hayakawa és mtsai, 2012; Kim és Choi, 2010), sőt akár túléléssel (Azijli és mtsai, 2013) is reagálhat a stressz hatásra; apoptózishoz általában a tartós JNK- és p38MAPK-aktiváció vezet (Azijli és mtsai, 2013; Kim és Choi, 2010) (*1. ábra*). Az ASK1-MAPK jelátvitel zavarai betegségek kialakulását eredményezhetik, vezethetnek többek között kardiovaszkuláris, neurodegeneratív és gyulladásos kórképek, tumorok és egyéb betegségek (asthma, diabetes) kialakulásához is (Hayakawa és mtsai, 2012; Kim és Choi, 2010). Az ASK1 mellett más MAPKKK-ok révén is megvalósulhat a stressz kinázok aktivációja (MLK, mixed-lineage kinase; TAK1, transforming growth factor- β -activated kinase 1) (Kim és Choi, 2010).

Mindkét stressz kináz több izoformával rendelkezik; a JNK esetén három (JNK1, JNK2 és JNK3), a p38MAPK esetén négy izoformát (p38 α , p38 β , p38 γ és p38 δ) ismerünk (Hayakawa és mtsai, 2012; Kim és Choi, 2010; Manieri és Sabio, 2015; Sui és mtsai, 2014). Az alternatív splicing eredményeképpen létrejövő JNK-izoformák közül a JNK1 és 2 minden szövetben expresszálódnak, míg a JNK3 főleg az agyban, a herékben és a szívben mutatható ki (Darling és Cook, 2014; Manieri és Sabio, 2015). Mindhárom izoforma többféle splice variánssal rendelkezik, melyek 46 és 54 kDa méretűek

(Manieri és Sabio, 2015). A p38MAPK α és β izoformái ubikviter expressziójú fehérjék, ezzel szemben a γ és δ izoformák szöveti elfordulása korlátozottabb (Darling és Cook, 2014).

Az aktív JNK a Bim (B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death) foszforilációja révén apoptózist indukálhat, a Bcl-2 (B cell lymphoma-2) és a Bcl-xL (B cell lymphoma-extra large) fehérjék foszforilációja révén pedig előidézheti a sejtciklus leállítását, de apoptózist vagy autofágiát is okozhat (Darling és Cook, 2014). A p38MAPK számos célfehérjét foszforilálhat, ezek közé tartoznak a CHOP (C/EBP-homologous protein) és az ATF6 (activating transcription factor 6) nevű transzkripciós faktorok. A CHOP képes fokozni számos olyan gén expresszióját, melyek pro-apoptotikus fehérjéket (például DR5, death receptor 5; Bim; Puma, p53 upregulated modulator of apoptosis) kódolnak, egyidejűleg csökkentheti a Bcl-2 expresszióját, valamint indirekt módon fokozza a Ca^{2+} felszabadulását az ER lumenéből, apoptózist okozva (Darling és Cook, 2014). Apoptózist eredményezhet a p53 fehérje p38MAPK és JNK általi foszforilációja is (lásd később, Darling és Cook, 2014; Munshi és Ramesh, 2013). Szintén sejtpusztuláshoz vezethet az indukálható NOS p38MAPK által közvetített up-regulációja (Kim és Choi, 2010).

2.2. Az ERK-út

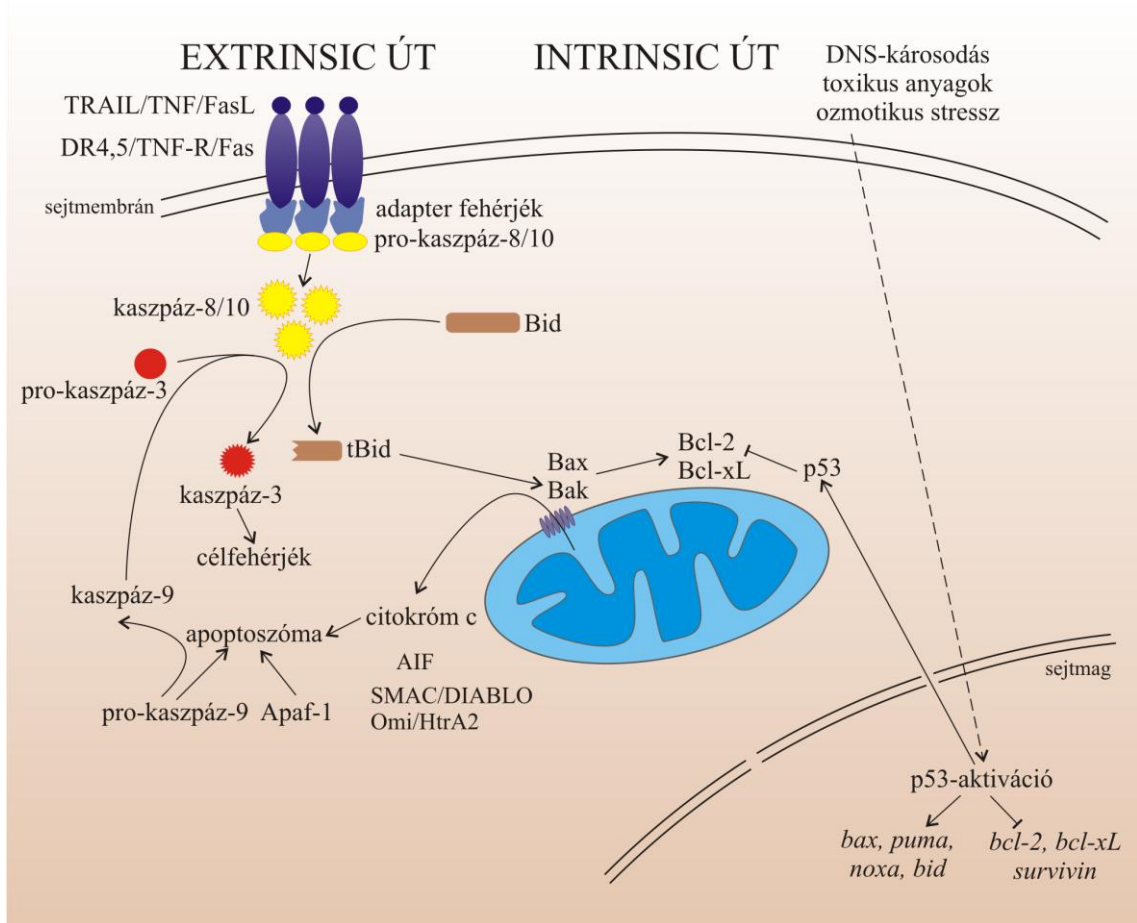
Az ERK-út aktivációja a monomer G-protein Ras fehérjék közreműködésével történik, a jeltovábbítás a korábban már ismertetett mechanizmussal valósul meg: az aktív Ras a Raf (MAPKKK) – MEK1/2 (MAPKK) – ERK1/2 (MAPK) útvonalon fejti ki hatását (*1. ábra*). Az ERK-jelátvitel beindításáért jellemzően mitogén hatások (például növekedési faktorok) felelősek (Manieri és Sabio, 2015), azonban stressz hatások is kiválthatják azt. Előbbi esetben az ERK-aktiváció általában sejtosztódást, terminális differenciációt, illetve sejttúlélést eredményez. A Ras/ERK-út fokozott működése a tumor képződés több lépésében is szerepet játszhat (migráció, invázió, túlélés) (Kim és Choi, 2010; Munshi és Ramesh, 2013). Stressz következtében azonban az aktív ERK - valószínűleg a CREB (cAMP response element binding protein) transzkripciós faktor aktivációja révén - fokozhatja anti-apoptotikus fehérjék (Bcl-2; Bcl-xL; Mcl-1, myeloid cell leukemia 1) és csökkentheti pro-apoptotikus fehérjék (Bim; Puma; Bmf, Bcl-2 modifying factor) génjének átírását, emellett foszforilálhatja az Mcl-

1 (stabilizációt eredményezve) és a Bad (Bcl-2-associated death promoter) fehérjéket (degradációt okozva) (Darling és Cook, 2014; Kim és Choi, 2010).

3. Apoptózis

Az apoptózis a programozott sejthalál legismertebb, legtöbbet vizsgált, evolúciós szempontból igen konzervált típusa. Szerepet játszik a morfogenezisben, a szöveti homeosztázis fenntartásában, az öregedésben, illetve a károsodott és nem kívánatos sejtek eliminálásában. Nem megfelelő működése különféle betegségek (tumor, autoimmun és neurodegeneratív kórképek, stb.) kialakulásához vezethet (Ola és mtsai, 2011). Apoptózist kiváltó hatások következtében a sejtmembrán nem sérül, a sejt a környező sejtek/szövetek károsodása, gyulladással elpusztul. Az apoptózissal elpusztuló sejtek számos morfológiai és funkcionális változáson mennek át, ez lehetővé teszi molekuláris biológiai módszerekkel történő azonosításukat. Az apoptotikus sejtekre jellemző legismertebb jegyek a DNS internukleoszómális fragmentációja, a sejtről apoptotikus testek lefűződése, a foszfatidil-szerin molekulák kikerülése a sejthártya külső rétegébe (externalizáció), illetve bizonyos, a sejtpusztulás végbemeneteléhez szükséges jelátviteli utak/fehérjék aktivációja (Goldar és mtsai, 2015).

A programozott sejthalál jelátvitelének két leginkább ismert útja az extrinsic (receptor által közvetített) és az intrinsic (mitokondriális) út. Az említettekén kívül azonban a programozott sejthalál más módon is végbemehet, erre szolgáltat példát a granzim molekulák által kiváltott sejtpusztulás. A granzim családba tartozó enzimek NK és T-sejtek által termelt szerin-proteázok, melyek különféle patogének és tumor sejtek elpusztításában működnek közre, típustól függően kaspáz-függő (granzim B) és kaspáz-független (granzim A) módon is okozhatnak apoptózist (Chowdhury és Lieberman, 2008; Siddiqui és mtsai, 2015). Az ER stressz szintén eredményezhet apoptózist révén megvalósuló sejtpusztulást, melyben a Bcl-2 családba tartozó fehérjéknek fontos szerepe van (Szegezdi és mtsai, 2006).



2. ábra: Az apoptózis extrinsic és intrinsic jelátvitelének összefoglalása (részletek a szövegben).

3.1. Az apoptózis extrinsic útja / Extrinsic apoptózis-jelátvitel

Az extrinsic utat olyan hatások (ligandok) aktiválják, melyek sejtfelszíni receptorokhoz kötődve váltják ki a sejtpusztulást (2. ábra). Ezen ligandok jól ismert képviselői közé tartoznak a TNF és egyéb, a TNF-családba tartozó ligandok (TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; FasL, Fas-ligand, stb.), melyeket gyakran halál-ligandokként említ a szakirodalom. Ezek a molekulák specifikus sejtfelszíni receptorokhoz kötődnek (TRAIL esetén: DR4 és DR5, FasL esetén Fas), aminek következtében a receptor trimerizálódik, majd intracelluláris doménjén (DD, death domain) egy multiprotein-komplex (DISC, death-inducing signaling complex) épül fel, mely továbbítja a jelet a jelpálya disztális komponenseinek. A DISC-ben található adapter fehérjék (FADD, Fas associated death domain containing protein; TRADD, TNF receptor associated death domain containing protein, stb.) szintén rendelkeznek halál doménnel/doménekkal; a FADD esetében az egyik domén

(DD) a receptorhoz kapcsolódik, míg a másik (DED, death effector domain) inaktív iniciátor pro-kaspázokat (mint a pro-kaspáz-8 és -10) köt meg, ezáltal lehetővé téve számukra saját, proteolitikus hasítás révén megvalósuló aktivációjukat. Az aktív iniciátor kaspázok ezt követően két eltérő úton valósíthatják meg az effektor pro-kaspázok (pro-kaspáz-3, -6, -7) hasítással történő aktivációját. A sejtek egy részében (ún. I. típusú sejtek) a kaspáz-8 és -10 közvetlenül képesek hasítani a kaspáz-3 és -9 molekulákat. Ezzel szemben más sejtekben (ún. II. típusú sejtek) összekapcsolódik egymással az extrinsic és az intrinsic apoptózis jelátvitel. Ezekben a sejtekben a sejtfelszíni receptorokról kiinduló apoptózis-jelátvitel által aktivált kaspáz-8 molekulák hasítják a „BH3-only” fehérjék (ld. később) közé tartozó Bid (BH3 interacting-domain death agonist) fehérjét. A képződő hasított forma (tBid, truncated Bid) a mitokondriumba transzlokálódva a Bax (Bcl-2 associated X protein) és a Bak (Bcl-2 antagonist/killer) fehérjék aktivációját váltja ki, ezáltal előidézi a mitokondriumok membránjának permeabilizálását, valamint a citokróm c és más fehérjék citoszólba történő kiáramlását (lásd intrinsic apoptózis-jelátvitel) (Azahri és Kaurma, 2013; Azilji és mtsai, 2013; Crowder és El-Deiry, 2012; Flusberg és Sorger, 2015; Goldar és mtsai, 2015; Sessler és mtsai, 2013; Wu és mtsai, 2014). A Fas-ligand receptorhoz kötődése az előbb ismertetett jelátvitelen kívül stressz kinázok (JNK, p38MAPK; lásd előbb) aktivációját is okozhatja (Shiizaki és mtsai, 2013).

A halál-receptorokról kiinduló jelátvitel nemcsak apoptózist okozhat, hanem az egyedfejlődésben és a gyulladásos folyamatokban is szerepet játszhat, illetve sejt túlélést közvetítő jelpályákat is serkenthet (Azahri és Kaurma, 2013; Sessler és mtsai, 2013; Solá és mtsai, 2013).

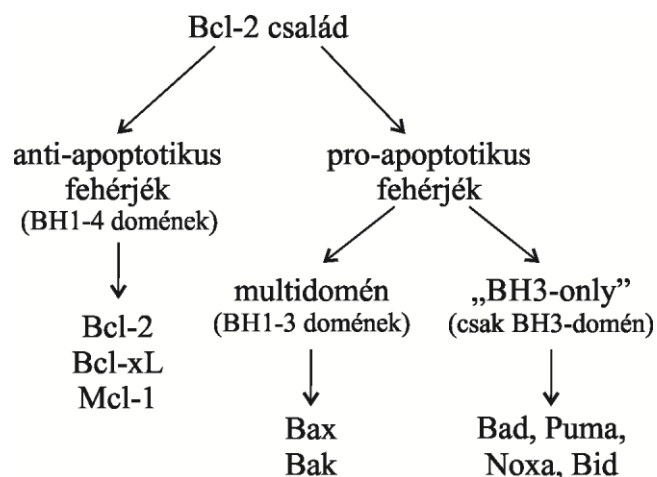
3.2. Az apoptózis intrinsic útja / Intrinsic apoptózis-jelátvitel

Az apoptózis intrinsic/mitokondriális útjának aktivációjához nem szükségesek sejt felszíni receptorokon keresztül ható ligandok; a sejthalál ez esetben olyan stimulusok eredményezik, melyek hatása a sejten belül érvényesül (kivételesen a tBid által közvetített mechanizmus, ld. előbb). Ilyenek például, a teljesség igénye nélkül, a DNS-ben bekövetkező és a repair mechanizmusok által ki nem javítható károsodások, különféle toxikus ágensek vagy az ozmotikus stressz (2. ábra). A programozott sejthalál ezen útjának fontos szereplői a Bcl-2 családba tartozó fehérjék és a p53 transzkripciófaktor.

3.2.1. A Bcl-2 fehérjecsalád

A Bcl-2 fehérjecsalád magában foglal apoptózist gátló (anti-apoptotikus) és azt serkentő (pro-apoptotikus) fehérjéket is (Lopez és Tait, 2015; Roy és mtsai, 2014) (3. ábra). A pro- és anti-apoptotikus fehérjék aránya dönt a sejt életben maradásáról, illetve elpusztulásáról; az egyensúly felborulása számos betegség (daganatok, autoimmun betegségek, stb.) kialakulását vonhatja maga után (Roy és mtsai, 2014).

Az anti-apoptotikus alocsalád tagjai 4 Bcl-2 homológia (BH) doménnel rendelkeznek, legismertebb képviselőik a Bcl-2 és a Bcl-xL fehérjék. Daganatokban gyakran kimutatható a Bcl-2 családba tartozó anti-apoptotikus fehérjék génjének overexpressziója (Lopez és Tait, 2015). A Bcl-2 és a Bcl-xL fehérjék az apoptózis mellett az autofágiát is képesek megakadályozni, emellett a Bcl-2 család tagjainak a mitokondriumok osztódásában és fúziójában, valamint az intracelluláris Ca^{2+} -szint szabályozásában is szerepet tulajdonítanak (Adams és Cory, 2007). A pro-apoptotikus fehérjéket magában foglaló alocsalád az egyes tagok szerkezete (és funkciója) alapján tovább tagolható: ide tartoznak a pro-apoptotikus multidomén Bax és Bak fehérjék (BH1-3-doméneket tartalmaznak) és a csak a BH3-doménnel rendelkező, ún. „BH3-only” fehérjék (Bad, Puma, Noxa, Bid, stb.) (Yip és Reed, 2008). A „BH3-only” fehérjéket működésük szerint további két csoportra osztják: „activators” (közvetlenül aktiválják a Bax/Bak fehérjéket) és „sensitisers” (gátolják az anti-apoptotikus fehérjék hatását; Lopez és Tait, 2015). Egyes „BH3-only” fehérjéknek (Puma, Noxa, Bim) szerepük van az ER stressz által előidézett apoptózisban is (Szegezdi és mtsai, 2006). A BH-doméneken kívül a Bcl-2 család legtöbb tagja egy C-terminális transzmembrán doménnel is rendelkezik, melynek segítségével membránok felszínéhez (például a mitokondrium külső membránja, az ER membránja, a maghártya) képesek rögzülni; ez alól néhány „BH3-only” fehérje képez kivételt (Correia és mtsai, 2015; Ola és mtsai, 2011; Siddiqui és mtsai, 2015; Yip and Reed, 2008). A BH3-domén a családba tartozó összes fehérjében megtalálható (Kvansakul és Hinds, 2015), szerepe van az egyes fehérjék dimerizációjában, illetve fehérje-fehérje interakciókban (Adams és Cory, 2007; Lopez és Tait, 2015; Yip és Reed, 2008), valamint felelős a „BH3-only” fehérjék pro-apoptotikus funkciójáért (Roy és mtsai, 2014).



3. ábra: A Bcl-2 fehérjecsalád.

A pro-apoptotikus multidomén fehérjék úgy segítik elő a sejtpusztulást, hogy oligomerizálódva pórusokat képeznek a mitokondrium külső membránjában, ezzel átjárhatóvá téve azt (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization). Ily módon lehetővé teszik a citokróm c és más fehérjék (Smac/DIABLO, second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI; AIF, apoptosis-inducing factor; endonukleáz G; Omi/HtrA2, high temperature requirement protein) kiáramlását a mitokondrium intermembrán teréből a citoszólba (Goldar és mtsai, 2015; Lopez és Tait, 2015; Yip és Reed, 2008). Az endonukleáz G és az AIF fehérjék ezt követően a sejtmagba kerülnek, ahol a kromatin-kondenzáció és a DNS-fragmentáció kiváltásában van szerepük (Goldar és mtsai, 2015). A Smac/DIABLO és az Omi/HtrA2 proteinek a kaszpázokhoz kapcsolódó és ezáltal azokat gátló IAP-családba (inhibitor of apoptosis protein) tartozó fehérjéket gátolják, így hozzájárulnak a kaszpáz-aktivációhoz (Flusberg és Sorger, 2015; Goldar és mtsai, 2015; Lopez és Tait, 2015).

Az irodalmi adatok többé-kevésbé ellentmondásosak annak tekintetében, hogy milyen módon következik be a Bax és a Bak fehérjék aktivációja (Lopez és Tait, 2015). A sejtben stressz hatások következtében megemelkedik a „BH3-only” fehérjék szintje, ami Bax/Bak-aktivációt (oligomerizációt) eredményez; részben közvetlenül, részben az anti-apoptotikus fehérjékhez kötődő Bax és Bak molekulák felszabadítása által. Ezt követi, a mitokondriális külső membrán permeabilizálása által, citokróm c (és más fehérjék) kijutása a citoszólba. A citokróm c molekulák citoplazmába történő kijutása nélkülözhetetlen az apoptozómák kialakulásához; ezek a komplexek a citokróm c

mellett az Apaf-1 (apoptotic peptidase-activating factor-1) és az inaktív pro-kaspáz-9 fehérjéket tartalmazzák. Az apoptozóma kialakulása biztosít lehetőséget a pro-kaspáz-9 molekulák hasítással történő aktivációjához, majd ezt követően az aktív kaspáz-9 fehérjék végzik el az effektor pro-kaspázok aktiválását. Az apoptózis folyamatának végét jelző proteolitikus hasításokért az ily módon aktivált kaspáz-3, -6 és -7 enzimek felelősek (Lopez és Tait, 2015; Roy és mtsai, 2014).

A Bcl-2 család anti-apoptotikus tagjai azáltal gátolják a citokróm c felszabadulását, hogy megkötik a Bax/Bak fehérjéket (ezáltal gátolva az oligomerizációjukat), illetve az azokat aktiválni képes „BH3-only” proteineket (például Bim, Puma, tBid) (Correia és mtsai, 2015; Lopez és Tait, 2015; Yip és Reed, 2008). A fehérjecsalád anti-apoptotikus tagjai jelentős specificitást mutatnak annak tekintetében, hogy a pro-apoptotikus fehérjék közül melyekhez kötődnek (Adams és Cory, 2007; Correia és mtsai, 2015). Mindegyik anti-apoptotikus funkcióval rendelkező fehérje képes kötődni a Bax-hoz, míg a Bak megkötésére csak bizonyos fehérjék (például Bcl-xL, Mcl-1) képesek (Correia és mtsai, 2015). A specifikus kötődés a „BH3-only” alcsaládba tartozó fehérjékre is jellemző: a Bim, a Puma és a tBid mindegyik anti-apoptotikus fehérjéhez kötődik, a többi „BH3-only” fehérje azonban nem (Adams és Cory, 2007; Siddiqui és mtsai, 2015).

A család egyes tagjainak funkciója nemcsak különféle fehérjék kötődése, hanem a transzkripció szintjén is szabályozható. Apoptózist előidéző hatások következtében olyan transzkripciós faktorok (CHOP, p53) aktiválódnak, melyek represszálják a *bcl-2* gént (Comel és mtsai, 2014; Szegezdi és mtsai, 2006). Ezzel párhuzamosan a két említett transzkripciós faktor képes fokozni pro-apoptotikus fehérjék (például Bax, Puma, Bim) génjének transzkripcióját (Comel és mtsai, 2014; Yip és Reed, 2008). Emellett a Bcl-2 család tagjainak aktivitása foszforilációval is befolyásolható; a JNK általi foszforiláció a Bcl-2-t gátolja, míg a Bim pro-apoptotikus hatását fokozza, ezáltal elősegítve az apoptózist (Szegezdi és mtsai, 2006).

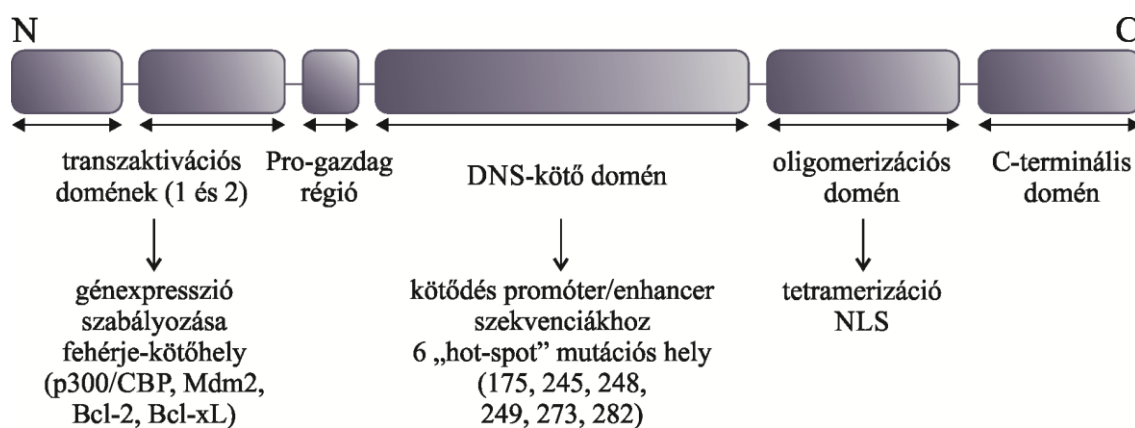
3.2.2. A p53 fehérje

Bár a felfedezését követően onkoproteinnak tartották (Eliyahu és mtsai, 1984; Jenkins és mtsai, 1984; Parada és mtsai, 1984; Weisz és mtsai, 2007), a p53 az egyik legismertebb tumor szuppresszor fehérje. A „genom őre”-ként is emlegetett fehérje először transzkripciós faktorként vált ismertté, azonban az utóbbi időben világossá vált,

hogy számos esetben a transzkripció közvetlen szabályozásától függetlenül fejt ki hatását.

A p53 fehérjét kódoló gén mutációja számos daganatban kimutatható; az esetek többségére a DNS-kötő doménben előforduló missense mutáció jellemző, mely aminosav-cserét eredményez (Chi, 2014; Hao és Cho, 2014; Leroy és mtsai, 2014; Saha és mtsai, 2015; Weisz és mtsai, 2007). A tumor szuppresszor gének többsége frameshift vagy nonsense mutációval inaktiválódik. Napjainkig 45000-nél több szomatikus és csírasejt-mutációt írtak le a p53 génben (Leroy és mtsai, 2014). A mutációk lehetséges következményei között említhető a fehérje teljes inaktivációja, de előfordulhat az is, hogy a mutáns p53 fehérjék onkogén hatással bírnak, illetve domináns negatív módon gátolják a sejtben a vad típusú p53 fehérjét (deOliveira és mtsai, 2015; Leroy és mtsai, 2014; Weisz és mtsai, 2007). A p53 fehérje azonban nem csak DNS-mutáció révén inaktiválódhat; virális/celluláris fehérjékhez való kötődés, epigenetikai mechanizmusok (promóter-hipermetiláció) és a fokozott degradáció is vezethetnek a p53-funkció elvesztéséhez (Surget és mtsai, 2013). A p53 gén csírasejtekben bekövetkező mutációja/inaktivációja felelős a ritka Li-Fraumeni-szindróma kialakulásáért (autoszómális domináns módon öröklődő betegség; az érintett betegekben több, eltérő típusú tumor alakulhat ki; Frebourg és mtsai, 1992; deOliveira és mtsai, 2015).

A p53 fehérjét érintő mutációk nemcsak inaktivációhoz vezethetnek, hanem funkciónyerő hatásuk is lehet (Weisz és mtsai, 2007). A mutáns p53 fehérje (1) kapcsolódhat a p63 és p73 fehérjékhez (a p53-család tagjai), ezáltal gátolva azok transzkripciós aktivitását, (2) kötődhet más transzkripciós faktorokhoz, így befolyásolva az általuk szabályozott gének expresszióját, (3) szerkezet-specifikusan kötődhet a DNS-hez, szabályozva a transzkripciót, illetve (4) kapcsolódhat más, nem transzkripciós faktorként működő fehérjékhez (Hao és Cho, 2014). A mutáns p53 fehérje által szabályozott gének olyan fehérjéket kódolnak, melyek elősegítik a tumor sejtek túlélését és osztódását, a kemorezisztencia kialakulását, genomikus instabilitást okoznak, gyulladást váltanak ki, közreműködnek a migráció, az invázió, az angiogenezis és a metasztázis-képződés folyamataiban (Hao és Cho, 2014; Weisz és mtsai, 2007).



4. ábra: A p53 fehérje szerkezete.

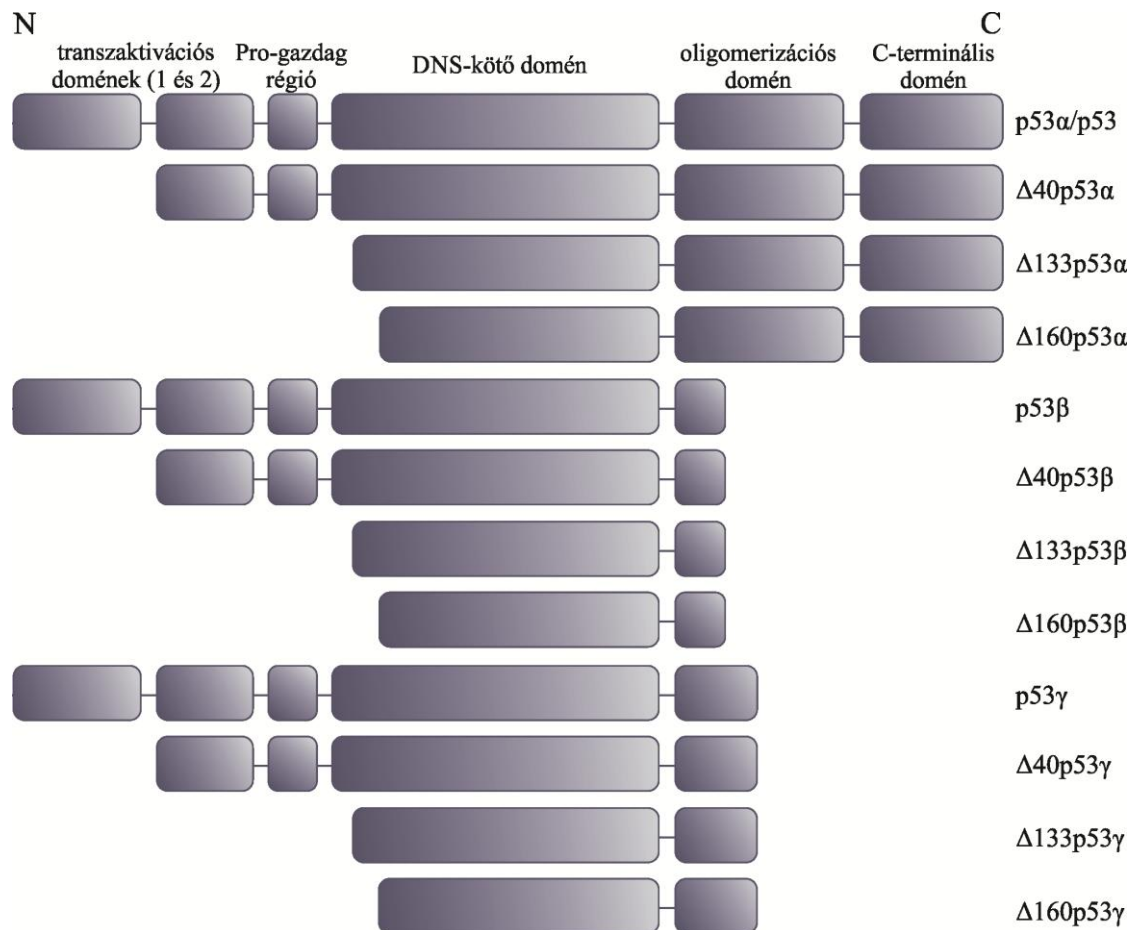
A 393 (patkányban 391) aminosavból felépülő fehérje N-terminálisán találhatóak a transzaktivációs domének (TAD1 és 2) és egy prolin-gazdag régió (PP), ezt követi a DNS-kötő domén (DBD), míg a C-terminális tartalmazza a tetramerizációs/oligomerizációs domént (OD) és egy szabályozó régiót; emellett a fehérje nukleáris lokalizációs (NLS) és nukleáris export szignálokkal (NES) is rendelkezik (4. ábra). A TAD feladata a p53 által szabályozott gének indukciója/gátlása (Surget és mtsai, 2013), emellett rajta keresztül a p53 számos fehérjéhez képes kapcsolódni; ezek lehetnek a transzkripciót aktiváló és gátló hatásúak is (a p300/CBP-hez /CREB-binding protein/ való kötődés elősegíti a transzkripciót, míg az Mdm2 (mouse double minute 2) kapcsolódása gátolja azt; deOliveira és mtsai, 2015), illetve ezen keresztül jön létre a p53-Mdm2 kapcsolat is (lásd később, Saha és mtsai, 2015). Emellett a TAD szerepet játszik a mitokondriumban a Bcl-2 és a Bcl-xL fehérjékhez való kötődésben, elősegítve a Bax/Bak-felszabadulást és a transzkripció-független apoptózist (Chi, 2014). A p53 fehérje aktivitását és stabilitását nagyban befolyásolhatja a TAD-ben található aminosavak foszforilációja (deOliveira és mtsai, 2015). A prolin-gazdag régió a p53 fehérje tumor szuppresszor funkciójának ellátásához, valamint a mitokondriumban az apoptózis kiváltásához szükséges (Wang és mtsai, 2014). A p53 génben leírt mutációk többsége a DNS-kötő domént kódoló régióban lokalizálódik (Comel és mtsai, 2014; Saha és mtsai, 2015; Weisz és mtsai, 2007). Hat úgynevezett „hot-spot” hely található itt, melyek gyakran szenvednek mutációt, ennek következményeképpen egy aminosav kicserélődik és a fehérje nem, vagy a vad típustól eltérően működik (Arg175His, Gly245Ser, Arg248Trp, Arg249Ser, Arg273His, Arg282Trp; deOliveira és mtsai, 2015). Az aminosav-csere következtében a p53 fehérje

nem tud specifikusan kötődni a DNS-hez, megszűnik a transzkripció aktivitása, illetve a mutáns p53 fehérjék a vad típusúakkal hetero-tetramereket hozhatnak létre, melyekben domináns negatív módon érvényesül a mutáns fehérjék hatása (Hao és Cho, 2014). A p53 fehérje tetramer formában kötődik a DNS-hez, ebben van szerepe az oligomerizációs doménnek (Khoury és Bourdon, 2011; Leroy és mtsai, 2014; Saha és mtsai, 2015); emellett található itt NLS és több ubikvitinációs hely is (Surget és mtsai, 2013).

A p53 fehérje transzkripció faktoraként több mint 3600 gén átírását szabályozza (Surget és mtsai, 2013). Az általa szabályozott gének promóterében/enhancerében a p53 olyan régióhoz kötődik, amelyben két konszenzus szekvencia (5'-RRRCWWGYYY-3', ahol R: purin, Y: pirimidin, W: A vagy T) található, köztük spacer régióval (Hao és Cho, 2014; Khoury és Bourdon, 2011; Saha és mtsai, 2015). Az egyes promóterekhez azonban eltérő affinitással kapcsolódik a p53: a sejtciklust szabályozó gének promóteréhez nagy, míg az apoptózisban szerepet játszó génekéhez kis affinitással kötődik (Hao és Cho, 2014). Ennek az lehet a magyarázata, hogy csak erőteljes stressz esetén emelkedik meg annyira a p53-szint, hogy a pro-apoptotikus fehérjét kódoló gének átíródjanak (Hao és Cho, 2014; Khoury és Bourdon, 2011).

Bár a teljes hosszúságú fehérje molekulatömege 53 kDa, a p53 gén átírásakor 8 különféle mRNS keletkezik, melyek összesen 12 izoformát kódolnak (Leroy és mtsai, 2014) (5. ábra). A teljes hosszúságú p53 fehérje (FLp53, p53 α) rendelkezik az összes korábban felsorolt doménnel. Ezen régiók azonban részben vagy teljesen hiányoznak a többi p53 izoformából, melyek alternatív promóter-használat, alternatív splicing vagy a fehérjeszintézis alternatív iniciációjának eredményeképpen szintetizálódnak (Khoury és Bourdon, 2011; Surget és mtsai, 2013). A humán p53 gén transzkripciója két promóterrel indulhat (P1 és P2), melyek közül az ún. internal promóter (P2) a gén 4. intronjában található (Khoury és Bourdon, 2011). A p53 α , β és γ izoformák szintézisekor az átírás a géntől proximálisan elhelyezkedő P1 promóterrel indul, míg a Δ 133p53(α , β , γ) és a Δ 160p53(α , β , γ) izoformák expressziója a P2 promóteren kezdődik (Surget és mtsai, 2013). Az α , β , γ izoformák a C-terminálist érintő alternatív splicing eredményeképpen jönnek létre, közülük csak az α izoformák tartalmaznak működőképes oligomerizációs domént (Surget és mtsai, 2013). A Δ 40p53 izoformák (más néven Δ Np53) a 2. intron alternatív splicing-jának és/vagy a transláció alternatív iniciációjának a termékei, ezekből a fehérjékből hiányzik a TAD egy része (TAD1)

(Surget és mtsai, 2013). A különféle izoformák fokozhatják és gátolhatják is a p53 tumor szuppresszor aktivitását (Surget és mtsai, 2013). Az egyes izoformák normál szövetekben is jelen vannak, azonban megváltozhat az expressziójuk tumor sejtekben, illetve patogének hatására (például a *H. pylori* fokozza a $\Delta 133p53$ és $\Delta 160p53$ izoformák expresszióját a gyomor epitelsejtjeiben, elősegítve a sejtek túlélését) (Surget és mtsai, 2013).



5. ábra: A p53 fehérje izoformái.

Normál sejtekben alacsony a p53-szint (Weisz és mtsai, 2007), ezért az Mdm2 (emberben Hdm2) fehérje tehető felelőssé; az Mdm2 ubikvitin-ligázként segíti elő a p53 fehérje proteaszómális degradációját (Chi, 2014). Stressz hatások (például a DNS károsodása, hypoxia, UV-sugárzás, onkogének aktivációja) következtében megemelkedik a p53 fehérje mennyisége (Chi, 2014), azonban a p53 transzkripciós faktorként működve fokozza az *mdm2* gén átírását, ezáltal indirekt módon csökkentve

saját mennyiségét (negatív feedback, deOliveira és mtsai, 2015; Schneiderhan és mtsai, 2003). A p53 fehérje működésképtelensége nemcsak a p53 gén mutációjára, hanem az Mdm2 fokozott működésére/overexpressziójára is visszavezethető; ebben az esetben a p53 fehérje vagy degradálódik (az Mdm2 általi poli-ubikvitináció eredményeképpen), vagy exportálódik a magból (mono-ubikvitináció következtében) (Chi, 2014; Hao és Cho, 2014). Emellett az Mdm2 képes gyengíteni a kapcsolatot a p53 fehérje transzaktivációs doménje és egyes transzkripciós koaktivátorok (például p300/CBP) között, ami szintén a p53-funkció gátlásához vezet (Chi, 2014; Hao és Cho, 2014). Ismertek olyan vegyületek, melyek a p53 és az Mdm2 közti kapcsolatot gátolják, ilyenek például a Nutlin-1, -2, -3 és a chlorofusin (Saha és mtsai, 2015).

A p53 tumor szuppresszor fehérje funkciója sokrétű, legismertebb feladatai: (1) szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában (a p21 gén indukciója révén leállíthatja a sejtciklust; Chi, 2014; Hao és Cho, 2014); (2) indukálhatja a DNS-repair mechanizmusokban részt vevő fehérjék génjeinek átírását (Hao és Cho, 2014); (3) szabályozza az apoptózis folyamatát (a Bcl-2 fehérjecsalád tagjait kódoló gének transzkripciójának serkentésével/gátlásával). Az említett folyamatokon kívül szabályozza az autofágiát, a (tumor) sejtek metabolizmusát, a vezikuláris transzport folyamatát, a citoskeleton organizációját, az endocitózist és a nekrozist (Comel és mtsai, 2014; Hao és Cho, 2014; Wang és mtsai, 2014). DNS-károsodást követően a sejtciklus leállítása történhet a G1/S-fázisban (a p21 indukciója révén), illetve a G2/M-fázisban is (a GADD45, growth arrest and DNA damage 45 indukcióján keresztül), ezáltal lehetővé téve a hibák kijavítását (Surget és mtsai, 2013).

A p53 fehérje több mechanizmus révén is részt vehet az apoptózis intrinsic jelátvitelében (Comel és mtsai, 2014). Egyfelől transzkripciós faktorként képes aktiválni és gátolni is a Bcl-2 családba tartozó és egyéb fehérjék génjének átírását: indukálhatja a *bax*, *puma*, *nox*, *bid*, *bad*, *apaf1*, *smac/diablo* (Chi, 2014; Comel és mtsai, 2014; Hao és Cho, 2014; Lopez és Tait, 2015; Surget és mtsai, 2013; Yip és Reed, 2008; Wang és mtsai, 2014), míg gátolhatja a *bcl-2*, *bcl-xL*, *mcl-1*, *survivin* (Comel és mtsai, 2014; Khoury és Bourdon, 2011; Surget és mtsai, 2013; Wang és mtsai, 2014) géneket, a pro-apoptotikus fehérjék, vagyis a sejthalál irányába tolva el összességében az egyensúlyt. Másfelől a p53 fehérje működhet transzkripció-független módon is; a citoplazmában közvetlenül kapcsolódva a Bcl-2 fehérjecsalád tagjaihoz képes szabályozni azok aktivitását (a „BH3-only” fehérjékhez hasonlóan működve) (Yip és Reed, 2008; Wang

és mtsai, 2014). Egyrészt kötődik a Bcl-2, Bcl-xL és Mcl-1 fehérjékhez, aminek következtében a Bax és a Bak felszabadulnak az anti-apoptotikus fehérjékkel alkotott gátló komplexből, másrészt közvetlenül is képes a Bax/Bak-aktivációra (a Bax esetében ún. „hit and run” mechanizmussal, stabil p53-Bax komplexet még nem sikerült kimutatni) (Chi, 2014). Ennek következtében a Bax transzlokálódik a mitokondriumba, ahol oligomer formában járul hozzá a membrán-permeabilizációhoz (Comel és mtsai, 2014). A citoplazmában a p53 fehérje képes kötödni a pro-kaspáz-3-hoz is, ezáltal fokozva annak aktivációját (Comel és mtsai, 2014). A p53 fehérje olyan gének átírását is serkentheti, melyek az extrinsic útban közreműködő fehérjéket (Fas, FasL, DR5) kódolnak (Khoury és Bourdon, 2011; Surget és mtsai, 2013; Wang és mtsai, 2014). A p53 nemkódoló RNS-gének átírását is fokozhatja (mikro RNS-ek, hosszú nem-kódoló RNS-ek, hosszú intergénikus nem-kódoló RNS-ek), emellett szabályozza a miRNS-ek érését is. Ezek a mikroRNS-ek (pl. miR-34) a sejtciklus, repair folyamatok, a sejt túlélés, az epitéliális-mezenchimális tranzíció, a metabolizmus és az angiogenezis szabályozásában működnek közre (Hao és Cho, 2014).

A p53 fehérje számos poszttranszlációs módosítás célpontja lehet (foszforiláció, acetiláció, ubikvitináció, sumoiláció, neddiláció, metiláció), melyek a fehérje működésére és sejten belüli lokalizációjára is hatással lehetnek. Az Mdm2 által végrehajtott multi-mono-ubikvitináció következtében a p53 kijut a citoplazmába; szükség esetén ez a módosítás kell a fehérje mitokondriális transzlokációjához (Comel és mtsai, 2014), ezzel szemben a fehérje poli-ubikvitinációja a proteaszómák általi degradációhoz vezet (deOliveira és mtsai, 2015). Eddig körülbelül 20 olyan szerin és treonin aminosavat írtak le a p53 fehérjében, melyek stressz következtében foszforilálódnak; emellett körülbelül 6 olyan lizin található a fehérjében, ami stressz hatására acetilálódik. A (DNS-károsodás által kiváltott) p53-foszforilációt végrehajtó kinázok lehetnek többek között a következők: JNK, p38MAPK, protein kináz C (PKC), ERK, glikogén-szintáz-kináz 3 β (GSK3 β), ataxia-telangiectasia mutated (ATM), ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR), homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2); míg az acetilációért a p300/CBP, a p300/CBP-associated factor (PCAF), a hMOF és a Tip60 enzimek lehetnek felelősek (Hao és Cho, 2014). Az acetiláció (a C-terminálison belül), az érintett aminosav pozíciójától függően, eredményezheti a sejt elpusztulását, a sejtciklus leállítását (deOliveira és mtsai, 2015), illetve a fehérje degradációjához is vezethet (Saha és mtsai, 2015). DNS-károsodás következtében

acetilálódik a 120. pozícióban lévő lizin aminosav, ami lehetővé teszi a p53 kötődését a Bak fehérjéhez a mitokondrium külső membránjában, ennek következtében válik le az Mcl-1 fehérje a Bak-ról (Comel és mtsai, 2014). Emellett az acetiláció az Mdm2 leválását, így a p53 fehérje stabilizálását is eredményezheti, elősegítve a *puma* és a *bax* gének indukcióját (Hao és Cho, 2014). A DNS-t károsító hatások a p53 fehérje foszforilációját is eredményezhetik; a szerin-46 foszforilációja (a mono-ubikvitinációhoz hasonlóan) elősegíti a p53 mitokondriális transzlokációját, majd ott a Bcl-2 megkötése révén a külső membrán permeabilizását. Emellett a sejtmagban p53-stabilizációt okozva (Saha és mtsai, 2015) csökkenti a p53 fehérje Mdm2 iránti affinitását és pro-apoptotikus gének (*bax*, *noxa*, *puma*, *dr5*, stb.) átírásának fokozódását (Comel és mtsai, 2014; Puca és mtsai, 2010). Más aminosavak (szerin-12, treonin-18 és szerin-20) DNS-károsodás által előidézett foszforilációja következtében az Mdm2 leválik a transzaktivációs doménről, így nagyobb affinitással kapcsolódik a p53-hoz a p300/CBP és fokozódik a p53 transzkripciós aktivitása (deOliveira és mtsai, 2015, Saha és mtsai, 2014). A szerin-15 aminosavon bekövetkező foszforiláció következménye a p53 fehérje stabilizációja, mely az érintett sejt apoptózisát eredményezheti (Saha és mtsai, 2015). Az ismertetett folyamatokon kívül a lizin-386 sumoilációja is serkentheti a p53 transzkripciós aktivitását (Saha és mtsai, 2015).

A p53-családba tartoznak a p63 és a p73 fehérjék is, melyeknek alternatív splicing eredményeképpen szintén több izoformája jöhet létre (Saha és mtsai, 2015), ezek tumor sejtekben is kimutathatóak (Surget és mtsai, 2013). Hasonlóan a p53-hoz, ezek a fehérjék is rendelkeznek transzaktivációs, DNS-kötő és oligomerizációs doménnel, illetve génjükből 2 promóter található (Khoury és Bourdon, 2011; Surget és mtsai, 2013). A p63 fehérjének a végtagok és az epitélium fejlődésében van szerepe; míg a p73 az idegrendszer, a szaglás és az immunrendszer fejlődésében, valamint a neuronális differenciációban tölt be fontos szerepet (Khoury és Bourdon, 2011; Saha és mtsai, 2015), emellett a p53 fehérjével együttműködve mindkét fehérje részt vesz a tumorképződés folyamatának szabályozásában/gátlásában (Surget és mtsai, 2013). A p63 és p73 fehérjék homo- illetve hetero-tetramer formában képesek a p53 által szabályozott gének promóteréhez kötődni és az érintett gének expresszióját befolyásolva kiválthatják a sejtciklus leállítását vagy a sejt elpusztulását (Khoury és Bourdon, 2011).

4. A PC12 sejtvonala

A PC12 patkány phaeochromocytoma sejtvonala 1976-os létrehozása óta (Greene és Tischler, 1976) széles körben ismert. Könnyű tenyésztetőségének és viszonylag rövid generációs idejének köszönhetően elterjedten alkalmazzák modellrendszerként a sejt túlélés, az apoptózis és a neuronális differenciáció hátterében álló jelátviteli útvonalak vizsgálata során.

Az Orvosi Biológiai Intézetben a vad típusú PC12 sejtvonala mellett olyan PC12 szubklónok is rendelkezésre állnak, melyek expresszálják egy adott fehérje mutáns (domináns gátló vagy konstitutívan aktív) verzióját. A kutatócsoportunk által leggyakrabban használt ilyen PC12 szubklónok a p143p53PC12, az M-M17-26 és a K-8 sejtvonala.

A p143p53PC12 sejtekben megtalálható domináns gátló p53 fehérje esetén a mutáció a 143-as pozícióban lévő aminosavat érinti (valin-alanin csere) (Fábián és mtsai, 2006). A DNS-kötő doménben található aminosav-csere hatására a mutáns fehérje nem képes transzkripciós faktorként ellátni a funkcióját, ugyanis képtelen a p53 fehérje által típusosan felismert DNS-szekvenciához kötődni. Mivel a p53 fehérje tetramer szerkezetű transzkripciós faktorként működik, a tetramerben egy mutáns alegység jelenléte már a fehérje inaktivációjához vezet. Irodalmi adatok szerint a Val143Ala-mutáns p53 fehérje a vad típusú fehérjéhez viszonyítva kevésbé stabil (Saha és mtsai, 2015), mások szerint azonban képes fokozni egyes gének expresszióját (EGF-receptort, IGF-1-receptort, c-Myc fehérjét, NF- κ B egyik alegységét kódoló gének; Weisz és mtsai, 2007).

II. Célkitűzések

A NO-donor SNP nagy dózisban történő alkalmazása sejtpusztulást eredményez PC12 sejtekben. Munkánk célja a következő volt:

1. Az SNP és a belőle felszabaduló NO által kiváltott celluláris/nitrozatív stressz által aktivált jelátviteli fehérjék/utak analízise.
2. A domináns gátló mutáns p53 fehérjét tartalmazó p143p53PC12 sejtvonal fokozott SNP-érzékenységének hátterében álló molekuláris mechanizmusok vizsgálata.

Egér makrofág sejtekben az SNP nagy koncentrációjával kiváltott apoptózis gátolható dbcGMP- vagy kis dózisú (100 μ M) SNP-előkezeléssel. A kísérleti elrendezéseket PC12 modellrendszerünkre adaptálva célunk a következők vizsgálata volt:

1. SNP által okozott apoptózis 100 μ M SNP-előkezeléssel történő kivédésének lehetősége.
2. Más, szintén apoptózist előidéző körülmények/kezelések (szérummegvonás, ciszplatin, tunikamicin, anizomicin) pro-apoptotikus hatásának csökkentése kis dózisú SNP-előkezeléssel.
3. A 100 μ M SNP-vel történő előkezelés részlegesen protektív hatásának hátterében álló jelátviteli folyamatok vizsgálata.

III. Anyagok és módszerek

1. Sejtvonalak

Kísérleteink során vad típusú PC12 patkány mellékvesevelő és p143p53PC12 sejtvonallal dolgoztunk; az utóbbi egy domináns gátló mutáns p53 fehérjét expresszáló PC12 szubklón (Fábián és mtsai, 2006). A sejteket a számukra optimális körülmények között (37°C-on, 5% CO₂ jelenlétében) tenyésztettük, ehhez olyan médiumot (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma-Aldrich Hungary, Budapest) használtunk, melyet 5% borjú és 10% ló szérummal egészítettünk ki (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A p143p53PC12 sejtvonál fenntartásához használt médium 200 µg/ml geneticint (G418; Merck KGaA, Darmstadt, Németország) is tartalmazott.

2. A sejtek életképességének vizsgálata

Az ATP-assay (Promega, Madison, WI, USA) egy sejtviabilitás-vizsgálati módszer, mely az ATP-tartalom mérése révén lehetővé teszi az élő sejtek arányának meghatározását egy sejttenyészetben. Mintánként 2×10^3 sejtet ültettünk ki 96 lyukú sejttenyésztő lemezre, a tenyésztés a korábban ismertetett körülmények között folyt. Ezt követően a sejteket SNP-vel kezeltük; az egyes SNP-dózisok (20, 50, 100, 200, 400 és 2000 µM) toxicitásának meghatározása során a kezelés időtartama 72 óra volt, míg az SNP-citotoxicitás időfüggésének vizsgálata során 400 µM SNP-kezelést végeztünk 2, 4, 6, 8, 18 és 24 órás időtartamban. Ezt követően az ATP-tartalom mérését a gyártó utasításainak megfelelően végeztük.

3. DNS-fragmentáció vizsgálata

A kezeléseket megelőző napon mintánként 10^7 sejtet ültettünk ki 100 mm-es lemezekre. A kezeléseket követően felkapartuk a sejteket, majd DNS-t izoláltunk a Yao és Cooper (1995) által publikált közleményben található protokoll alapján. Megfelelő pufferben (0,5% Triton X-100, 5 mM EDTA, 5 mM Tris, pH 7,4) lízist végeztünk, majd centrifugálással (13500 rpm, 20 perc, 4°C) eltávolítottuk a sejttörmelékét. Az így kapott felülúszóból fenol/kloroformos extrakcióval távolítottuk el a fehérjéket. A DNS-t 3M

nátrium-acetát és 96% etanol segítségével precipitáltuk (-20°C-on, éjszakán át), a sókat 70% etanollal távolítottuk el, míg az RNS-szennyeződések lebontását RNáz-emésztéssel (Sigma-Aldrich) végeztük (37°C, 2 óra). Az így kapott DNS-mintákat 1,8%-os, etídium-bromidot tartalmazó agaróz gélben futtattuk, majd a gélről a Kodak IS440 CF géldokumentációs rendszerrel (New England Nuclear, Boston, MA, USA) készítettünk képeket.

4. Western blot analízis

A Western blot vizsgálatokat a Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) általunk módosított protokollja alapján végeztük. Mintánként 6×10^6 sejtet ültettünk ki 100 mm-es sejtenyésző lemezekre, majd a kezelési idő letelte után felkapartuk a sejteket. Ezután lízist végeztünk proteáz- és foszfatáz-gátlókat tartalmazó pufferben (RIPA: 1% NP40, 0,5% Na-dezoxikolat, 0,1% SDS, 1x PBS; Sigma-Aldrich). A kaszpáz-aktiváció vizsgálatata során egy speciális puffert használtunk a fehérje-izoláláshoz (Chaps cell extract buffer; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Fehérje-izolálást követően 5 perces hődenaturációt végeztünk, majd minden minta esetén azonos fehérjemennyiséget használtunk a 12 vagy 15%-os gélben végzett SDS-poliakrilamid-gélelektroforézishez. Az elektroforézist követően a fehérjéket a gélből PVDF membránra (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) blottoltuk át, a vizsgálni kívánt fehérjék detektálásához indirekt módszert használtunk. Ennek során a membránokat tejpör 5%-os oldatában inkubáltuk a nem specifikus kötőhelyek blokkolása végett; ezt követte a vizsgálni kívánt fehérjére specifikus elsődleges antitestben történő inkubáció 4°C-on, egy éjszakán át; végül az elsődleges antitestet felismerő, tormagyökér-peroxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestet használtunk (szobahőmérsékleten végzett, 2 órás inkubáció). A jelet a Kodak IS440 CF géldokumentációs rendszerrel detektáltuk.

Az anti-P-p38MAPK, anti-p38MAPK, anti-P-JNK, anti-JNK, anti-P-Akt, anti-P-eIF2 α , anti-eIF2 α , anti-P-p53Ser15, anti-P-p53Ser46, anti-CHOP, anti-Bcl-2, anti-Bcl-xL, anti-Bax, anti-kaspáz-8, anti-hasított kaszpáz-9, anti-hasított kaszpáz-3 és anti- β -aktin antitesteket a Cell Signaling Technology-tól szereztük be. Az anti-p53 és az anti-ERK1/2 antitesteket a Santa Cruz Biotechnology-tól, az anti-aktin antitestet a Merck-től, az anti-citokróm c antitestet a Sigma-Aldrich-től, míg az anti-PKR antitestet a BD

Biosciences-től vásároltuk. A HRP-konjugált másodlagos anti-nyúl és anti-egér antitesteket a Cell Signaling Technology-tól szereztük be.

5. Citokróm c-felszabadulás vizsgálata

A mitokondriumok izolálását a Frezza és mtsai (2007) által publikált protokoll módosított verziója alapján végeztük. Mintánként 6×10^6 sejtől indultunk ki, melyeket 100 mm-es lemezekre tenyésztettünk. Kezelést követően a sejteket a lemezeiről felkapartuk és centrifugálással összegyűjtöttük, majd az üledéket felszuszpendáltuk. Az ehhez szükséges puffer (0,1M Tris-MOPS, 0,1M EGTA/Tris, 1M szacharóz, pH 7,4; Sigma-Aldrich) tartalmazta azokat a foszfatáz- és proteáz-gátlókat, amiket a Western blot analízist megelőző fehérje-izolálás során használtunk. A sejtszuszpenziót homogenizáltuk, majd 600g fordulatszámon centrifugáltuk. Az így kapott felülúszót újra centrifugáltuk (7000g), majd az így nyert posztmitokondriális szupernatánsból citoplazmatikus fehérjéket izoláltunk. Az üledéket felszuszpendáltuk és újabb centrifugálást (7000g) követően mitokondrium frakcióként használtuk. A centrifugálás minden esetben 4°C-on, 10 percig történt. A citoplazmatikus, illetve mitokondriális fehérjék izolálását a korábban ismertetett módszerrel végeztük.

6. Apoptotikus magmorfológia vizsgálata

Lyukanként 10^5 sejtet ültettünk ki üveg fedőlemezekre, 6 lyukú tenyésztőlemez lyukaiba. A kiültetést megelőzően a fedőlemezeket poli-L-lizinnel vontuk be, hogy a sejtek könnyen kitapadjanak rájuk. Másnap a minták fele kis dózisu (100 μ M) SNP-előkezelésen esett át, majd a következő napon, médiumcserét követően, a sejteket széruméheztetésnek, illetve SNP-, ciszplatin-, tunikamicin- vagy anizomicin-kezelésnek vetettük alá. A kezelési idő letelte után a sejteket paraformaldehid 4%-os oldatával fixáltuk (Sigma-Aldrich), majd a sejtmagi DNS-t fluoreszcens festékkel (Hoechst 33342, Sigma-Aldrich) festettük. Lefedést követően a preparátumokat fluoreszcencia mikroszkópban (Olympus BX-61; Olympus Corporation, Tokió, Japán) vizsgáltuk, apoptotikus morfológiájú sejtmagokat keresve.

7. Immuncitokémia

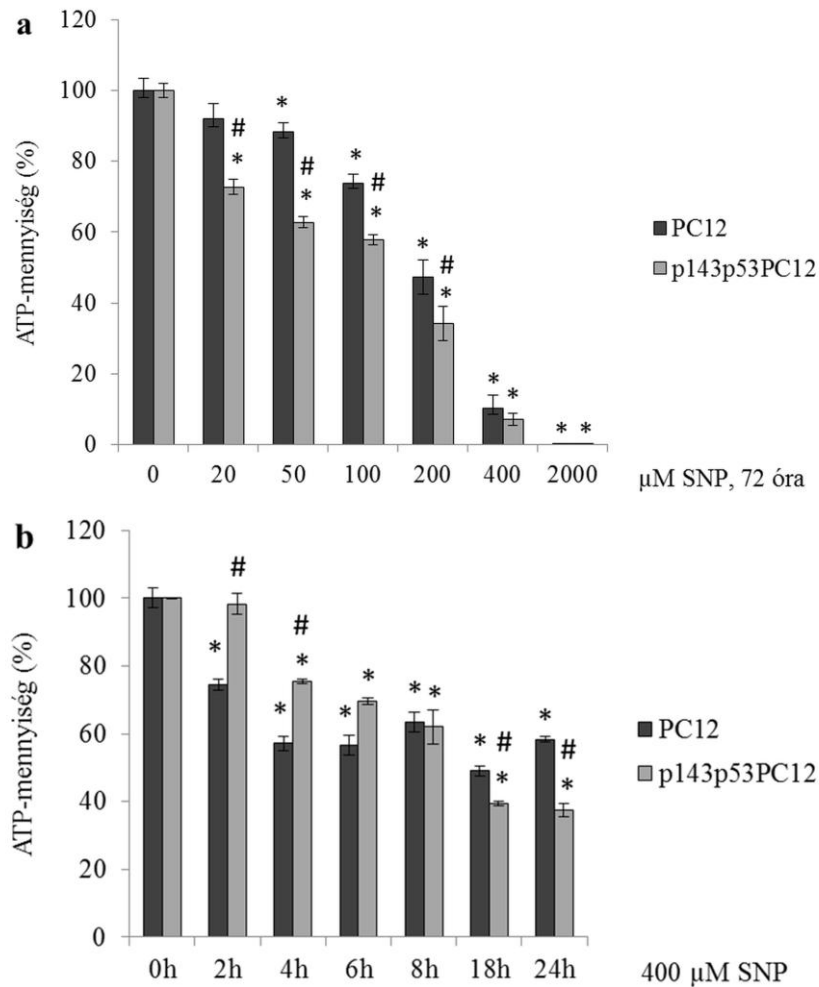
Mintánként 5×10^3 sejtet ültettünk ki műanyag fedőlemezekre (Nunc Thermanox, Thermo Fisher Scientific Inc.), 96 lyukú lemez lyukaiba. A kezelési idő letelte után a sejteket fixáltuk (4% paraformaldehid) és permeabilizáltuk (Triton X-100, Sigma-Aldrich); a nem specifikus kötőhelyek blokkolására tejpor vagy albumin (BSA, Sigma-Aldrich) 5%-os oldatát használtuk. Ezt követően a mintákat az elsődleges antitestet tartalmazó oldatban inkubáltuk 4°C-on, egy éjszakán át. A következő napon fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestekkel (NorthernLights 493 és 557; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) végeztünk inkubációt (4°C, 1 óra); a sejtmagokat Hoechst 33342 fluoreszcens festékkel tettük láthatóvá. Az egyes lépések között Triton X-100-at tartalmazó pufferral mostuk a mintákat. Lefedést követően lézer scanning konfokális mikroszkóppal (Olympus FluoView 1000; Olympus Corporation, Tokió, Japán) vizsgáltuk a keresett fehérjék lokalizációját.

8. TUNEL-analízis

A TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling) módszer azon alapszik, hogy az apoptózis során a DNS darabolódása következtében nagy mennyiségben keletkeznek a 3'-végükön szabad OH-csoporttal rendelkező DNS-fragmentumok. Ezekhez a szabad DNS-végekhez a terminális-transzferáz nevű enzim fluoreszcensen jelölt nukleotidokat kapcsol, a reakció végeredménye fluoreszcencia vagy konfokális mikroszkóppal detektálható. Mintánként 2×10^4 sejtet ültettünk ki 96 lyukú sejtenyésztes lemez lyukaiba, műanyag fedőlemezekre. A kiültetést követő napon a minták fele alacsony koncentrációjú (100 μM) SNP-előkezelést kapott. A következő napon a sejteket pro-apoptotikus hatásoknak tettük ki (szérummegvonás, 400 μM SNP, ciszplatin, tunikamicin, anizomicin). A kezelési idő letelte után a sejteket fixálással és permeabilizálással (4% paraformaldehid, valamint Triton X-100) készítettük elő a további lépésekre. A terminális-transzferáz által katalizált reakció és a DNS-festés (Hoechst 33342) után lefedtük, majd lézer scanning konfokális mikroszkóppal (Olympus FluoView 1000) vizsgáltuk a mintákat.

IV. Eredmények

1. A p143p53PC12 sejtvonal érzékenyebb a nagy dózisú SNP-kezelésre mint a vad típusú PC12 sejtek

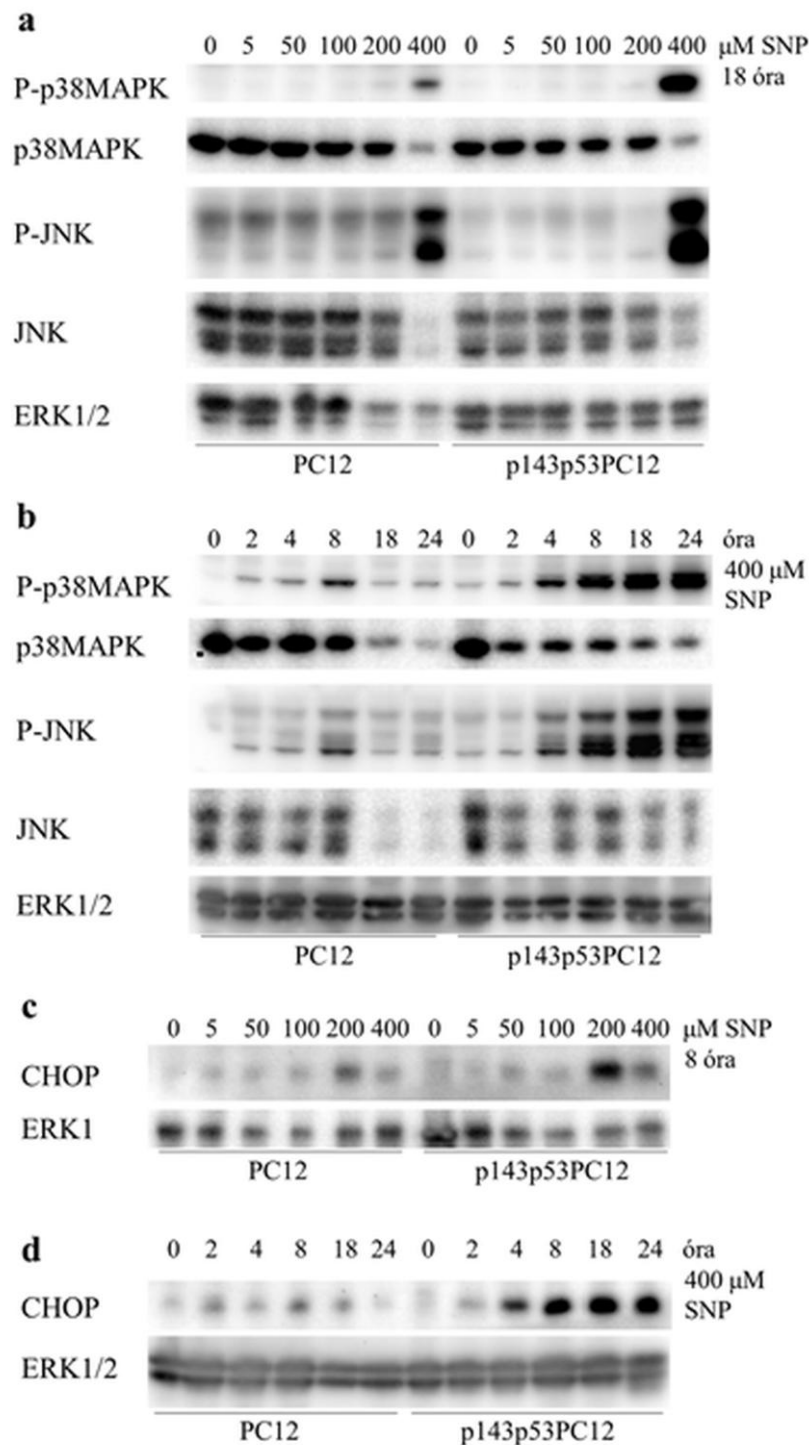


6. ábra: PC12 és p143p53PC12 sejtekben az ATP mennyiségének csökkenése (a) emelkedő koncentrációjú, illetve (b) növekvő időtartamú SNP-kezeléseket követően. A sejteket (a) az ábrán feltüntetett SNP-dózisokkal, illetve (b) az ábrán látható ideig kezeltük, majd lumineszcencia-mérésen alapuló módszer segítségével meghatároztuk bennük az ATP-mennyiséget, ebből következtetve az élő/metabolikusan aktív sejt számra. *A kontrolltól szignifikánsan különböző minták. #Azok a p143p53PC12 minták, melyek szignifikánsan különböznek az (a) ugyanolyan dózissal vagy (b) ugyanannyi ideig kezelt vad típusú PC12 mintáktól. ($p < 0,05$)

A sejtek életképességének/viabilitásának vizsgálatára az ún. ATP-assay módszert használtuk, a kezeléseket követően a sejtekben mérhető ATP-tartalomról következtettünk az élő sejtek számára. A vizsgált SNP-koncentrációk közül a 100 μM

és annál alacsonyabb dózisok nem voltak citotoxikusak, azonban a 400 μM SNP-vel történő (72 óra időtartamú) kezelés az ATP mennyiségét 10% körüli értékre csökkentette mindkét sejtvonalban; a további kísérletek során ezt az SNP-koncentrációt választottuk az apoptózis előidézésére. A 20, 50, 100 és 200 μM SNP-vel végzett kezelésekre a p143p53PC12 sejtek érzékenyebben reagáltak, a két sejtvonal közti különbség szignifikáns volt. 400 és 2000 μM SNP hatására ez a szignifikancia megszűnt, mivel a sejtek többsége/mindegyike elpusztult (6.a ábra). A hosszan tartó (18 és 24 órás) 400 μM SNP-kezelésre a domináns gátló p53 fehérjét expresszáló sejtek szignifikánsan érzékenyebben reagáltak a vad típusú sejteknél (6.b ábra).

2. Domináns negatív p53 fehérjét expresszáló sejtekben az SNP-kezelés fokozottabb stressz kináz-aktivációt vált ki

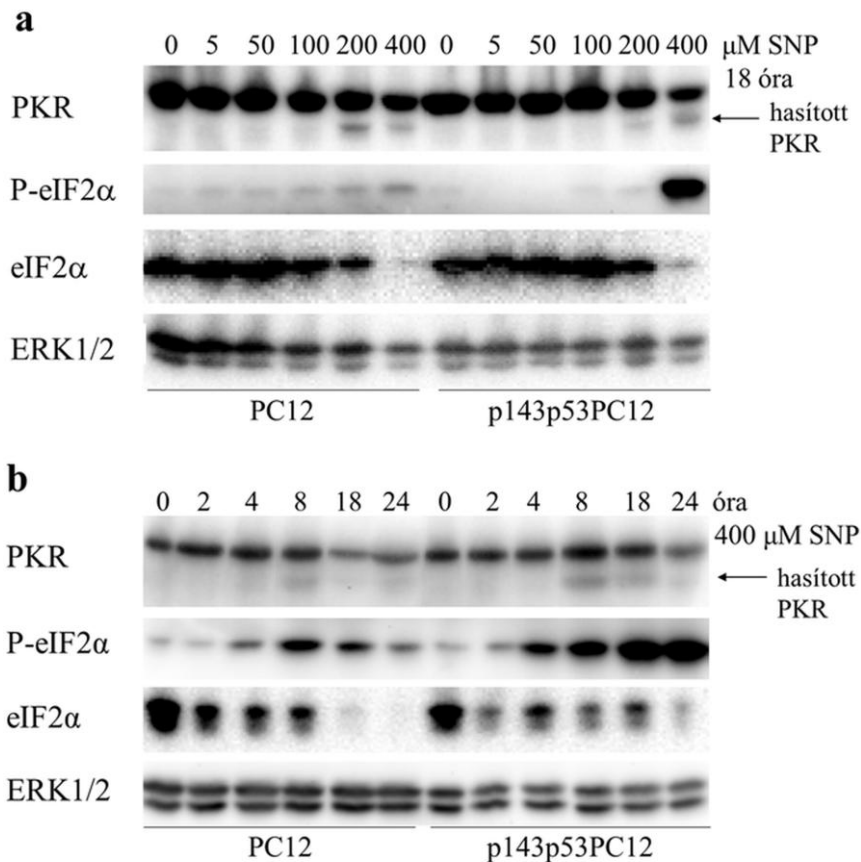


7. ábra: Stressz-kináz- és CHOP-aktiváció vizsgálata vad típusú és domináns gátló p53 fehérjét expresszáló PC12 sejtekben. A sejteket **(a, c)** 8 vagy 18 órás, az ábrán feltüntetett SNP-koncentrációkkal végzett kezeléseknak vetettük alá, vagy **(b, d)** 400 μ M SNP-vel kezeltük az ábrán látható ideig. Ezt követően a sejtekből fehérjét izoláltunk, majd Western blot analízist végeztünk anti-P-p38MAPK, anti-p38MAPK, anti-P-JNK, anti-JNK és anti-CHOP antitestek segítségével. Az ERK1/2 fehérjéket mennyiségi kontrollként használtuk.

Apoptózist előidéző, illetve a sejtet ért stressz hatások következtében gyakran megfigyelhető a stressz kinázok, vagyis a p38MAPK és a JNK fehérjék foszforiláció révén megvalósuló aktivációja (lásd Bevezetés). 18 órás, 400 μ M SNP-vel történő kezelés mindkét vizsgált sejtvonalon p38MAPK- és JNK-foszforilációt idézett elő, azonban a p143p53PC12 sejtvonalon jóval erőteljesebb volt mindkét stressz kináz aktivációja (7.a ábra). Emellett az is szembevetendő volt, hogy PC12 sejtekben a p38MAPK és a JNK fehérjék foszforilációja 8 órás SNP-kezelést követően volt a leginkább kifejezett, majd fokozatosan lecsengett. Ezzel szemben a mutáns p53 fehérjével rendelkező sejtvonalon mindkét stressz kináz aktivációja tartósan bizonyult (7.b ábra).

A CHOP fehérje egy transzkripciós faktor, mely számos stressz hatás (többek között az ER stressz) következtében aktiválódhat, elősegítve az apoptózis végrehajtásában szerepet játszó fehérjéket (például Bim, DR5) kódoló gének átírását (Donnelly és mtsai, 2013). A CHOP indukciója mindkét sejtvonalon 200 μ M SNP hatására volt a legerőteljesebb (7.c ábra), annak ellenére, hogy a 400 μ M koncentráció jóval toxikusabbnak bizonyult ennél a dózisonál. Hasonlóan a stressz kinázok aktivációjához, a CHOP fehérje mennyiségének növekedése is kifejezettebb és tartósabb volt a p143p53PC12 sejtvonalon (7.d ábra).

3. A p143p53PC12 sejt vonal fokozott PKR-hasítással és eIF2 α -foszforilációval reagál a 400 μ M SNP-kezelésre



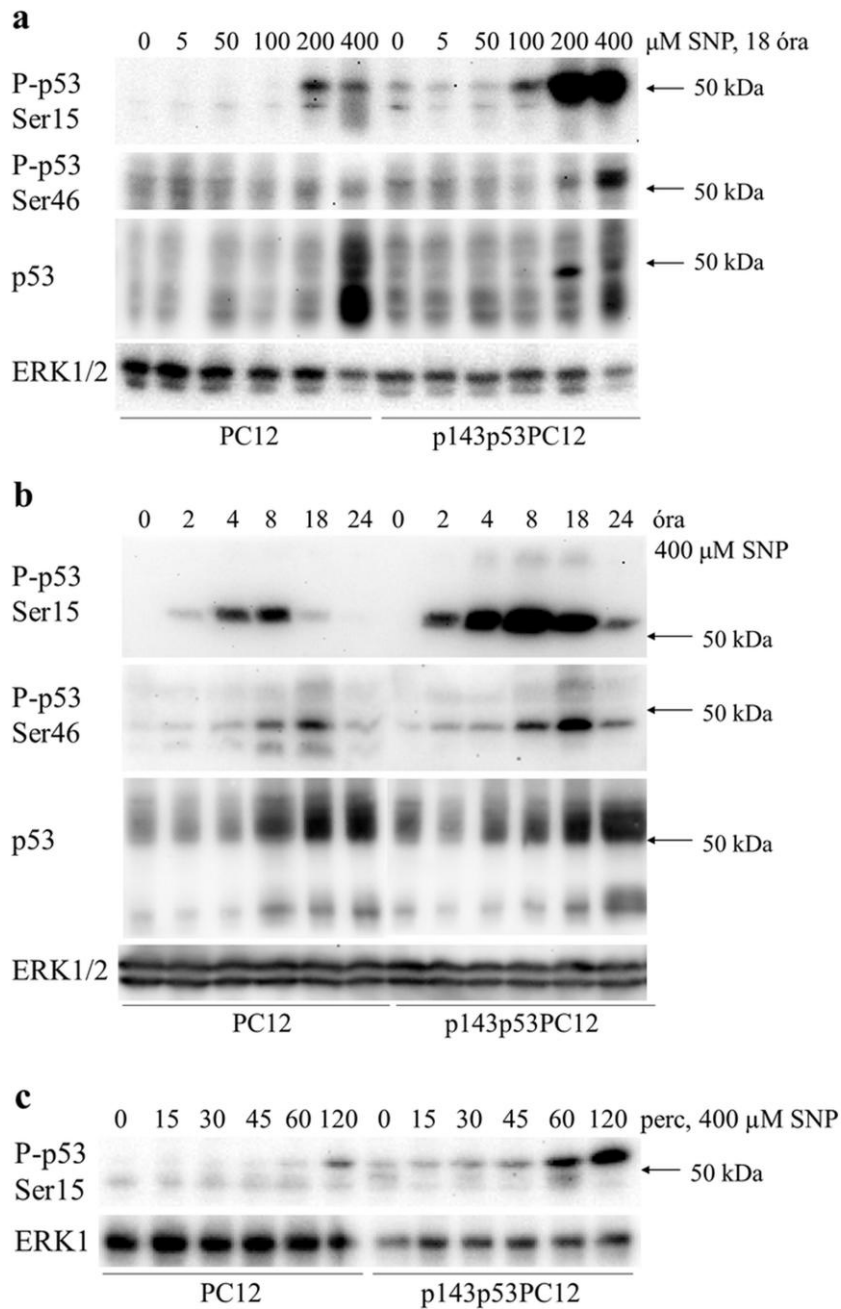
8. ábra: SNP-kezelést követő PKR-hasítás és eIF2 α -foszforiláció vizsgálata PC12 és p143p53PC12 sejtekben. A sejteket **(a)** az ábrán feltüntetett koncentrációkkal, illetve **(b)** az ábrán jelzett ideig kezeltük SNP-vel. Ezután összefehérjét izoláltunk a mintákból, majd Western blot analízis segítségével vizsgáltuk a hasított PKR, valamint a foszforilált/nem foszforilált eIF2 α fehérjék mennyiségét anti-PKR, anti-P-eIF2 α és anti-eIF2 α antitestek felhasználásával.

Vírusfertőzés és más hatások (NO, oxidatív és ER stressz, valamint citokinek és növekedési faktorok) a protein kináz R (PKR) aktivációját eredményezhetik (Donnelly és mtsai, 2013), melynek során a PKR fehérje kaszpázok által végzett proteolitikus hasításon megy át. Az aktív PKR szerin/treonin-specifikus kinázként működve foszforilálhatja célfehérjéit, többek között az eukarióta iniciációs faktor 2 α -alegységét (eIF2 α). Az eIF2 α foszforilációját más kinázok, többek között az ER stressz következtében aktiválódó PERK (PKR-like ER kinase), is végezhetik, azonban a következmény ezekben az esetekben is a transzláció (iniciációjának) gátlása (Donnelly és mtsai, 2013). Az eIF2 egy heterotrimer G-fehérje, ami egy ún. pre-iniciációs

komplexet hoz létre a riboszóma kis alegységével és más iniciációs faktorokkal, így segítve az első aminoacil-tRNS kötődését az mRNS-en lévő iniciációs kodonhoz. Az eIF2 α foszforilált állapotban nem kerül újra aktív, azaz GTP-kötő formába, így gátolja a fehérjeszintézist (Donnelly és mtsai, 2013). Összességében, a PKR-hasítás és az eIF2 α -foszforiláció hozzájárulnak a sejt apoptózissal történő elpusztulásához (Donnelly és mtsai, 2013; Hiramatsu és mtsai, 2015; Joshi és mtsai, 2013; Marchal és mtsai, 2014; Pap és Szeberényi, 2008; Saelens és mtsai, 2001).

Az SNP nagy dózisban (200 és 400 μ M) történő alkalmazása mindkét sejtvonalban PKR-hasítást eredményezett. A 400 μ M SNP által kiváltott PKR-aktiváció 8 órás kezelést követően volt a legkifejezettebb, hosszan tartó kezelések (18 és 24 óra) esetén kevésbé volt erőteljes. Az eIF2 α foszforilációja 400 μ M SNP-vel történő 18 órás kezelést követően volt a legerőteljesebb; míg a PKR-hasítás tekintetében nem tudtunk megfigyelni jelentős különbséget a két sejtvonal között, az eIF2 α foszforilációja jóval kifejezettebb volt p143p53PC12 sejtekben. További jelentős különbség a vad típusú és a mutáns p53 fehérjéket expresszáló sejtek között, hogy utóbbiakban volt csak megfigyelhető a tartós, a kezelés időtartamának növelésével egyre erőteljesebbé váló eIF2 α -foszforiláció (8.a és b ábrák).

4. 400 μM SNP erőtéljes p53-foszforilációt és -indukciót vált ki p143p53PC12 sejtekben

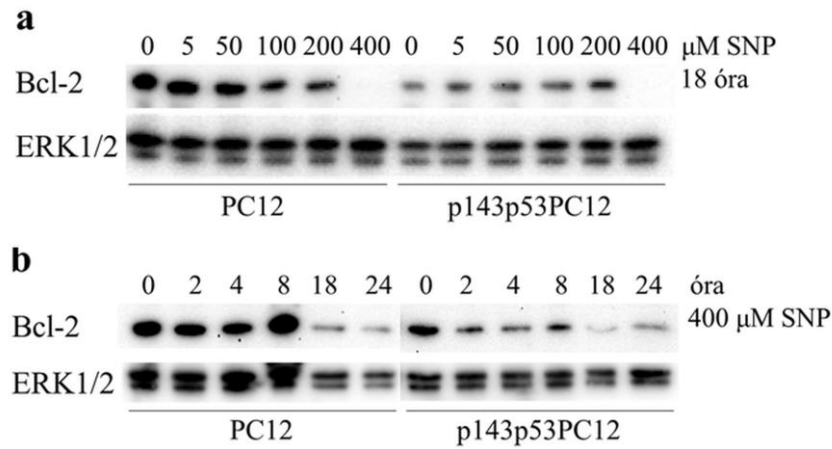


9. ábra: A p53 fehérje SNP-kezelés hatására bekövetkező foszforilációjának és mennyiségi változásainak vizsgálata PC12 és p143p53PC12 sejtekben. A sejtekből fehérjét izoláltunk (a) különféle dózisokkal végzett és (b, c) különböző időtartamú SNP-kezeléseket követően, majd Western blot vizsgálatot végeztünk. A p53 fehérje foszforilált formáinak kimutatására anti-P-p53Ser15 és anti-P-p53Ser46, míg a p53 fehérje mennyiségének detektálására anti-p53 antitestet használtunk.

A sejtet érő stressz hatások aktiválhatják a p53 fehérjét, mely ezt követően részben a sejtmagban (transzkripció faktoroként működve), részben pedig a citoplazmában fejti ki hatását. A p53 fehérje számos feladatot ellát a sejt életében, aktivitása szabályozható poszttranszlációs módosítások és fehérje-fehérje kapcsolatok révén is. A fehérje N-terminális régiójában található két olyan szerin aminosav, a 15. és a 46. pozíciókban, melyek foszforilációja gyakran megfigyelhető apoptózist kiváltó hatások következtében. A Ser-15 foszforilációja a p53 fehérje stabilizálódását eredményezi az Mdm2 fehérje leválasztása vagy a nukleáris export gátlása révén (Schneiderhan és mtsai, 2003; Seong és Ha, 2012), míg a Ser-46 aminosavon foszforilált p53 fehérje képes kiváltani különféle pro-apoptotikus gének indukcióját (Puca és mtsai, 2010). 200 és 400 μ M SNP-vel történő kezelés mindkét sejtvonalban a p53 fehérje foszforilációját eredményezte, mindkét említett szerin oldalláncon. A p53-foszforiláció p143p53PC12 sejtekben korábban kezdődött, erőteljesebb és tartósabb volt, mint vad típusú PC12 sejtekben (*9.a, b és c ábrák*).

Normál sejtekben a p53 fehérje nagyon kis mennyiségben van jelen, a sejtet érő stressz hatások azonban (többek között poszttranszlációs módosítások révén) erőteljesen megemelik a p53-szintet (Schneiderhan és mtsai, 2003). A p53 fehérje mennyiségének megnövekedését hosszan tartó (18 és 24 órás), 400 μ M SNP-vel végzett kezelés után tudtuk megfigyelni, e tekintetben nem volt jelentős különbség a két sejtvonal között (*9.a és b ábrák*).

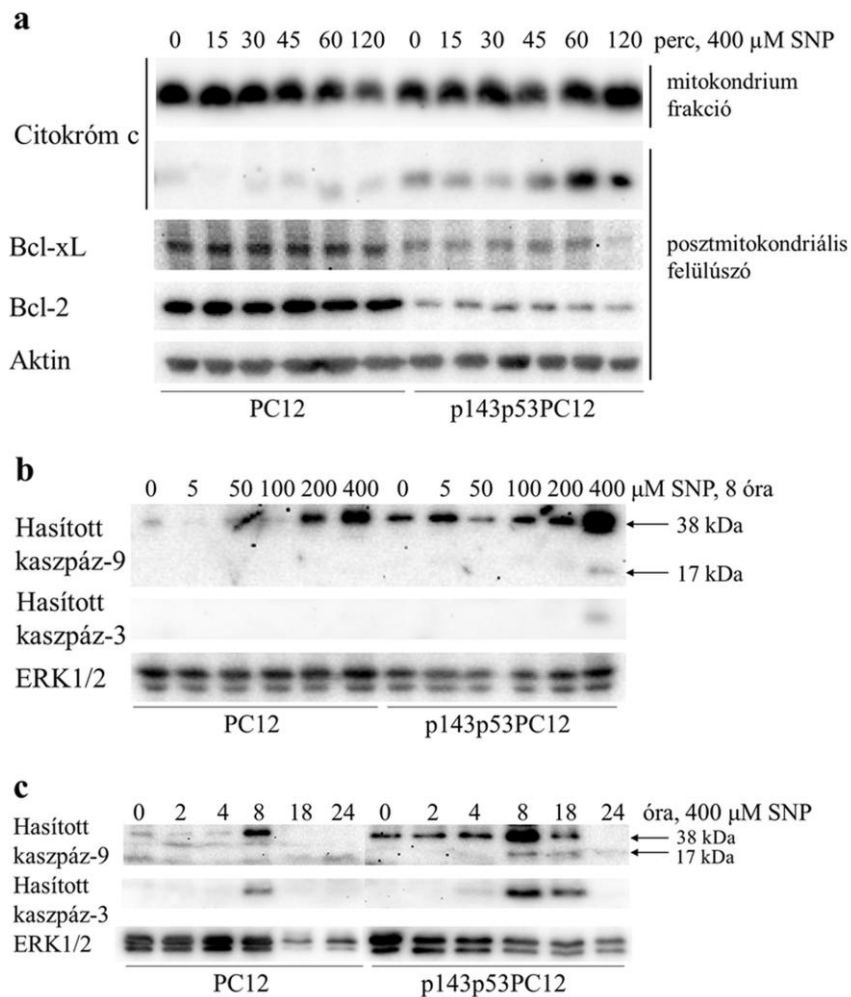
5. Toxikus dózisú SNP-kezelés következtében csökken a Bcl-2 fehérje mennyisége



10. ábra: A Bcl-2 fehérje mennyiségének SNP-indukálta csökkenése vad típusú és domináns gátló p53 fehérjét expresszáló PC12 sejtekben. (a) 5, 50, 100, 200 és 400 μM SNP-vel végzett 18 órás, valamint (b) 400 μM SNP-vel történő 2, 4, 8, 18 és 24 órás kezeléseket követően a sejtekből összfehérjét izoláltunk. A Western blot analízist anti-Bcl-2 antitest segítségével végeztük.

A Bcl-2 fehérje-család névadó tagja az egyik legismertebb anti-apoptotikus hatású fehérje (Siddiqui és mtsai, 2015), mennyiségének csökkenése a programozott sejthalál folyamata során megfigyelhető jelenség. Nagy koncentrációjú és hosszan tartó SNP-kezelés mindkét sejtvonalban jelentősen redukálta a Bcl-2 fehérje mennyiségét; a mutáns p53 fehérjét expresszáló sejtekben ez a jelenség azonban már rövidebb időtartamú SNP-kezelést követően is detektálható volt (10.a és b ábrák).

6. A p143p53PC12 sejtvonalba fokozottabb a 400 μ M SNP hatására bekövetkező citokróm c-felszabadulás és kaspáz-aktiváció

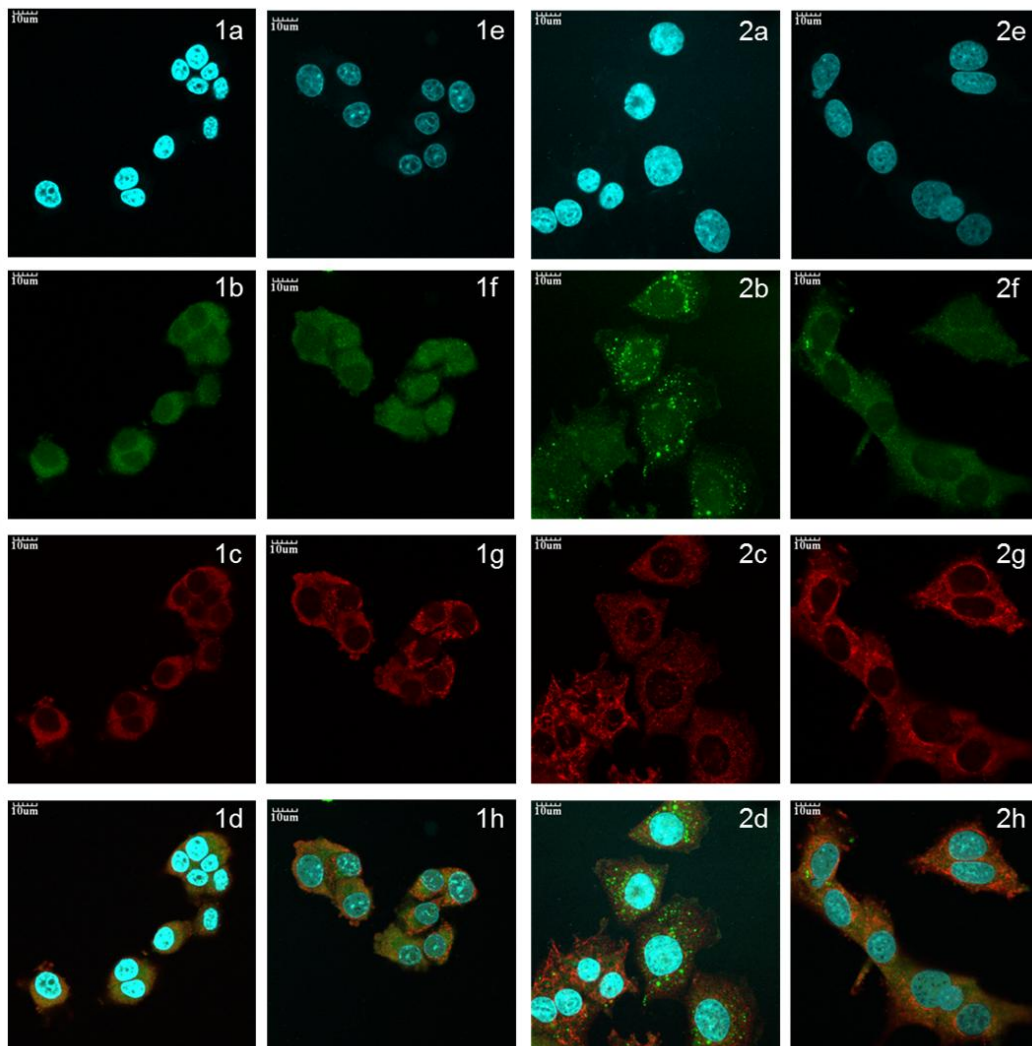


11. ábra: SNP-kezelést követő citokróm c-felszabadulás és kaspáz-aktiváció vizsgálata PC12 és p143p53PC12 sejtekben. (a) Eltérő időtartamú SNP-kezeléseket követően a sejtekből izolált mitokondrium frakcióból és a visszamaradó posztmitokondriális felülészből fehérjét izoláltunk, majd Western blot segítségével detektáltuk a citokróm c, a Bcl-2 és a Bcl-xL fehérjék mennyiségét (anti-citokróm c, anti-Bcl-2 és anti-Bcl-xL antitestek felhasználásával). (b, c) Az eltérő koncentrációjú, illetve időtartamú SNP-kezelések végeztével a sejtekből izolált fehérjékkel Western blot vizsgálatot végeztünk. A mintákban hasított kaspáz-9 és hasított kaspáz-3 elleni antitestekkel vizsgáltuk a kaspáz-9 és -3 fehérjék aktivációjának mértékét.

Az apoptózis intrinsic útjának aktivációja során olyan fehérjék szabadulnak fel a mitokondrium intermembrán teréből, melyek fontos szerepet töltenek be a sejtpusztulás folyamatában. Az egyik ilyen fehérje a citokróm c, melynek a citoplazmába történő kijutása szükséges az apoptozóma kialakulásához, illetve ezt követően az iniciátor kaspáz-9 és az effektor kaspáz-3 fehérjék aktivációjához. Normál körülmények között

a kaszpázok inaktív formában vannak jelen a sejtben, hasítással történő aktivációjukat pro-apoptotikus hatások váltják ki (Würstle és mtsai, 2012). A p143p53PC12 sejtvonalon korábban detektálható és erőteljesebb volt a citokróm c-felszabadulás, mint PC12 sejtekben (*11.a ábra*). Az anti-apoptotikus Bcl-2 és Bcl-xL fehérjék esetén mennyiségi különbség volt megfigyelhető a két sejtvonál között; mindkét fehérje alacsonyabb koncentrációban volt kimutatható a mutáns p53 fehérjével rendelkező sejtekben (*11.a ábra*). Apoptózist kiváltó hatások következtében a kaszpáz-9 fehérjének két hasított formája is létrejön, a 38 kDa nagyságú forma tartalmaz egy ún. prodomént, ami a 17 kDa-os termékből már hiányzik. Az SNP nagy koncentrációban (200 és 400 μM) történő alkalmazásakor a kaszpáz-9 hasított alakja megjelent PC12 sejtekben; a p143p53PC12 sejtvonalon kisebb SNP-dózisok is kaszpáz-9-aktivációt váltottak ki. A kaszpáz-3 hasított formájának megjelenése csak toxikus SNP-dózis (400 μM) alkalmazását követően volt megfigyelhető (*11.b ábra*). A kaszpáz-9 és -3 fehérjék hasítása mindkét sejtvonalon 8 órás, 400 μM SNP-vel végzett kezelést követően volt a legerőteljesebb, azonban p143p53PC12 sejtekben mindkét kaszpáz aktivációja fokozottabb és tartósabb volt (*11.c ábra*).

7. 400 μ M SNP-kezelést követően nem figyelhető meg a p53 fehérje sejtmagba történő transzlokációja

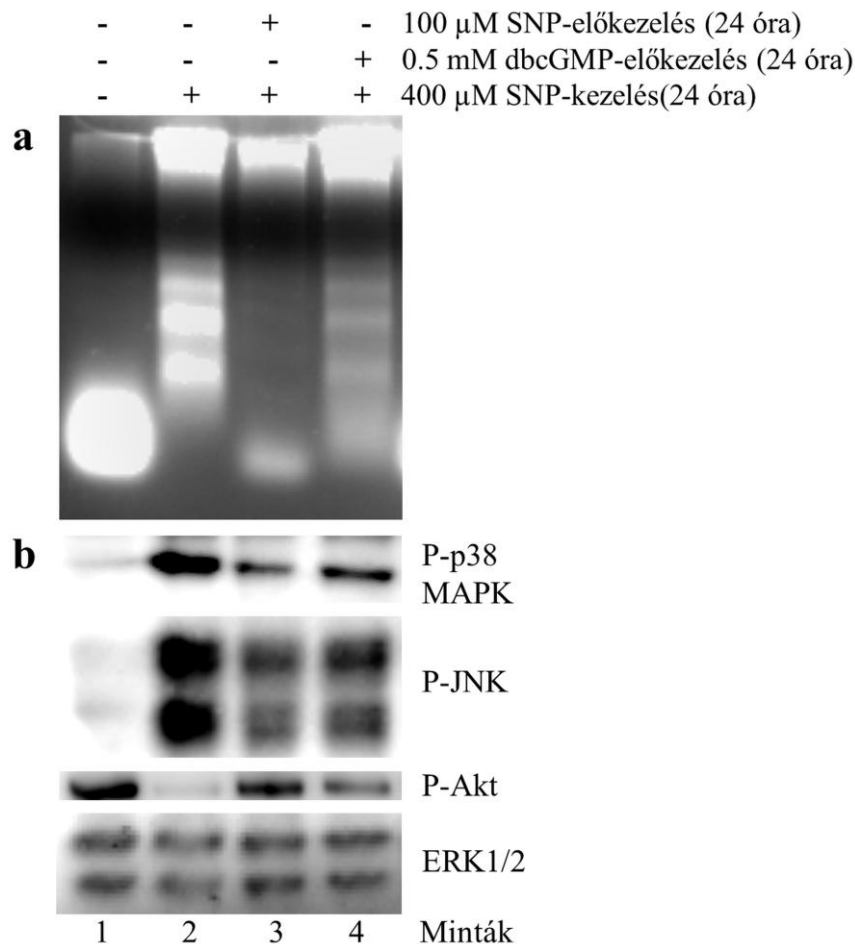


12. ábra: A p53 fehérje (zöld) lokalizációjának és a citokróm c (piros) felszabadulásának vizsgálata 2 órás SNP-kezelést követően, (1a-h) vad típusú PC12 és (2a-h) p143p53PC12 sejtekben. A kezeltelen (a-d) és a 400 μ M SNP-vel 2 óráig kezelt (e-h) sejteket fixáltuk, permeabilizáltuk, majd a kívánt elsődleges és másodlagos antitestekkel inkubáltuk. A mintákról lézer scanning konfokális mikroszkóppal készítettünk fotókat. Az ábrán (a, e) Hoechst 33342 fluoreszcens festékkel festett sejtmagok, valamint (b, f) a p53 és (c, g) a citokróm c fehérjék sejten belüli elhelyezkedése látható. (d, h) Az előző három kép egymásra vetítéséből keletkezett felvétel. Az ábrák bal felső sarkában látható skála hossza 10 μ m.

A p53 fehérje 400 μ M SNP-kezelést követő intracelluláris elhelyezkedését immuncitokémia segítségével vizsgáltuk. Annak ellenére, hogy 400 μ M SNP-vel történő 2 órás kezelés után már kimutatható a p53 fehérje foszforilációja (9.b és c ábrák), valamint a citokróm c mitokondriumból történő felszabadulása (11.a ábra), a

mikroszkópos felvételeken nem volt megfigyelhető a p53 fehérje sejtmagi transzlokációja 2 (12. ábra) vagy 8 órás kezelés után; e tekintetben a két vizsgált sejtvonal nem mutatott különbséget.

8. Kis dózisu SNP-előkezeléssel csökkenthető a 400 μ M SNP-kezelés apoptotikus hatása PC12 sejtekben



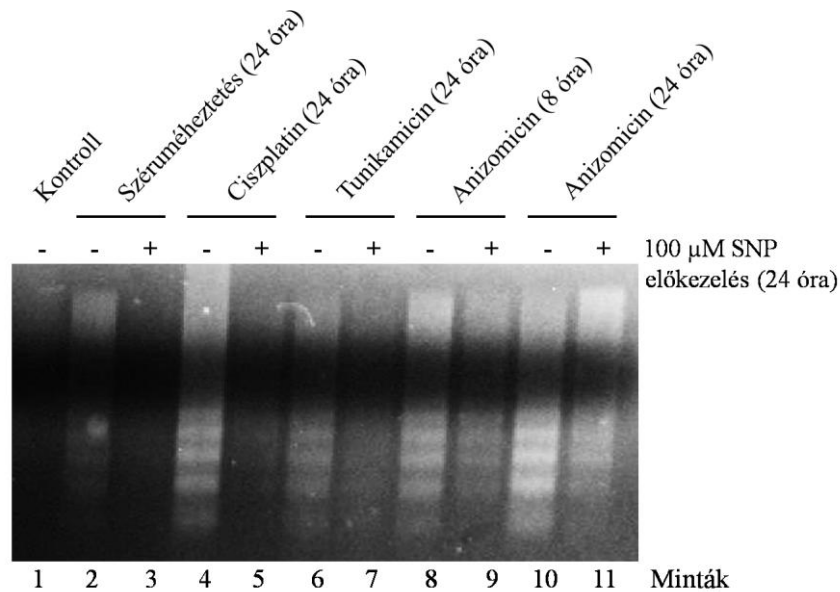
13. ábra: 400 μ M SNP pro-apoptotikus hatásának részleges kivédése 100 μ M SNP- és dbcGMP-előkezelésekkel. PC12 sejteket 400 μ M SNP-vel kezeltünk, a kezelést a minták egy részében 100 μ M SNP- vagy 0,5 mM dbcGMP-előkezelés előzte meg. (a) DNS-izolálást követő agaróz gélelektroforézissel és etídium-bromid festéssel vizsgáltuk az internukleoszómális DNS-fragmentáció mértékét. (A kontrollban látható vastag csík RNS-szennyeződésre utal.) (b) Fehérje-izolálást követően Western blottal határoztuk meg a stressz kináz-aktiváció és az Akt-foszforiláció mértékét (anti-P-p38MAPK, anti-P-JNK és anti-P-Akt antitestek segítségével).

A programozott sejthalál folyamatának egyik jellegzetessége a sejtmagi DNS internukleoszómális fragmentációja, melyet kaspázok által aktivált DNáz molekulák

(CAD) hajtanak végre (McIlroy és mtsai, 1999). 400 μ M SNP-vel történő 24 órás kezelés DNS-fragmentációt okozott PC12 sejtekben (*13.a ábra, 2. minta*). Az SNP-indukálta DNS-fragmentáció mértéke csökkenthető volt 24 órán át tartó, kis dózisu (100 μ M) SNP- vagy 0,5 mM dbcGMP-előkezeléssel (*3. és 4. minták*). (100 μ M SNP nem citotoxikus PC12 sejtekben.)

Stressz kinázok (JNK és p38MAPK) tartós aktivációja a sejt apoptózissal történő elpusztulását eredményezheti (Azijli és mtsai, 2013). 24 órán keresztül tartó 400 μ M SNP-kezelést követően erőteljes JNK- és p38MAPK-foszforiláció volt detektálható PC12 sejtekben (*13.b ábra, 2. minta*). Mindkét stressz kináz foszforilációjának mértékét csökkentette a 100 μ M SNP-, illetve a 0,5 mM dbcGMP-előkezelés (*3. és 4. minták*). Az Akt fehérje aktív, foszforilált állapotában elősegíti a sejtek túlélését és proliferációját (Asati és mtsai, 2016); apoptózist kiváltó hatások mérséklék az Akt-foszforilációt, ilyen hatás a 400 μ M SNP is (*13.b ábra, 2. minta*). 100 μ M SNP- vagy 0,5 mM dbcGMP-előkezeléssel az Akt-foszforiláció csökkenése kevésbé jelentős PC12 sejtekben (*3. és 4. minták*).

9. A 100 μ M SNP-előkezelés mérsékli a széruméheztetés, ciszplatin-, tunikamicin- és anizomicin-kezelések által kiváltott internukleoszómális DNS-fragmentációt

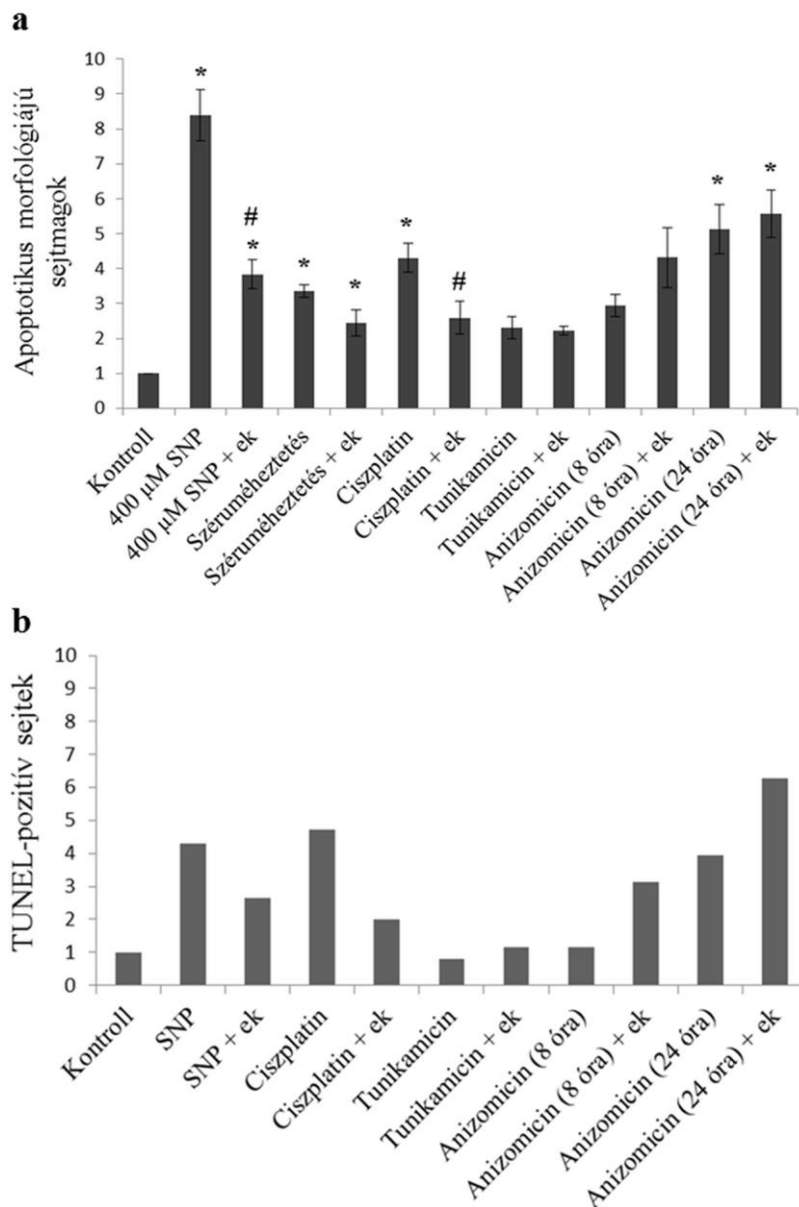


14. ábra: Toxikus kezelések pro-apoptotikus hatásának mérséklése kis dózisu SNP-előkezeléssel PC12 sejtekben. A sejtek növekedési faktor-megvonáson, valamint ciszplatin-, anizomicin- vagy tunikamicin-kezelésen mentek át, amit a minták felében 100 μ M SNP-vel végzett előkezelés előzött meg. A kezelések által előidézett DNS-fragmentáció mértékét agaróz gélben végzett elektroforézist és etidium-bromid festést követően detektáltuk.

Széruméheztetés során a növekedési faktorok megvonása miatt a sejtek a sejtciklus G_0 fázisába kerülnek; amennyiben a szérummegvonás huzamosabb ideig fennáll, a sejtek apoptózissal elpusztulnak (Arthur és mtsai, 2006; Ferriere és mtsai, 2013; Pap és Szeberényi, 2008). A ciszplatin kemoterápiában alkalmazott vegyület, mely a purin bázisokhoz kötődve keresztkötéseket hoz létre a DNS két lánc között, ezáltal a tumor sejtek elpusztulását eredményezve (Dasari és Tchounwou, 2014; Siddik, 2003). A tunikamicin nevű antibiotikum az N-kötésű glikozilációt gátolja, így ER stresszt okoz (Balogh és mtsai, 2014; Price és Tsvetanova, 2007), míg az anizomicin a transzláció gátlása révén eredményez apoptózist (Chatfield és Eastman, 2004; Töröcsik és Szeberényi, 2000). A felsorolt kezelések mindegyike pro-apoptotikus hatású, tehát internukleoszómális DNS-fragmentációt okoz PC12 sejtekben (14. ábra, 2., 4., 6., 8. és 10. minták). 100 μ M SNP-előkezeléssel kivédhető volt a széruméheztetéssel, valamint a ciszplatin- és tunikamicin-kezelésekkel kiváltott DNS-fragmentáció (3., 5., és 7.

minták); azonban az anizomicin-kezeléssel kiváltott DNS-darabolódás mértékét csak kevésbé csökkentette az SNP-előkezelés (9. és 11. *minták*).

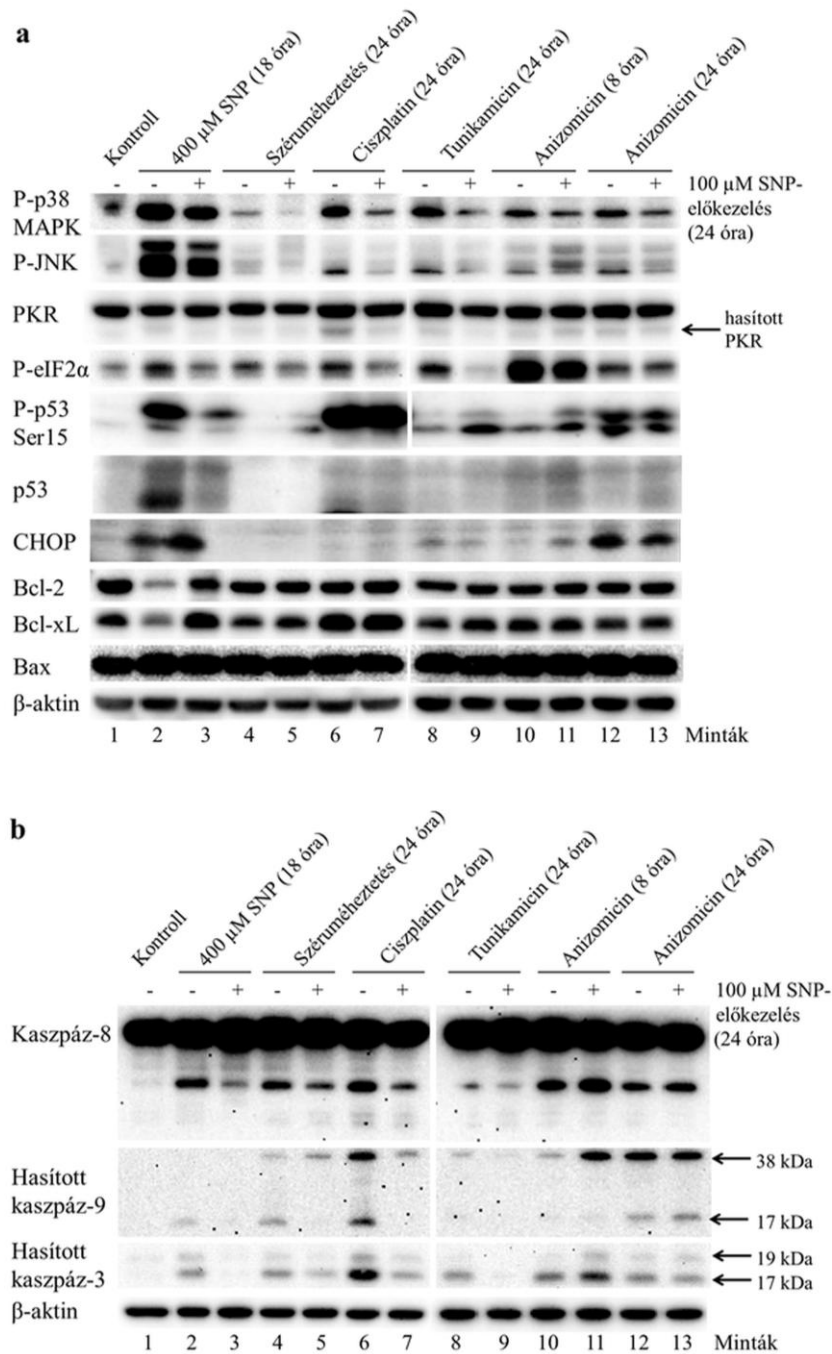
10. 100 μ M SNP-előkezelés csökkenti egyes kezelések pro-apoptotikus hatását



15. ábra: Kis koncentrációjú SNP-előkezelés részlegesen protektív hatásának vizsgálata PC12 sejtekben, fluoreszcens DNS-festést követően. Apoptózist kiváltó kezeléseket megelőzően a minták felében a sejtek 100 μ M SNP-előkezelést kaptak. Ezt követően a sejteket fixáltuk és permeabilizáltuk, majd a sejtmagok fluoreszcens festését követően (a) apoptózisra jellemző morfológiájú, illetve (b) hasított DNS-molekulákat tartalmazó sejtmagokat kerestünk fluoreszcencia/konfokális mikroszkóp segítségével. *A kontrolltól szignifikánsan különböző minták. #Azok a minták, melyek szignifikánsan különböznek az előkezelésen át nem esett mintáktól. ($p < 0,05$)

PC12 sejteket 400 μM SNP-vel kezelve a sejtek többsége apoptózissal elpusztult (Bátor és mtsai, 2012, 2013; Varga és mtsai, 2014, 2016); ezt tükrözi az is, hogy a nagy dózisú SNP-kezelésen átment mintákban nagy számban voltak jelen apoptotikus magmorfológiájú (erősen kondenzált és fragmentálódott kromatin-állománnyal rendelkező) és sok helyen hasított DNS-t tartalmazó sejtek. Az említett elváltozások mértéke csökkenthető volt 100 μM SNP előkezeléssel (*15.a és b ábrák*). Hasonlóképpen, a 100 μM SNP-előkezelés csökkentette a szérumeheztetéssel és ciszplatin-kezeléssel kiváltott kromatin-kondenzáció és DNS-fragmentáció mértékét, míg tunikamicin-kezelés esetén nem volt jelentős különbség az előkezelt/nem előkezelt minták között. Azonban az SNP-előkezelést követően végzett anizomicin-kezelés után nagyobb számban voltak a mintákban apoptózisra jellemző morfológiájú sejtmagok, mint az előkezelés nélküli mintákban (*15.a és b ábrák*).

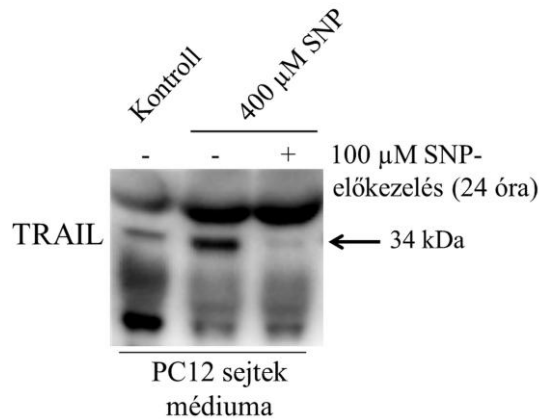
11. A kis dózisú SNP-előkezelés mérsékelheti a különféle, apoptózist okozó kezelések által előidézett fehérje-foszforilációt és kaspáz-aktivációt



16. ábra: Fehérje-aktiváció és kaspáz-hasítás vizsgálata 100 μ M SNP-előkezelés/citotoxikus kezelés kombinációkat követően. PC12 sejteket széruméheztetésnek vagy pro-apoptotikus hatású kezeléseknek (SNP, ciszplatin, tunikamicin, anizomicin) tettünk ki, az esetek felében nem toxikus dózisú SNP-előkezeléssel kombinálva. A kezelési idő leteltét követően az izolált fehérjékkal Western blot vizsgálatot végeztünk (a) fehérje-foszforilációs és mennyiségi változások és (b) kaspáz-aktiváció meghatározása céljából, az ábrán feltüntetett fehérjékre specifikus antitestek segítségével. A β -aktin fehérjét töltési kontrollként használtuk.

400 μM SNP-vel történő kezelés következtében számos olyan fehérje aktivációja megfigyelhető, melyek az apoptózis folyamatában fontos szerepet töltenek be, ilyenek a stressz kinázok, a PKR, az eIF2 α , a p53, a CHOP és a kaszpáz fehérjék; emellett megfigyelhető az anti-apoptotikus Bcl-2 és Bcl-xL fehérjék mennyiségének csökkenése is, szintén hozzájárulva a sejtpusztuláshoz (Varga és mtsai, 2014). 100 μM SNP-előkezelés mérsékelte a fent említett fehérje-aktivációs változások mértékét, illetve gátolta a Bcl-2 és Bcl-xL fehérjék mennyiségének csökkenését (*16.a és b ábrák, 2. és 3. minták*). Egyetlen kivételként a CHOP transzkripciós faktor említhető, melynek indukcióját fokozta az előkezelés. Hasonlóképpen, a széruméheztetéssel és ciszplatin- vagy tunikamicin-kezelésekkel kiváltott p38MAPK- és eIF2 α -foszforiláció, valamint PKR- és kaszpáz-hasítás mértéke is csökkenthető volt a kis koncentrációjú SNP-előkezeléssel (*4., 6. és 8. mintákat összehasonlítva az 5., 7. és 9. mintákkal*). Ezzel szemben a ciszplatin-indukálta p53-foszforiláció erősségét nem csökkentette az előkezelés (*6. és 7. minták*); továbbá a kezelés/előkezelés kombinációk nem változtatták még érdemben a pro-apoptotikus Bax és az anti-apoptotikus Bcl-2/Bcl-xL fehérjék mennyiségét (*lásd 4-13. minták*) (kivéve a korábban említett 400 μM SNP-vel történő kezelést). A többi hatással ellentétben az előkezeléssel kombinált anizomicin-kezelés fokozta a JNK és a p53 fehérjék foszforilációját, megemelte a p53 és a CHOP fehérjék mennyiségét, valamint fokozta a kaszpáz-aktivációt is (*10-13. minták*).

12. 100 μ M SNP-előkezelés csökkenti a sejttenyésztő médiumban található TRAIL-molekulák mennyiségét



17. ábra: TRAIL kimutatása PC12 sejtek médiumából, SNP-kezelést követően. 400 μ M SNP-kezelés után, 100 μ M SNP-előkezelést követően vagy annak hiányában eltávolítottuk a sejtek szövettényésztő folyadékát, melyből anti-TRAIL antitest segítségével végzett Western blot analízissel mutattuk ki a TRAIL fehérjét.

A nagy koncentrációval történő SNP-kezelés az intrinsic út aktiválásával vált ki apoptózist az érintett sejtekben (Hirst és Robson, 2010); a sejthalál a reaktív nitrogén származékok (peroxinitrit) fokozott képződésének, a DNS károsodásának és a nitrozatív stressznek a következménye (Kavdia, 2011; Lin és mtsai, 2000; Liu és Martin, 2001). 400 μ M SNP azonban a jellemzően az intrinsic apoptózis jelátvitelben szerepet játszó kaszpáz-9 mellett a főként az extrinsic úton aktiválódó kaszpáz-8 aktivációját is előidézte (16.b ábra). Ez utóbbi jelpályát olyan ligandok aktiválják, melyek hatásukat sejtfelszíni receptorokhoz kötődve fejtik ki (lásd Bevezetés). A TRAIL egy membránfehérje, mely sejtfelszíni receptoraihoz (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5) kötődve képes beindítani az apoptózis extrinsic útját, illetve a Bid fehérje hasítása révén az intrinsic apoptózis jelátvitelt is aktiválhatja (Mohr és mtsai, 2015); emellett jelen lehet a sejtekről lefűződő exoszómákban/mikrovezikulákban is (Rivoltini és mtsai, 2016).

PC12 sejtek szövettényésztő folyadékában 400 μ M SNP hatására megnőtt a TRAIL fehérje 34 kDa molekulatömegű formájának mennyisége; a nagy dózisú SNP-kezelést 100 μ M SNP-előkezeléssel kombinálva ez a jelenség nem volt megfigyelhető (17. ábra).

V. Megbeszélés

1. Nitrozatív stressz

A NO egy rövid fél-életidejű, gáz halmazállapotú neurotranszmitter (Kang és mtsai, 2004), mely számos fiziológiás és patológiás folyamatban is fontos szerepet tölt be. A NO és az általa aktivált cGMP/PKG-jelátviteli út közreműködik a vazodilatációban és ezáltal a vérnyomás csökkentésében (Kang és mtsai, 2004), a sejtostódásban (Pilz és Casteel, 2003), a thrombocytá-aggregációban (Martínez-Ruiz és mtsai, 2011), valamint kardioprotektív szereppel bír (Penna és mtsai, 2014). A NO kis koncentrációban elősegítheti a sejt túlélését a kaszpázok S-nitrozilációja, a *bcl-2* gén expressziójának és a CREB fehérje foszforilációjának fokozása, valamint a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K)/Akt-út aktivációja révén (Kang és mtsai, 2004; Leon és mtsai, 2008; Pilz és Casteel, 2003). A NO fiziológiás feladatai közé tartozik az idegrendszerben a szinapszisok működésének szabályozása, illetve a tanulás/memória folyamatainak elősegítése (CREB által szabályozott gének expressziójának fokozása révén) (Bradley és Steinert, 2016; Nakamura és mtsai, 2015).

A NO nagy mennyiségben citotoxikus (Leon és mtsai, 2008; Thomas és mtsai, 2008); sejt-károsító hatását azonban nem közvetlenül fejt ki. Szabadgyökökkel (például szuperoxiddal) reagálva reaktív nitrogén származékok (például peroxinitrit) képződnek belőle (Leon és mtsai, 2008; Martínez-Ruiz és mtsai, 2011; Mocellin és mtsai, 2007). Amennyiben a különféle reaktív oxigén és nitrogén származékok (az angol kifejezések rövidítése ROS, illetve RNS) szintje jelentősen megemelkedik, a sejtben oxidatív/nitrozatív stressz alakul ki. A reaktív oxigén és nitrogén származékok két csoportba oszthatóak. Az ún. elsődleges ROS/RNS-molekulák (például NO, szuperoxid, hidrogén-peroxid) kevésbé károsak, fiziológiás szerepük az intracelluláris jelátvitel szabályozása. Ezzel szemben a másodlagos ROS/RNS-molekulák többféle szabadgyök együttes jelenléte esetén képződnek, képesek makromolekulákat károsítani, oxidatív/nitrozatív stresszt kiváltani; ilyen vegyületek például a peroxinitrit és a hidroxil-szabadgyök (Weidinger és Kozlov, 2015). A NO szuperoxiddal történő reakciójának eredményeképpen peroxinitrit képződik, mely oxidáció illetve nitráció révén károsíthatja a lipideket, fehérjéket és a DNS-t is (Pacher és mtsai, 2007; Szabó és mtsai, 2007). A peroxinitrit lipid-peroxidációt okoz, valamint a fehérjék tirozin

aminosavaihoz irreverzibilisen kötődve azok nitrációját idézi elő, ezáltal többnyire inaktíválva az érintett fehérjéket (Pacher és mtsai, 2007; Weidinger és Kozlov, 2015). A peroxinitrit a sejtben számos fehérjéhez kapcsolódhat, példaként említhetők az átmenetifémeket tartalmazó proteinek (hemoglobin, mioglobin, citokróm c, NOS-izofomák) (Pacher és mtsai, 2007; Szabó és mtsai, 2007). A peroxinitrit a légzési lánc tagjait irreverzibilisen képes károsítani (Kang és mtsai, 2004; Martínez-Ruiz és mtsai, 2011). Ismert a peroxinitrit DNS-károsító hatása is: mind a bázisokat (elsősorban a guanint), mind a cukor-foszfát gerincet károsíthatja, egyes láncú DNS-töréseket okozhat, inaktíválhatja a DNS-repair-ben közreműködő enzimeket valamint a p53 fehérjét (Burney és mtsai, 1999; Pacher és mtsai, 2007; Szabó és mtsai, 2007).

A sejtben képződő NO hatását nemcsak szabadgyökök létrehozása révén, hanem fehérjékhez kovalensen kötődve is kifejtheti. E poszttranszlációs fehérje-módosításnak két fő típusa ismert. Az egyik a tirozin aminosav(ak) irreverzibilis nitrációja (vagy más néven 3-nitrotirozináció), mely általában peroxinitrit közvetítésével valósul meg és káros hatású (lásd az előző bekezdésben). A másik az S-nitroziláció, melynek során a NO reverzibilisen kapcsolódik az érintett fehérjében található cisztein aminosav(ak)hoz. Ennek következményeképpen megváltozhat a fehérje aktivitása, lokalizációja és más fehérjékkel való kölcsönhatása is; 1000-nél több olyan fehérje ismert emlős sejtekben, melyek S-nitroziláció célpontjai lehetnek (Benhar, 2015; Bradley és Steinert, 2016; Halloran és mtsai, 2013; Nakamura és mtsai, 2015; Nakamura és Lipton, 2016; Penna és mtsai, 2014). A kaszpázok aktív centrumában található cisztein aminosav S-nitrozilációja gátló hatású, ezáltal elősegítve a sejt túlélést, míg a kaszpázokat gátló XIAP fehérjét érintő S-nitroziláció a XIAP gátlása révén apoptózist vált ki; az utóbbi kimutatható számos betegségben (Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór). Szintén sejtpusztulást okoz a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) S-nitrozilációja (Nakamura és mtsai, 2015). Az Akt fehérje S-nitrozilációja gátolja a sejtek túlélését, míg a PTEN fehérje S-nitrozilációja segíti azt (Penna és mtsai, 2014). Alacsony NO-szint esetén az S-nitrozilációnak fiziológias szabályozó szerepe van; ezzel szemben a NO-koncentráció megnövekedése miatt kialakuló nitrozatív stressz abnormális S-nitroziláció és nitráció révén gyakran káros hatású a sejtre nézve, ezáltal hozzájárulhat neurodegeneratív betegségek kialakulásához (Bradley és Steinert, 2016). Tartós és fokozott NO-termelés következtében olyan fehérjék S-nitrozilálódnak, melyek

alacsony/fiziológiás NO-koncentráció esetén nem, például a GAPDH, a PDI és a XIAP (Nakamura és Lipton, 2016).

2. Mutáns p53 fehérjék és lehetséges szerepük az apoptózisban

A p143p53PC12 sejtvonal olyan domináns gátló mutáns p53 fehérjét termel, mely a 143-as pozícióban valin helyett alanin aminosavat tartalmaz (V143A) (Fábián és mtsai, 2006). A mutáció a fehérje DNS-kötő doménjét érinti, azonban nem tartozik a daganatokban leggyakrabban mutációt szenvedő, ún. „hot spot” helyek közé. A p53 fehérje tetramer formában képes a DNS-hez kötődni (Beckerman és Prives, 2010); amennyiben a tetramerben V143A-mutáns p53 is található, a vad típusú p53 sem képes szekvencia-specifikusan kötődni a DNS-hez. A vad típusú és a V143A-mutáns p53 fehérjék eltérő affinitással és specificitással kötődnek a DNS-hez, utóbbi fehérje DNS-kötő képességét és transzkripciós aktivitását a hőmérséklet is befolyásolja (Friedlander és mtsai, 1996; Wong és mtsai, 1999; Zhang és mtsai, 1994). Ismert jelenség, hogy a különféle mutáns p53 fehérjék is képesek a DNS-hez kapcsolódni; ilyen esetekben azonban a kötődés szerkezet-specifikus módon valósul meg (nem ismert olyan DNS-szekvencia ugyanis, melyhez a mutáns p53 fehérjék specifikusan kötődnének) (Freed-Pastor és Prives, 2012). Ellentétben a vad típusú p53 fehérje tumor szuppresszor funkciójával, a mutáns p53 fehérjék gyakran fokozzák a sejttúlélést és a sejtosztódást (Kim és Deppert, 2004), mivel a vad típusú és a mutáns fehérjék eltérő gének expresszióját szabályozzák (Mirzayans és mtsai, 2012; Ray és mtsai, 2012). A szóban forgó gének terméke lehet multidrog-transzporter, valamint növekedési faktor-receptorok (VEGF- és EGF-receptorok); ezen fehérjék mindegyike túlműködhet daganatokban (Menon és Povirk, 2014). Emellett a mutáns p53 fehérjék kötődhetnek a p63 és p73 fehérjékhez, inaktiválva azokat (Ferraiuolo és mtsai, 2016). Bár a DNS-kötő doménben található mutáció(k) következtében a mutáns p53 fehérjék gyakran nem képesek a vad típusú p53 által szabályozott gének expresszióját befolyásolni, transzkripció-független mechanizmusok révén mégis képesek apoptózist indukálni (Green és Kroemer, 2009; Kakudo és mtsai, 2005).

3. A NO serkenti az intrinsic apoptózis-jelátvitelt PC12 sejtekben

A PC12 sejtek nitrozatív stressz indukálta apoptózisában közreműködő jelátviteli mechanizmusok vizsgálata során SNP-t használtunk NO-donorként. Az SNP nagy koncentrációban (400 μ M) apoptózist okozott vad típusú PC12 és mutáns p53 fehérjével rendelkező p143p53PC12 sejtekben (6-11. ábrák).

A NO főként a belőle képződő peroxinitrit DNS-károsító hatása révén okoz sejtpusztulást (Szabó és mtsai, 2007). A DNS-károsodás következtében foszforilálódik a p53 fehérje; a szerin-15 foszforilációja a fehérje stabilizációjához vezet (Saha és mtsai, 2015), míg a szerin-46-ot érintő foszforiláció elősegíti a p53 mitokondriális transzlokációját és az apoptózist (Comel és mtsai, 2014). 400 μ M SNP-kezelést követően a p53 fehérje mindkét említett aminosavon foszforilálódott, valamint (stabilizáció következtében) emelkedett a fehérje mennyisége is (9. ábra). A p53 fehérje egyrészt képes fokozni a Bcl-2 család pro-apoptotikus tagjait (például Bax, Puma, Noxa) kódoló gének expresszióját (Beckerman és Prives, 2010; Mihara és mtsai, 2003; Surget és mtsai, 2013), másrészt transzkripció-független mechanizmussal is hozzájárulhat az apoptózishoz (Haupt és mtsai, 2003; Green és Kroemer, 2009; Speidel, 2010). Utóbbi esetben a p53 „BH3-only” fehérjeként viselkedve (Bax/Bak aktivációja és Bcl-2/Bcl-xL gátlása révén) segíti elő a mitokondrium külső membránjának permeabilizálását és ennek következtében a citokróm c és más pro-apoptotikus hatású fehérjék felszabadulását a mitokondrium intermembrán teréből (Green és Kroemer, 2009; Park és mtsai, 2005; Vaseva és Moll, 2009, Comel és mtsai, 2014; Wang és mtsai, 2014). A citokróm c molekulák citoplazmába jutását követően megtörténik a kaspáz-9, majd a kaspáz-3 fehérjék aktivációja, ami a sejt apoptózissal történő elpusztulását vonja maga után (Würstle és mtsai, 2012). 400 μ M SNP-kezelést követően detektálható volt a citokróm c kijutása a mitokondriumból (11.a ábra), valamint a kaspáz-9 és kaspáz-3 fehérjék aktivációja is (11.b és c ábrák). Ezen eredmények alapján az SNP és a belőle felszabaduló NO az apoptózis intrinsic (vagy más néven mitokondriális) útját serkentve okoz apoptózist PC12 sejtekben.

4. A p143p53PC12 sejtvonala érzékenyebben reagál a NO toxikus hatására

400 μ M SNP sejtpusztulást okozott vad típusú PC12 és p143p53PC12 sejtekben is, azonban a mutáns p53 fehérjével rendelkező sejtek érzékenyebbek voltak az SNP citotoxikus hatására (6. ábra). A vizsgált jelátviteli fehérjék aktivációját és mennyiségét érintő változások mindegyike kifejezettebb és/vagy tartósabb volt a p143p53PC12 sejtvonalaiban (7-11. ábrák). A V143A-mutáns p53 fehérjét expresszáló sejtekben hamarabb bekövetkezett a p53-foszforiláció és a p53-szint emelkedése is (9.b és c ábrák), valamint gyorsabban történt meg a citokróm c felszabadulása a mitokondriumból (11.a ábra). Ezzel az eredménnyel egybevégezően a két sejtvonala között eltérés mutatkozott a kaszpáz-9 és -3 fehérjék hasításának időbeli lefutásában és erősségében is: p143p53PC12 sejtekben hamarabb kezdődött, tartósabb és fokozottabb volt a kaszpáz-aktiváció (11.c ábra). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a p143p53PC12 sejtvonala azért reagál érzékenyebben az SNP-kezelésre, mert ezekben a sejtekben az intrinsic apoptózis út erőteljesebben aktiválódik, mint vad típusú PC12 sejtekben.

A p53 fehérje 46-os pozíciójában található szerin aminosav foszforilációja elősegíti a p53 mitokondriális transzlokációját (Giorgi és mtsai, 2016), a szerin-46 foszforilációjára a stressz kináz p38MAPK is felelős lehet (Saha és mtsai, 2012). Más adatok szerint a p53 mitokondriumba jutását a szerin-15 foszforilációja is elősegítheti (Park és mtsai, 2005). A p143p53PC12 sejtvonalaiban korábban következett be erőteljes p38MAPK-aktiváció (7.b ábra) és a p53 fehérje szerin-46 foszforilációja (9.b ábra), mint vad típusú PC12 sejtekben. Vagyis a V143A-mutáns p53 fehérjével rendelkező sejtekben korábban és hatékonyabban következhetett be a p53 mitokondriális transzlokációja; ez lehet az egyik mechanizmus, mely a p143p53PC12 sejtvonala fokozott NO-érzékenységének hátterében áll.

A p53 fehérje nemcsak génindukciót, hanem repressziót is kiválthat; a *bcl-2* gén expressziójának gátlását indirekt módon, a TATA-kötő fehérjéhez (TBP) kapcsolódva hajtja végre (Böhlig és Rother, 2011; Wu és mtsai, 2001). A p53-TBP kapcsolat a p53 fehérje N-terminálisán található transzaktivációs vagy a C-terminális részét képező oligomerizációs domén közreműködésével valósul meg (Gridasova és Henry, 2005; Horikoshi és mtsai, 1995); vagyis nem szükséges hozzá a DNS-kötő domén, mely a V143A-mutáns p53 fehérje esetében a pontmutációt tartalmazza. Vad típusú PC12

sejtekkel összehasonlítva a p143p53PC12 sejtvonal SNP-kezelés hiányában is kisebb mértékben expresszálta a Bcl-2 fehérjét, a 400 μ M SNP-kezelés időtartamának növelésével tovább csökkent a sejtekben a Bcl-2 szintje (10.a és b ábrák). Lehetséges, hogy a V143A-mutáns p53 fehérjék képesek – akár indirekt módon is – gátolni a Bcl-2 expresszióját, ezáltal fokozottan érzékennyé téve a p143p53PC12 sejtvonalat a NO toxikus hatásával szemben.

A mutáns p53 fehérjével rendelkező sejtek NO-dal szembeni fokozott érzékenységéhez hozzájárulhat az is, hogy a NO által kiváltott ER stressz (Gotoh és Mori, 2006) következtében indukálódik a CHOP transzkripciós faktor (Darling és Cook, 2014; Sovolyova és mtsai, 2014), mely szintén képes represszálni a *bcl-2* gént (Gotoh és Mori, 2006; Sekine és mtsai, 2006; Sovolyova és mtsai, 2014). Ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelés, hogy p143p53PC12 sejtekben a 400 μ M SNP-kezelés erőteljes CHOP-indukciót váltott ki; míg ez vad típusú PC12 sejtekben jóval kevésbé volt kifejezett (7.d ábra).

5. 100 μ M SNP-előkezelés csökkenti egyes pro-apoptotikus hatások erősségét

Az SNP, a belőle felszabaduló NO és az abból képződő peroxinitrit PC12 sejtek mellett más sejtvonalakban is apoptózist vált ki (Pacher és mtsai, 2007); az egyes sejtípusok NO-érzékenysége azonban eltérő lehet. PC12 sejtekben már 400 μ M SNP is sejtpusztulást okoz, RAW264 egér makrofág sejtekben az ehhez szükséges koncentráció 4 mM (Yoshioka és mtsai, 2006). 4 mM SNP-kezelés hatására RAW264 sejtekben foszforilálódik a p38MAPK, illetve konformáció-változáson megy át és a mitokondriumhoz transzlokálódik a Bax fehérje, előidézve a citokróm c felszabadulását a mitokondriális intermembrán térből. Mindezek a folyamatok gátolhatóak, ha a nagy koncentrációjú SNP-kezelést megelőzően a sejtek 100 μ M SNP- vagy 0,5 mM dbcGMP-előkezelést kapnak (Yoshioka és mtsai, 2006).

PC12 sejtekben 400 μ M SNP apoptózist váltott ki; ez együtt járt a DNS internukleoszómális darabolódásával és számos fehérje aktivitásának/mennyiségének megváltozásával (Bátor és mtsai, 2013; Varga és mtsai, 2014). 100 μ M SNP vagy 0,5 mM dbcGMP előkezelésként történő alkalmazása részben gátolta a fent említett változásokat PC12 sejtekben (Varga és mtsai, 2016): mindkét előkezelés mérsékelte az SNP által kiváltott internukleoszómális DNS-fragmentációt (13.a ábra), a stressz

kinázok aktivációját, valamint az Akt-foszforiláció csökkenését (*13.b ábra*). Ezek alapján valamely, a NO kis koncentrációja által aktivált jelátviteli út/mechanizmus sejttúlélést serkentő/sejtpusztulást gátló hatása érvényesül az előkezelés következtében.

Annak eldöntésére, hogy a 100 μ M SNP-előkezelés képes-e az apoptózis általános érvényű gátlására, PC12 sejteket egyéb apoptózist kiváltó hatásoknak (széruméheztetés, kezelés ciszplatinnal, tunikamicinnel vagy anizomicinnel) tettünk ki. Széruméheztetés esetén a szérumban található növekedési faktorok megvonása miatt a sejtek G_0 fázisba kerülnek, amennyiben ez az állapot tartós, a sejtek elpusztulnak (Ferriere és mtsai, 2013). A ciszplatin egy citosztatikum, mely a DNS purin bázisai között keresztkötéseket hoz létre, emellett képes oxidatív stresszt is előidézni (Dasari és Tchounwou, 2014; Siddik, 2003). A képződő reaktív oxigén-származékok képesek az extrinsic és az intrinsic apoptózis jelátvitelt is aktiválni (Dasari és Tchounwou, 2014). A tunikamicin nevű antibiotikumokat *Streptomyces* baktériumok termelik; ezek a vegyületek az N-kötésű glikozilációt gátolva ER stresszt váltanak ki, melynek tartós fennállása sejthalált okoz (Balogh és mtsai, 2014; Price és Tsvetanova, 2007). Az anizomicin gátolja a peptidkötések kialakulását, ezáltal a fehérjeszintézis folyamatát, így módon pro-apoptotikus hatással bír (Törőcsik és Szeberényi, 2000). Hasonlóan az SNP-kezeléshez, a fent említett hatások mindegyike képes aktiválni az apoptózis intrinsic útját.

100 μ M SNP-vel végzett előkezelés alkalmazásakor kevésbé erőteljes DNS-fragmentációt detektáltunk szérummegvonást, illetve ciszplatin-, vagy tunikamicin-kezelést követően, mint SNP-előkezelés hiányában (*14. ábra*). Más apoptózis-detektáló technikák (magmorfológia vizsgálata és TUNEL-módszer) hasonló eredményre vezettek: az előkezelés csökkentette az SNP, széruméheztetés és ciszplatin által indukált apoptózis mértékét; tunikamicin-kezelés esetén az előkezelés hatása nem volt jelentős (*15.a és b ábrák*). Western blot vizsgálatok eredményei alapján azonban nem kaptunk egységes képet arról, hogy az alacsony koncentrációjú SNP-előkezelés milyen mechanizmussal képes az apoptózis részleges kivédésére (*16.a és b ábrák*). Hasonlóan Yoshioka és munkacsoportja (2006) eredményeihez, a 100 μ M SNP-előkezelés csökkentette a 400 μ M SNP, széruméheztetés, ciszplatin és tunikamicin által kiváltott p38MAPK-foszforiláció mértékét (*16.a ábra*). Ez vezethetett a kaspáz-9 és -3 fehérjék aktivációjának és következésképpen a sejtpusztulás mértékének csökkenéséhez (*16.b*

ábra). A pontos mechanizmus azonban, mely az előkezelést követően az apoptózis részleges gátlásához vezet, még nem ismert.

A p38MAPK-aktivációt számos különféle stressz hatás kiválthatja (oxidatív stressz, DNS-károsodás, stb.) (lásd *I. ábra*). A kis koncentrációjú SNP-előkezelés gátolhatja a p38MAPK-foszforilációt közvetítő MAPKKK és MAPKK enzimeket; másik lehetséges alternatívaként felmerül a p38MAPK defoszforilációjáért felelős foszfatázok (Bermudez és mtsai, 2010; Keyse, 2008; Patterson és mtsai, 2009) aktivációja.

6. Az SNP-előkezelés fokozza az anizomicin-indukálta sejtpusztulás mértékét

Az alkalmazott citotoxikus szerek közül az anizomicin a fent említettektől eltérően viselkedett: a magmorfológia vizsgálata és a TUNEL-esszé eredményei alapján a 100 μ M SNP-előkezeléssel kombinált anizomicin-kezelés hatékonyabban indukált apoptózist, mint önmagában az anizomicin (*15.a és b ábrák*). A Western blot eredmények is ezt a megfigyelést támasztották alá; bár 100 μ M SNP-előkezeléssel csökkenthető volt az anizomicin-indukálta p38MAPK-foszforiláció, az anizomicin-kezeléseket megelőző SNP-előkezelés több fehérje aktivációját is fokozta (például JNK, PKR, p53, kaszpázok) (*16.a és b ábrák*). Elképzelhető, hogy az általunk alkalmazott dózisban (1 μ g/ml) az anizomicin fehérjeszintézist gátló és ezáltal apoptózist indukáló hatása olyan erőteljes, hogy az SNP-előkezeléssel nem gátolható.

7. A TRAIL fehérje lehetséges szerepe PC12 sejtek apoptózisában

Bár az általunk apoptózis kiváltására használt kezelések mindegyike az intrinsic jelpályát aktiválja (lásd korábban), mégis detektálható volt minden esetben a jellemzően az extrinsic útban szerepet játszó kaszpáz-8 aktivációja (*16.b ábra*). A kaszpáz-8-aktiváció lehetséges magyarázata lehet a sejtekben az extrinsic apoptózis jelátvitel valamilyen ún. „halál ligand” általi aktivációja; ezen feltételezés alátámasztására vizsgáltuk a sejttenyésztő folyadékban a TRAIL fehérje mennyiségét. A TRAIL transzmembrán formájának jelenléte a médiumban arra utal, hogy a sejtekről apoptotikus testek vagy extracelluláris vezikulák fűződhetnek le. Utóbbiak két típusa mikrovezikula és exoszóma néven ismert, a két típus méretben és a kialakulás módjában

is különbözik. Elsődleges feladatuk a sejtek közötti kommunikáció, azonban megjelenésük betegségekhez is köthető. Fehérjéket, lipideket és nukleinsavakat (mRNS-ek, valamint miRNS-ek és egyéb nem kódoló RNS-ek) szállítanak (El Andaloussi és mtsai, 2013; Raposo és Stoorvogel, 2013).

Rivoltini és munkatársai (2016) közleményükben arról számoltak be, hogy TRAIL-t expresszáló K562 sejtek olyan exoszómákat termelnek, melyek tumor sejtekhez kötődve azokban apoptózist indukálnak. Elképzelhető, hogy PC12 sejtekről olyan extracelluláris vezikulák fűződnek le, melyek membránjukban TRAIL-molekulákat tartalmaznak. A TRAIL ezt követően a neki megfelelő sejtfelszíni receptorhoz kötődve serkentheti az extrinsic jelátvitelt. Ezt a még bizonyítást igénylő feltételezést támaszthatja alá az is, hogy a 400 μ M SNP-kezelést megelőző előkezelés csökkenti a médiumban található TRAIL-szintet (17. ábra) és a kaszpáz-8 aktivációjának mértékét is (16.b ábra, 2. és 3. minták).

8. A munka gyakorlati jelentősége

A központi idegrendszert érintő betegségek egyik gyakori jellemzője, hogy a neuronokban abnormális konformációjú fehérjék képződnek, melyek felhalmozódása ER stresszt vált ki. Ennek célja lehetőség szerint az ER-ra nehezedő terhelés megszüntetése a transláció gátlása és a nem megfelelő konformációjú fehérjék szerkezetének „kijavítása” révén. A helyes fehérje-konformáció kialakítását chaperone fehérjék végzik, ezek egyike a PDI; a PDI másik feladata a nem megfelelő helyen létrejött diszulfid-hidak átrendezése. Amennyiben a fehérje-homeosztázis helyreállítása nem valósul meg, a sejt apoptózissal elpusztul. A PDI-család különféle izoformáinak abnormális működése az idegrendszert érintő számos betegségben (Alzheimer-kór; Parkinson-kór; Creutzfeldt-Jakob betegség; amyotrophiás lateral sclerosis, ALS) kimutatható (Halloran és mtsai, 2013). Alzheimer-kórban az amyloid- β peptidből létrejött plakkok, valamint a tau fehérje aggregációja figyelhető meg (Yeo és mtsai, 2015). Parkinson-kórban az abnormális konformációjú α -synuclein fehérjét tartalmazó, ún. Lewy-testek jönnek létre a dopaminerg neuronokban, míg Huntington-kórban a huntingtin fehérje képez hatalmas komplexeket. ALS-ben szenvedő betegek idegsejtjeiben a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a neurofilamentum és egyéb fehérjék által létrehozott aggregátumok alakulnak ki (Halloran és mtsai, 2013). A fehérje-

aggregátumok kialakulásáért felelős lehet az idegsejteket érintő oxidatív és nitrozatív stressz; melyek a CHOP transzkripciós faktor, a kaszpázok, valamint a JNK aktivációja révén apoptózist váltanak ki (Halloran és mtsai, 2013). Az idegrendszer a többi szövetnél fokozottabban érzékeny a szabadgyökök káros hatásaira, mivel a neuronok nagy metabolikus aktivitással rendelkeznek, azonban viszonylag kis mennyiségben tartalmaznak szabadgyököket semlegesítő enzimeket (Nakamura és mtsai, 2015).

A nitrozatív stressz következményeként egyes fehérjék abnormális S-nitroziláción mennek át; ennek következtében hibás konformációjú fehérjék képződhetnek, zavart szenvedhet a mitokondriumok működése és a transzkripció folyamata, károsodhatnak az idegsejtek és a szinapszisok, mindez neurodegeneratív kórképek kialakulását vonhatja maga után (Nakamura és mtsai, 2015). A Parkinson-kór kialakulásához hozzájárulhat a parkin nevű ubikvitin-ligáz S-nitrozilációja. Ennek következtében csökken a parkin aktivitása és a proteaszómális fehérje-degradáció hatékonysága, hozzájárulva a Lewy-testek kialakulásához és az idegsejt-pusztuláshoz (Halloran és mtsai, 2013; Nakamura és mtsai, 2015). Abnormális S-nitroziláció gátolja a PDI működését is (Halloran és mtsai, 2013; Nakamura és mtsai, 2015), elősegítve a korábban említett fehérje-aggregációt.

Az S-nitroziláció mellett a jellemzően a peroxinitrit közvetítésével megvalósuló fokozott mértékű nitráció is fontos szerepet tölthet be egyes betegségek kialakulásában (Ischiropoulos, 2009). A tirozin (és jóval kisebb gyakorisággal triptofán) aminosavak nitrációja az érintett fehérje működésének gátlásához, illetve fehérje-aggregátumok képződéséhez vezethet (Abdelmegeed és Song, 2014). Az α -synuclein nitrációja Parkinson-kórban, míg a tau fehérje és az amyloid- β peptid nitrációja Alzheimer-kórban mutatható ki, de a tirozin-nitráció az ALS, kardiovaszkuláris és gyulladássos betegségek, valamint a diabetes kialakulásában is szerepet játszhat (Abdelmegeed és Song, 2014; Chavarría és Souza, 2013; Pacher és mtsai, 2007; Thomson, 2015; Yeo és mtsai, 2015).

A NO-nak kettős szerepe lehet a tumor képződésben. Egyrészt gátolhatja azt, függően a NO-behatás időtartamától/erősségétől, a sejtípustól és a sejt NO-érzékenységétől. Másfelől a NO által kiváltott DNS-károsodás mutációkat okozhat, valamint a NO hatására fokozódhat a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) expressziója (angiogenezist eredményezve), illetve a guanilát-cikláz és a MAPK-jelátvitel aktivációja következtében fokozódhat a tumor sejtek migrációs és inváziós képessége (Pacher és mtsai, 2007).

A PC12 sejtvonal széles körben használt idegsejt-jellegű modellrendszer, mivel ezek a sejtek idegi növekedési faktor (NGF) hatására neuronális differenciáción mennek át (Greene és Tischler, 1976). Tehát PC12 sejtek SNP indukálta apoptózisa megfelelően modellezheti az idegsejtekben kialakuló nitrozatív stressz körülményeit. A nagy NO-koncentráció citotoxikus hatásának kis NO-dózissal történő kivédése megteremtheti annak elvi lehetőségét, hogy a nitrozatív stressz által kiváltott idegsejt-pusztulás mértéke hasonló hatásokkal mérsékelhető legyen.

VI. A munka során tett új megfigyelések

A 400 μ M SNP által kiváltott nitroztatív stressz:

- apoptózist okoz PC12 sejtekben.
- nagyobb mértékű sejtpusztulást okoz a domináns gátló mutáns p53 fehérjét expresszáló p143p53PC12 szubklónban, mint vad típusú PC12 sejtekben.
- a p143p53PC12 sejtvonalon az intrinsic apoptózis jelátvitel erőteljesebb aktivációját váltja ki.
- megemeli a TRAIL mennyiségét PC12 sejtek médiumában.

Vad típusú PC12 sejtekben a 100 μ M SNP-előkezelés:

- részben gátolja a 400 μ M SNP által kiváltott sejtpusztulást.
- csökkenti a széruméheztetés, ciszplatin és tunikamicin által indukált apoptózis mértékét, feltehetően az apoptózis intrinsic útjának gátlásával.
- fokozza az anizomicin citotoxikus hatását.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Szeberényi József professzor úrnak, aki a kezdetektől segítette munkámat. Rengeteg segítséget kaptam tőle a kísérletek megtervezésében, a közlemények megírásában és a dolgozat végleges formába öntésében.

Hálás vagyok egykori TDK-témavezetőmnek, azóta pedig közvetlen munkatársamnak, dr. Bátor Juditnak. Bármilyen kérdéssel fordultam hozzá, mindig számíthattam azonnali segítségére és türelmére, legyen az gyakorlati vagy elméleti jellegű probléma.

Köszönöm Potzné Árvai Zitának a kísérletek kivitelezésében nyújtott sok segítséget.

Szeretnék köszönetet mondani ifj. dr. Sétáló Györgynek a konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatokban nyújtott segítségéért és dr. Pap Mariannának, aki rendelkezésemre bocsátotta a p143p53PC12 sejtvonalat. Köszönöm Schipp Renáta együttműködését eredményeink megvitatásában.

Hálás vagyok továbbá Németh Maricának, dr. Balogh Andrásnak és Koloszar Ibolyának a kísérletes munkát segítő tanácsaikért.

Köszönet illeti az Orvosi Biológiai Intézet minden további dolgozóját.

Szeretném megköszönni dr. Szereday Lászlónak és dr. Kvell Krisztiánnak az előbíráló gondos átolvasását, véleményüket és tanácsaikat.

Köszönöm családomnak és barátaimnak a szeretetüket és támogatásukat.

Felhasznált irodalom

- Abdelmegeed MA, Song BJ (2014) Functional roles of protein nitration in acute and chronic liver diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2014:149627
- Adams JM, Cory S (2007) Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 19:488-496
- Akhtar MW, Sunico CR, Nakamura T, Lipton SA (2012) Redox Regulation of Protein Function via Cysteine S-Nitrosylation and Its Relevance to Neurodegenerative Diseases. *Int J Cell Biol* 2012:463756
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3203-3207
- Arthur DB, Georgi S, Akassoglou K, Insel PA (2006) Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: novel pathways for neuronal survival. *J Neurosci* 26:3798-3804
- Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK (2016) PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *Eur J Med Chem* 109:314-341
- Azahri NS, Kavurma MM (2013) Transcriptional regulation of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cell Mol Life Sci* 70:3617-3629
- Azijli K, Weyhenmeyer B, Peters GJ, de Jong S, Kruyt FA (2013) Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ* 20:858-868
- Balogh A, Németh M, Koloszar I, Markó L, Przybyl L, Jinno K, Szigeti C, Heffer M, Gebhardt M, Szeberényi J, Müller DN, Sétáló G, Pap M (2014) Overexpression of CREB protein protects from tunicamycin-induced apoptosis in various rat cell types. *Apoptosis* 19:1080-1098
- Beckerman R, Prives C (2010) Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000935
- Benhar M (2015) Nitric oxide and the thioredoxin system: a complex interplay in redox regulation. *Biochim Biophys Acta* 1850:2476-2484

- Bermudez O, Pagès G, Gimond C (2010) The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* 299:C189-202
- Bradley SA, Steinert JR (2016) Nitric Oxide-Mediated Posttranslational Modifications: Impacts at the Synapse. *Oxid Med Cell Longev* 2016:5681036
- Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1999) The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat Res* 424:37-49
- Bátor J, Varga J, Berta G, Barbakadze T, Mikeladze D, Ramsden J, Szeberényi J (2012) Sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, fails to bypass the block of neuronal differentiation in PC12 cells imposed by a dominant negative Ras protein. *Cell Mol Biol Lett* 17:323-332
- Bátor J, Varga J, Szeberényi J (2013) The effect of sodium nitroprusside on survival and stress signaling in PC12 rat pheochromocytoma cells expressing a dominant negative RasH mutant protein. *Biochem Cell Biol* 91:230-235
- Böhlig L, Rother K (2011) One function--multiple mechanisms: the manifold activities of p53 as a transcriptional repressor. *J Biomed Biotechnol* 2011:464916
- Chatfield K, Eastman A (2004) Inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A differentially prevent intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 323:1313-1320
- Chavarría C, Souza JM (2013) Oxidation and nitration of α -synuclein and their implications in neurodegenerative diseases. *Arch Biochem Biophys* 533:25-32
- Chi SW (2014) Structural insights into the transcription-independent apoptotic pathway of p53. *BMB Rep* 47:167-172
- Chowdhury D, Lieberman J (2008) Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 26:389-420
- Comel A, Sorrentino G, Capaci V, Del Sal G (2014) The cytoplasmic side of p53's oncosuppressive activities. *FEBS Lett* 588:2600-2609
- Correia C, Lee SH, Meng XW, Vincelette ND, Knorr KL, Ding H, Nowakowski GS, Dai H, Kaufmann SH (2015) Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment. *Biochim Biophys Acta* 1853:1658-1671
- Crowder RN, El-Deiry WS (2012) Caspase-8 regulation of TRAIL-mediated cell death. *Exp Oncol* 34:160-164

- D'Atri LP, Malaver E, Romaniuk MA, Pozner RG, Negrotto S, Schattner M (2009) Nitric oxide: news from stem cells to platelets. *Curr Med Chem* 16:417-429
- Darling NJ, Cook SJ (2014) The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta* 1843:2150-2163
- Dasari S, Tchounwou PB (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 740:364-378
- de Oliveira GA, Rangel LP, Costa DC, Silva JL (2015) Misfolding, Aggregation, and Disordered Segments in c-Abl and p53 in Human Cancer. *Front Oncol* 5:97
- Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali A (2013) The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell Mol Life Sci* 70:3493-3511
- EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, Wood MJ (2013) Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 12:347-357
- Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M (1984) Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312:646-649
- Evangelista AM, Kohr MJ, Murphy E (2013) S-nitrosylation: specificity, occupancy, and interaction with other post-translational modifications. *Antioxid Redox Signal* 19:1209-1219
- Ferraiuolo M, Di Agostino S, Blandino G, Strano S (2016) Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. *Front Oncol* 6:77
- Ferriere F, Habauzit D, Pakdel F, Saligaut C, Flouriot G (2013) Unliganded estrogen receptor alpha promotes PC12 survival during serum starvation. *PLoS One* 8:e69081
- Flusberg DA, Sorger PK (2015) Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells. *Trends Cell Biol* 25:446-458
- Frebourg T, Kassel J, Lam KT, Gryka MA, Barbier N, Andersen TI, Børresen AL, Friend SH (1992) Germ-line mutations of the p53 tumor suppressor gene in patients with high risk for cancer inactivate the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6413-6417
- Freed-Pastor WA, Prives C (2012) Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev* 26:1268-1286

- Frezza C, Cipolat S, Scorrano L (2007) Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* 2:287-295
- Friedlander P, Legros Y, Soussi T, Prives C (1996) Regulation of mutant p53 temperature-sensitive DNA binding. *J Biol Chem* 271:25468-25478
- Fábián Z, Vecsernyés M, Pap M, Szeberényi J (2006) The effects of a mutant p53 protein on the proliferation and differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cells. *J Cell Biochem* 99:1431-1441
- Giorgi C, Bonora M, Missiroli S, Morganti C, Morciano G, Wieckowski MR, Pinton P (2016) Alterations in Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum Signaling by p53 Mutants. *Front Oncol* 6:42
- Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B (2015) Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 16:2129-2144
- Gotoh T, Mori M (2006) Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1439-1446
- Green DR, Kroemer G (2009) Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458:1127-1130
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424-2428
- Gridasova AA, Henry RW (2005) The p53 tumor suppressor protein represses human snRNA gene transcription by RNA polymerases II and III independently of sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol* 25:3247-3260
- Halloran M, Parakh S, Atkin JD (2013) The role of s-nitrosylation and s-glutathionylation of protein disulphide isomerase in protein misfolding and neurodegeneration. *Int J Cell Biol* 2013:797914
- Hao Q, Cho WC (2014) Battle against cancer: an everlasting saga of p53. *Int J Mol Sci* 15:22109-22127
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y (2003) Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 116:4077-4085
- Hayakawa R, Hayakawa T, Takeda K, Ichijo H (2012) Therapeutic targets in the ASK1-dependent stress signaling pathways. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 88:434-453

- Heinrich TA, da Silva RS, Miranda KM, Switzer CH, Wink DA, Fukuto JM (2013) Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *Br J Pharmacol* 169:1417-1429
- Hiramatsu N, Chiang WC, Kurt TD, Sigurdson CJ, Lin JH (2015) Multiple Mechanisms of Unfolded Protein Response-Induced Cell Death. *Am J Pathol* 185:1800-1808
- Hirst DG, Robson T (2010) Nitrosative stress as a mediator of apoptosis: implications for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 16:45-55
- Horikoshi N, Usheva A, Chen J, Levine AJ, Weinmann R, Shenk T (1995) Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 15:227-234
- Jenkins JR, Rudge K, Currie GA (1984) Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 312:651-654
- Joshi M, Kulkarni A, Pal JK (2013) Small molecule modulators of eukaryotic initiation factor 2 α kinases, the key regulators of protein synthesis. *Biochimie* 95:1980-1990
- Kakudo Y, Shibata H, Otsuka K, Kato S, Ishioka C (2005) Lack of correlation between p53-dependent transcriptional activity and the ability to induce apoptosis among 179 mutant p53s. *Cancer Res* 65:2108-2114
- Kang YC, Kim PK, Choi BM, Chung HT, Ha KS, Kwon YG, Kim YM (2004) Regulation of programmed cell death in neuronal cells by nitric oxide. *In Vivo* 18:367-376
- Kavdia M (2011) Mathematical and computational models of oxidative and nitrosative stress. *Crit Rev Biomed Eng* 39:461-472
- Keyse SM (2008) Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27:253-261
- Khoury MP, Bourdon JC (2011) p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor? *Genes Cancer* 2:453-465
- Kim E, Deppert W (2004) Transcriptional activities of mutant p53: when mutations are more than a loss. *J Cell Biochem* 93:878-886
- Kim EK, Choi EJ (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802:396-405

- Kvansakul M, Hinds MG (2015) The Bcl-2 family: structures, interactions and targets for drug discovery. *Apoptosis* 20:136-150
- Leon L, Jeannin JF, Bettaieb A (2008) Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): implication in cancer cells apoptosis. *Nitric Oxide* 19:77-83
- Leroy B, Anderson M, Soussi T (2014) TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum Mutat* 35:672-688
- Lin W, Wei X, Xue H, Kelimu M, Tao R, Song Y, Zhou Z (2000) Study on DNA strand breaks induced by sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, in vivo and in vitro. *Mutat Res* 466:187-195
- Liu Z, Martin LJ (2001) Motor neurons rapidly accumulate DNA single-strand breaks after in vitro exposure to nitric oxide and peroxynitrite and in vivo axotomy. *J Comp Neurol* 432:35-60
- Lopez J, Tait SW (2015) Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer* 112:957-962
- Manieri E, Sabio G (2015) Stress kinases in the modulation of metabolism and energy balance. *J Mol Endocrinol* 55:R11-22
- Marchal JA, Lopez GJ, Peran M, Comino A, Delgado JR, García-García JA, Conde V, Aranda FM, Rivas C, Esteban M, Garcia MA (2014) The impact of PKR activation: from neurodegeneration to cancer. *FASEB J* 28:1965-1974
- Martínez-Ruiz A, Araújo IM, Izquierdo-Álvarez A, Hernansanz-Agustín P, Lamas S, Serrador JM (2013) Specificity in S-nitrosylation: a short-range mechanism for NO signaling? *Antioxid Redox Signal* 19:1220-1235
- Martínez-Ruiz A, Cadenas S, Lamas S (2011) Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med* 51:17-29
- McIlroy D, Sakahira H, Talanian RV, Nagata S (1999) Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli. *Oncogene* 18:4401-4408
- Menon V, Povirk L (2014) Involvement of p53 in the repair of DNA double strand breaks: multifaceted Roles of p53 in homologous recombination repair (HRR) and non-homologous end joining (NHEJ). *Subcell Biochem* 85:321-336
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11:577-590

- Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D (2012) New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol* 2012:170325
- Mocellin S, Bronte V, Nitti D (2007) Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Med Res Rev* 27:317-352
- Mohr A, Yu R, Zwacka RM (2015) TRAIL-receptor preferences in pancreatic cancer cells revisited: Both TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have a licence to kill. *BMC Cancer* 15:494
- Munshi A, Ramesh R (2013) Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. *Genes Cancer* 4:401-408
- Nakamura T, Lipton SA (2013) Emerging role of protein-protein transnitrosylation in cell signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* 18:239-249
- Nakamura T, Lipton SA (2016) Nitrosative Stress in the Nervous System: Guidelines for Designing Experimental Strategies to Study Protein S-Nitrosylation. *Neurochem Res* 41:510-514
- Nakamura T, Prikhodko OA, Pirie E, Nagar S, Akhtar MW, Oh CK, McKercher SR, Ambasudhan R, Okamoto S, Lipton SA (2015) Aberrant protein S-nitrosylation contributes to the pathophysiology of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis* 84:99-108
- Ola MS, Nawaz M, Ahsan H (2011) Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 351:41-58
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424
- Pap M, Szeberényi J (2008) Involvement of proteolytic activation of protein kinase R in the apoptosis of PC12 pheochromocytoma cells. *Cell Mol Neurobiol* 28:443-456
- Parada LF, Land H, Weinberg RA, Wolf D, Rotter V (1984) Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312:649-651
- Park BS, Song YS, Yee SB, Lee BG, Seo SY, Park YC, Kim JM, Kim HM, Yoo YH (2005) Phospho-ser 15-p53 translocates into mitochondria and interacts with Bcl-2 and Bcl-xL in eugenol-induced apoptosis. *Apoptosis* 10:193-200
- Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ (2009) Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J* 418:475-489

- Penna C, Angotti C, Pagliaro P (2014) Protein S-nitrosylation in preconditioning and postconditioning. *Exp Biol Med (Maywood)* 239:647-662
- Peti W, Page R (2013) Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Sci* 22:1698-1710
- Pilz RB, Casteel DE (2003) Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 93:1034-1046
- Price NP, Tsvetanova B (2007) Biosynthesis of the tunicamycins: a review. *J Antibiot (Tokyo)* 60:485-491
- Puca R, Nardinocchi L, Givol D, D'Orazi G (2010) Regulation of p53 activity by HIPK2: molecular mechanisms and therapeutical implications in human cancer cells. *Oncogene* 29:4378-4387
- Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 200:373-383
- Ray D, Murphy KR, Gal S (2012) The DNA binding and accumulation of p53 from breast cancer cell lines and the link with serine 15 phosphorylation. *Cancer Biol Ther* 13:848-857
- Rivoltini L, Chiodoni C, Squarcina P, Tortoreto M, Villa A, Vergani B, Bürdek M, Botti L, Arioli I, Cova A, Mauri G, Vergani E, Bianchi B, Della Mina P, Cantone L, Bollati V, Zaffaroni N, Gianni AM, Colombo MP, Huber V (2016) TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-Armed Exosomes Deliver Proapoptotic Signals to Tumor Site. *Clin Cancer Res*
- Roy MJ, Vom A, Czabotar PE, Lessene G (2014) Cell death and the mitochondria: therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway. *Br J Pharmacol* 171:1973-1987
- Saelens X, Kalai M, Vandenabeele P (2001) Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation. *J Biol Chem* 276:41620-41628
- Saha B, Adhikary A, Ray P, Saha S, Chakraborty S, Mohanty S, Das K, Mukherjee S, Mazumdar M, Lahiri L, Hossain DM, Sa G, Das T (2012) Restoration of tumor suppressor p53 by differentially regulating pro- and anti-p53 networks in HPV-18-infected cervical cancer cells. *Oncogene* 31:173-186
- Saha T, Kar RK, Sa G (2015) Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. *Prog Biophys Mol Biol* 117:250-263

- Schneiderhan N, Budde A, Zhang Y, Brüne B (2003) Nitric oxide induces phosphorylation of p53 and impairs nuclear export. *Oncogene* 22:2857-2868
- Sekine Y, Takeda K, Ichijo H (2006) The ASK1-MAP kinase signaling in ER stress and neurodegenerative diseases. *Curr Mol Med* 6:87-97
- Seong HA, Ha H (2012) Murine protein serine-threonine kinase 38 activates p53 function through Ser15 phosphorylation. *J Biol Chem* 287:20797-20810
- Sessler T, Healy S, Samali A, Szegezdi E (2013) Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling. *Pharmacol Ther* 140:186-199
- Shiizaki S, Naguro I, Ichijo H (2013) Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. *Adv Biol Regul* 53:135-144
- Siddik ZH (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22:7265-7279
- Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H (2015) The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol* 89:289-317
- Solá S, Morgado AL, Rodrigues CM (2013) Death receptors and mitochondria: two prime triggers of neural apoptosis and differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1830:2160-2166
- Sovolyova N, Healy S, Samali A, Logue SE (2014) Stressed to death - mechanisms of ER stress-induced cell death. *Biol Chem* 395:1-13
- Speidel D (2010) Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol* 20:14-24
- Sui X, Kong N, Ye L, Han W, Zhou J, Zhang Q, He C, Pan H (2014) p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett* 344:174-179
- Surget S, Khoury MP, Bourdon JC (2013) Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *Onco Targets Ther* 7:57-68
- Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R (2007) Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6:662-680
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7:880-885

- Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolocci N, Ambs S, Colton CA, Harris CC, Roberts DD, Wink DA (2008) The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 45:18-31
- Thomson L (2015) 3-nitrotyrosine modified proteins in atherosclerosis. *Dis Markers* 2015:708282
- Toledo JC, Augusto O (2012) Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. *Chem Res Toxicol* 25:975-989
- Töröcsik B, Szeberényi J (2000) Anisomycin affects both pro- and antiapoptotic mechanisms in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 278:550-556
- Varga J, Bátor J, Nadasdi G, Árvai Z, Schipp R, Szeberényi J (2016) Partial Protection of PC12 Cells from Cellular Stress by Low-Dose Sodium Nitroprusside Pre-treatment. *Cell Mol Neurobiol* 36:1161-1168
- Varga J, Bátor J, Péter M, Árvai Z, Pap M, Sétáló G, Szeberényi J (2014) The role of the p53 protein in nitrosative stress-induced apoptosis of PC12 rat pheochromocytoma cells. *Cell Tissue Res* 358:65-74
- Vaseva AV, Moll UM (2009) The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta* 1787:414-420
- Wang DB, Kinoshita C, Kinoshita Y, Morrison RS (2014) p53 and mitochondrial function in neurons. *Biochim Biophys Acta* 1842:1186-1197
- Weidinger A, Kozlov AV (2015) Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* 5:472-484
- Weisz L, Oren M, Rotter V (2007) Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene* 26:2202-2211
- Wong KB, DeDecker BS, Freund SM, Proctor MR, Bycroft M, Fersht AR (1999) Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8438-8442
- Wu H, Che X, Zheng Q, Wu A, Pan K, Shao A, Wu Q, Zhang J, Hong Y (2014) Caspases: a molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Int J Biol Sci* 10:1072-1083
- Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, Arcinas M, Boxer LM (2001) Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 20:240-251

- Würstle ML, Laussmann MA, Rehm M (2012) The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res* 318:1213-1220
- Yao R, Cooper GM (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267:2003-2006
- Yeo WS, Kim YJ, Kabir MH, Kang JW, Ahsan-Ul-Bari M, Kim KP (2015) Mass spectrometric analysis of protein tyrosine nitration in aging and neurodegenerative diseases. *Mass Spectrom Rev* 34:166-183
- Yip KW, Reed JC (2008) Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 27:6398-6406
- Yoshioka Y, Yamamuro A, Maeda S (2006) Nitric oxide/cGMP signaling pathway protects RAW264 cells against nitric oxide-induced apoptosis by inhibiting the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Pharmacol Sci* 101:126-134
- Zhang W, Guo XY, Hu GY, Liu WB, Shay JW, Deisseroth AB (1994) A temperature-sensitive mutant of human p53. *EMBO J* 13:2535-2544

Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Judit Varga, Judit Bátor, Márton Péter, Zita Árvai, Marianna Pap, György Sétáló Jr., József Szeberényi: The role of the p53 protein in nitrosative stress-induced apoptosis of PC12 rat pheochromocytoma cells. *Cell Tissue Res.* 2014. Oct; 358(1): 65-74. (2014) **IF: 3,565**

Judit Varga, Judit Bátor, Gergő Nádasdi, Zita Árvai, Renáta Schipp, and József Szeberényi: Partial protection of PC12 cells from cellular stress by low-dose sodium nitroprusside pre-treatment. *Cell Mol Neurobiol.* 2016. Oct; 36(7): 1161-1168. (2016) **IF: 2,328 (2015)**

Egyéb impakt faktoros közlemények

Judit Bátor, **Judit Varga**, Gergely Berta, Tamar Barbakadze, David Mikeladze, Jeremy Ramsden, József Szeberényi: Sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, fails to bypass the block of neuronal differentiation in PC12 cells imposed by a dominant negative Ras protein. *Cell Mol Biol Lett.* 2012. Sep; 17:(3) 323-332. (2012) **IF: 1,953**

Judit Bátor, **Judit Varga**, József Szeberényi: The effect of sodium nitroprusside on survival and stress signaling in PC12 rat pheochromocytoma cells expressing a dominant negative RasH mutant protein. *Biochem Cell Biol.* 2013. Aug; 91:(4) 230-235. (2013) **IF: 2,350**

A témához kapcsolódó konferenciák

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

Varga Judit, Bátor Judit, Stark Borbála, Harci Alexandra, Tarjányi Oktávia, Szeberényi József: Nitrogén-oxid szerepe PC12 patkány pheochromocytoma sejtek apoptózisában, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007 (Absztrakt: P114.)

- Varga Judit, Harci Alexandra, Stark Borbála, Péter Márton, Bátor Judit, Szeberényi József: P53 fehérje szerepe PC12 patkány phaeochromocytoma sejtek nitrogén-oxid indukálta apoptózisában, Semmelweis Egyetem PhD Tudományos Napok, Budapest, 2007 (Absztrakt: P-II/5.)
- Judit Bátor, Judit Varga, Márton Péter, Marianna Pap, József Szeberényi: The role of p53 protein in nitric oxide induced cell death of PC12 cells, EMBO Meeting on Cellular Signaling and Molecular Medicine, Horvátország, Cavtat, 2008 (Absztrakt: P48)
- Judit Varga, Judit Bátor, József Szeberényi: Nitric oxide-induced apoptosis of PC12 cells, 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, Athén, Görögország, 2008 (Absztrakt: PP7A-90)
- Varga Judit, Bátor Judit, Péter Márton: A p53 fehérje szerepe PC12 sejtek nitrogén-oxid indukálta apoptózisában, Biológus Doktoranduszok Konferenciája, Pécs, 2009
- Varga Judit: A nitrogén-oxid szerepe a sejthalál folyamatában. Magyar Biológiai Társaság Szakülése, Pécs, 2009
- Varga Judit, Bátor Judit, Péter Márton, Pap Marianna, ifj. Sétáló György, Szeberényi József: Domináns gátló p53 fehérjét expresszáló PC12 sejtek fokozottabban érzékenyek a nitrogén-oxid apoptotikus hatására, XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011 (Absztrakt: O093)
- Judit Varga, Judit Bátor, Marianna Pap, György Sétáló Jr., József Szeberényi: PC12 cells expressing a mutant p53 protein are more susceptible to the cytotoxic effects of sodium nitroprusside, 2nd International Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2013 (Absztrakt: O-12)
- Varga Judit, Bátor Judit, Nádasdi Gergő, Szeberényi József: Stressz hatások okozta apoptózis részleges kivédése PC12 sejtekben, VIII. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2015 (Poszter: 28.)

Egyéb, a témához nem kapcsolódó konferenciák

- Bátor Judit, Varga Judit, Harci Alexandra, Stark Borbála, Tarjányi Oktávia, Szeberényi József: Nitroziláció hatása PC12 sejtek neuronális differenciációjára, Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006

- 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, Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006
- Tarjányi Oktávia, Stark Borbála, Berta Gergely, Harci Alexandra, Varga Judit, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: Proteaszóma gátló (MG-132) és Src-inhibitorok (PP1, PP2) neuronális differenciációt befolyásoló hatásainak vizsgálata PC12 sejtekben, Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006
- Bátor Judit, Varga Judit, Szeberényi József: Manumycin kezelés hatása PC12 sejtek NGF indukálta differenciációjára, Semmelweis Egyetem PhD Tudományos napok, Budapest, 2006 (Absztrakt: P-II/18.)
- Varga Judit, Bátor Judit, Tarjányi Oktávia, Szeberényi József: A Ras fehérje szerepe PC12 sejtek nitrogén-oxid indukálta apoptózisában, Semmelweis Egyetem PhD Tudományos Napok, Budapest, 2009 (Absztrakt: E-VIII/6)
- Bátor Judit, Varga Judit, Szeberényi József: Ras-függő és Ras-független jelátviteli utak szerepe PC12 sejtek nitrogén-monoxid indukálta apoptózisában, XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, 2009 (Absztrakt: ES04)
- Bátor Judit, Varga Judit: Nitrogén monoxid neuronális differenciációt és apoptózist befolyásoló jelátvitelének Ras-függése, Biológus Doktoranduszok Konferenciája, Pécs, 2009
- Judit Bátor, Judit Varga, József Szeberényi: Pro-apoptotic and pro-survival effects of sodium nitroprusside in PC12 cells expressing a dominant inhibitory RasH protein, 1st International Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2012 (Absztrakt: O-03)
- Judit Bátor, Judit Varga, József Szeberényi: Effect of sodium nitroprusside on nerve growth factor induced differentiation of PC12 cells, 2nd International Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2013 (Absztrakt: O-13)