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

Doktori (Ph.D.) értekezés

dr. Bátor Judit

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

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Biológiai Intézet

2013.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke……..4

Bevezetés……6

A nitrogén-oxid szerepe, képződése, metabolizmusa ……6

A NO hatásai……7

NO-donorok…… …9

A NO szerepe a neuronális differenciáció jelátvitelében……10

A NO antiapoptotikus hatásai……14

A NO-indukálta sejthalál……16

Néhány példa a NO jelentőségére patológiás folyamatokban……19

Célkitűzések……..21

Kísérleti anyagok és módszerek……..22

Felhasznált anyagok és sejtkultúrák……22

A proliferáció vizsgálata……22

Western-blot analízis……22

A differenciáció morfológiai vizsgálata……23

A sejtek életképességének vizsgálata……23

A magmorfológia vizsgálata……24

A DNS-fragmentáció vizsgálata……24

Eredmények……...26

A citotoxikusnál kisebb koncentrációjú SNP hatásai……...26

Az SNP Ras-független úton gátolja a sejtproliferációt……26

Az NGF és az SNP együttes hatása sem idéz elő neuronális differenciációt M-M17-26 sejtekben……27

Az SNP nem fokozza az NGF ERK-foszforilációt serkentő hatását……29

Az SNP nem befolyásolja az NGF által indukált Akt-foszforilációt……29

A CREB foszforilációja Ras-függő mind SNP-, mind NGF-kezelés hatására……29

Citotoxikus koncentrációjú SNP hatásai……30

Az SNP hatása a sejtek életképességére……30

Az SNP apoptotikus hatásának kimutatása a kromatinban……31

Az SNP-kezelés kétfázisú ERK-foszforilációt idéz elő……33

Az SNP csak erősen toxikus koncentrációban gátolja az Akt-foszforilációt……34
Az SNP stresszkinázok által közvetített jelátviteli utakat aktivál……35
A p53 fehérje foszforilációja és stabilizációja SNP-kezelés hatására……37
Kaszpázaktiváció SNP-kezelés hatására……38
Megbeszélés……40
A NO antiproliferatív hatása Ras-független……40
Az együttes NGF és SNP kezelés nem idéz elő neuronális differenciációt M-M17-26 sejtekben……41
Az SNP-kezelés nem képes oldani az NGF indukálta ERK- és CREB-foszforiláció domináns negatív RasH okozta gátlását……42
Az SNP többféle jelátviteli úton keresztül indukál sejthalált PC12 sejtekben……43
A toxikus koncentrációjú SNP-kezelés a Ras jelátviteli utat használva indukál kétfázisú ERK-foszforilációt……44
A toxikus koncentrációjú SNP-kezelés aRas-funkciótól függetlenül stressz-jelátvitelt aktivál……44
Az SNP-kezelés, valamint a domináns gátló RasH expressziója befolyásolja a p53 expresszióját……45
Az M-M17-26 klón fokozott érzékenysége az SNP apoptotikus hatására a fokozott kaszpáz-9 és -3 aktiváció következménye……47
A munka gyakorlati jelentősége……49
Összefoglalás……50
Köszönetnyilvánítás……51
Felhasznált irodalom……52
A PhD-kutatás keretében született publikációk……62

Rövidítések jegyzéke

AIF: apoptosis inducing factor

ATF4: activating transcription factor 4

Bak: Bcl2-antagonist/killer

Bax: Bcl2-associated X protein

Bcl2**:** B-cell lymphoma protein 2

CaMK: Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinase

cGMP: cyclic guanosine monophosphate

CHOP: CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein

CREB: cAMP-responsive element binding protein

dbcAMP: dibutyryl cyclic adenosine monophosphate

eIF2α: eukaryotic initiation factor 2-alpha

ERK: extracellular signal-regulated kinase

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GCN: general control non-derepressible

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GSNO: S-nitrosoglutathione

HRI: heme-regulated inhibitor kinase

HSP90: heat shock protein 90

JNK: c-Jun N-terminal kinase

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MKK: MAP kinase kinase

MEKK: MAPK/ERK kinase kinase

MKP: MAPK phosphatase

NFκB: nuclear factor κ B

NGF: nerve growth factor

NO: nitric oxide

NOS: nitric oxide synthase

p21WAF1: wild-type p53-activated fragment 1

p75NTR: p75 neurotrophin receptor

p90RSK (=Rsk2): p90 ribosomal S6 kinase

PARP: poly-ADP-ribose polymerase

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

PDI: protein disulfide isomerase

PDK: PIP_3-dependent kinase

PERK: PKR-like endoplasmic reticulum kinase

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PIP_2: phosphatidylinositol bisphosphate

PIP_3: phosphatidylinositol trisphosphate

PKA: protein kinase A

PKB (=Akt): protein kinase B

PKC: protein kinase C

PKG: protein kinase G

PKR: protein kinase R

PLC: phospholipase C

PTEN: phosphatase and tensin homolog

sGC: soluble guanylate cyclase

Siah: seven in absentia homolog

SNP: sodium nitroprusside

SOD: superoxide dismutase

TNFα: tumor necrosis factor α

TrkA: tropomyosin-related kinase A

UPR: unfolded protein response

XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis

WST-1: water soluble tetrazolium salts

Bevezetés

A nitrogén-oxid szerepe, képződése, metabolizmusa

A nitrogén-oxid (NO) másodlagos messengerként szerepet játszik az intracelluláris jelátvitelben, illetve a sejtmembránon átjutva a sejtek közötti parakrin jelátviteli folyamatokban. A vérrel, a hemoglobin hem részéhez vagy az albuminhoz kötődve a keletkezési helyétől távolabbra is szállítódhat (Blaise és mtsai, 2005).

A nitrogén-oxid szintáz (NOS) fehérjecsalád felelős a NO előállításáért, az alábbi reakció szerint:

L-arginin → NO + L-citrullin

Az enzimcsalád tagjai a neuronális, az endoteliális és az indukálható NOS. C-terminális reduktáz doménjük nagymértékben, míg N-terminális oxigenáz doménjük kevésbé homológ. Hem részük mellett tetrahidrobiopterint, NADPH-t, FAD-ot és flavin mononukleotidot használnak kofaktorként. A kalmodulint mindhárom izoforma képes megkötni (Bian és mtsai, 2006). Mindhárom enzim homodimerként aktív. Az endoteliális és neuronális NOS aránylag kis mennyiségben termel NO-t, ami nem éri el a toxikus szintet. Konstitutívan expresszálódnak, Ca^{2+}, illetve kalmodulin hatására aktiválódnak. Az indukálható NOS lipopoliszacharid, citokinek, tumor nekrózis faktor α (TNFα) hatására expresszálódik, NFκB transzkripciós faktor közvetítésével (Kang és mtsai, 2004, Blaise és mtsai, 2005). Az indukálható NOS aktivációjában nem vesz részt a kalmodulin, a képződött fehérje a szubsztrát depléciójáig vagy a saját lebomlásáig folyamatosan (akár több napig) aktív (Lirk és mtsai, 2002). Az általa termelt NO adott esetben nagyobb, már toxikus koncentrációt is elérhet (Brown, 2010). A kísérleteinkhez használt PC12 sejtvonal mindhárom típusú NOS-t expresszálja (Balogh András, személyes közlés).

In vivo körülmények között a NO hatásait többféle tényező befolyásolja: egyrészt a potenciális célfehérje NOS-tól való távolsága, hiszen a képződött NO, mint szabadgyök nagyon reakcióképes. Másrészt a képződött NO koncentrációja, hiszen különböző fehérjék módosításához eltérő NO-koncentráció szükséges. Például a cGMP-út aktiválásához jóval kisebb mennyiségű NO is elég, mint a p53 fehérje módosításához. Sőt, egy adott fehérjén belül is különböző aminosav-oldalláncok módosulása eltérő NO koncentráció hatására

következik be (például p53 fehérje). Harmadrészt, élő szervezeten belül más lebontó mechanizmusok is érvényesülnek, mint akár egy sejttenyészetben, ezáltal általában csökkent és/vagy rövidebb idejű hatással számolhatunk (Anand és Stamler, 2012; Brown, 2010; Souza és mtsai, 2008**).**

A NO hatásai

A képződött NO intracellulárisan serkenti a **szolubilis guanilát-cikláz** (sGC) működését (annak hem részéhez kötődve), a képződött ciklikus GMP (cGMP) többek között a protein kináz G (PKG) aktiválásán keresztül fejti ki hatásait. A PKG egyéb fehérjék mellett aktiválja a PI3K enzimet, foszforilálja a CREB transzkripciós faktort, befolyásolja a sejt Ca^{2+} homeosztázisát, hatással van a citoszkeleton funkciójára (Kang és mtsai, 2004, Francis és mtsai, 2010).

A NO kovalensen kötődhet fehérjék meghatározott aminosav oldalláncaihoz. A folyamat a foszforiláció mintájára a nitroziláció nevet kapta. A -NO csoport cisztein aminosavhoz kötődése a nitrozáció vagy S-nitroziláció. A tirozin módosítása $-NO_2$ csoport által a nitráció folyamata (Martinez-Ruiz és Lamas, 2004, Blaise és mtsai, 2005). Egyes kutatók leírják a triptofán aminosav nitrációját NO hatására, ennek biológiai jelentősége még kevésbé ismert (Yamakura és Ikeda, 2006). A fehérjék konformációját és aktivitását befolyásolja a nitrozilációjuk, ennek a módosított aminosav elhelyezkedésétől függően aktiváló és inaktiváló hatása egyaránt lehet.

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

A nitroziláció típusai

Az S-nitroziláció mechanizmusában részt vevő egyes enzimek (a metál-cisztein nitrozilázok) fémionról (a fehérjével komplexet alkotó Fe^{2+} vagy Cu^{2+}-ionról) juttatják saját vagy egy másik fehérjében található cisztein aminosavra a nitrozocsoportot (például hemoglobin, neuroglobin, citokróm c, cöruloplazmin). Az enzimek másik csoportja, a transznitrozilázok (például hemoglobin, tioredoxin, kaszpáz-3, glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz /GAPDH/, Cdk5) saját cisztein aminosavról juttatják a nitrozocsoportot a célfehérjéjük cisztein aminosavára. A nitrozocsoportot a denitrozilázok távolítják el a fehérjéről. Jelenleg ismert két fő típusuk a Trx-rendszer (tioredoxin, tioredoxin-reduktáz, NADPH) és az S-nitrozoglutation (GSNO) reduktáz rendszer (GSNO-reduktáz más néven

alkohol dehidrogenáz III, glutation, NADH). Mindkettő a citoszolban lévő, S-nitrozilált fehérjék denitrozilálásában vesz részt. A tioredoxin a tioredoxin-reduktázzal kapcsolódva a denitroziláció (például kaszpáz-3, kaszpáz-9, Akt), anélkül a nitroziláció folyamatában vesz részt. A GSNO-reduktáz rendszer denitrozilálja többek között a Ras fehérjét. *In vitro* vizsgálatok során kimutatták a xantin/xantin-oxidáz, a γ-glutamil transzpeptidáz, a glutation peroxidáz és a Cu/Zn szuperoxid-dizmutáz (SOD) denitroziláló hatását is (Gaston és mtsai, 2003, Anand és Stamler, 2012).

A NO másodlagosan a fehérjék S-glutationilációját, tehát a glutation és cisztein oldallánc diszulfid hídon keresztüli kötődését is előidézheti. A glutation S-nitrozilálódhat (GSNO képződik), ez pedig elősegíti a fehérjékhez kapcsolódását (Circu és Aw, 2012). A glutationiláció szintén szabályozó szerepű (Martinez-Ruiz és Lamas, 2004). A denitrozilázok közül a γ-glutamil transzpeptidáz és a Cu/Zn SOD elsősorban a GSNO denitrozilálásában vesz részt. A GSNO koncentrációja sejttípusonként változik, ez különböző GSNO-bontó katalitikus enzimaktivitásra utal (Gaston és mtsai, 2003). A NO indukálta apoptózis során csökken a sejtben a glutation mennyisége (Blaise és mtsai, 2005).

A fehérjék tirozin-nitrációja kevésbé ismert folyamat, mint az S-nitroziláció, de már így is többféle lehetséges mechanizmusa körvonalazódott. Először is a NO-ból, reakcióképessége miatt más intermedierek mellett peroxinitrit ($ONOO^-$) és nitrit (NO_2^-) képződik, melyeknek szerepe van a nitrációs folyamatokban (a peroxinitritnek az S-nitrozilációs folyamatokban is) (Bian és mtsai, 2006, Souza és mtsai, 2008). A tirozin-nitráció „klasszikus" folyamata peroxinitritet használ fel. Peroxidázok (mieloperoxidáz, laktoperoxidáz, tormaperoxidáz) a nitritet és hidrogén-peroxidot felhasználva képeznek nitrotirozint. A nitrit hem jelenlétében nem enzimatikus reakcióban nitrálja a tirozint, ehhez szintén szükség van hidrogén-peroxidra (Bian és mtsai, 2006). A denitráció mechanizmusa még kevésbé tisztázott (Abello és mtsai, 2009). A nitrotirozin tartalmú fehérjék egy része a proteaszómák segítségével lebomlik. Mivel proteázgátlók jelenlétében is csökken a tirozinon nitrált fehérjék mennyisége, denitráz enzimek szerepe is valószínűsíthető (Ischiropoulos és Gow, 2005).

A nitráció célpontjai olyan tirozinok, amelyek a fehérjén belül meghatározott környezettel rendelkeznek. Ez a tirozin környezetében meghatározott kémiai tulajdonságokkal rendelkező aminosavak jelenlétét, és nem valamiféle konszenzus-szekvenciát jelent. A nitrált tirozin környezetében savas karakterű, valamint prolin

aminosavakat találunk az átlagosnál nagyobb, ellenben ként tartalmazó aminosavakat kisebb számban. A tirozin-nitráció sokszor olyan tirozin aminosavakon történik, amelyek foszforilálódhatnak is. Bár a nitráció nem a hidroxilcsoportot, hanem a fenolos gyűrűt érinti, gátlólag hat az aminosav foszforilációjára (Souza és mtsai, 2008). Más esetben (például a Src onkoprotein esetében) az autofoszforilált állapotot imitálva hozzájárul a fehérje aktivációjához. Gyulladásos folyamatok markereként is detektálják a peroxinitritből képződött nitrotirozint (Ryberg és Caidahl, 2007). A nitrált fehérjék fokozott immunválaszt válthatnak ki, szerepük lehet autoimmun folyamatokban. A nitrált fehérjék aggregátumokat is képezhetnek (például α-szinuklein a Parkinson-kórban megfigyelhető Lewy-testekben, tau-fehérje Alzheimer-kórban) (Souza és mtsai, 2008).

Az oxigén szabadgyökök által kiváltott oxidatív stresszhez hasonlóan, a nagyobb mennyiségű NO általános sejtkárosító hatást vált ki (ilyen körülmények között általában a nitrogén és oxigén szabadgyökök károsító hatása együtt érvényesül, hiszen mindkettő megtalálható a sejtben), melyet nitrozatív stressznek neveznek. Ezt a fogalmat a fehérjék, DNS, zsírsavak NO és származékai által történő, kovalens módosulásának (kémiailag pontatlan) összefoglaló neveként is használják. Kémiailag helyesen a fokozott S-nitroziláció megnevezése a nitrozatív stressz, míg a fokozott nitrációé a nitratív stressz. A nitrozatív stress végső soron sejthalálhoz vezethet (Heinrich és mtsai, 2013).

NO-donorok

A NO hatásának modellezésére kísérleti körülmények között sokszor NO-donorokat használnak. Ezek könnyebben adagolhatók a gáz halmazállapotú NO-hoz képest, viszont hátrányuk, hogy a NO mellett egyéb termékek is képződnek belőlük, és nem zárható ki, hogy a tapasztalt hatások egy részéért ezek a „melléktermékek” felelősek. Valamint nem biztos, hogy az adott donor-vegyület egyenletes sebességgel, illetve dózissal arányos mértékben termel NO-t (Li és Wogan, 2005, Brown, 2010). Antioxidánsok (vitaminok, glutation), illetve hemoglobin (mint a NO megkötője, inaktiválója) jelenléte a sejttenyésztő médiumban befolyásolja a NO hatását (Li és Wogan, 2005, Brown, 2010). Munkacsoportunk nitroprusszid-nátriumot (SNP, $Na_2[Fe(CN)_5NO]$) használ a kísérletei során. Ebből NO mellett nátrium-cianid képződik, valamint másodlagosan hozzájárul a sejtben oxigén szabadgyökök képződéséhez, illetve a képződő hidrogén-peroxid toxicitásához. A toxikus dózisú SNP-ből képződő nátrium-cianid azonban nem éri el azt a

koncentrációt, ami toxikus a sejtekre (Niknahad és O'Brien, 1996, Wink és mtsai, 1996, Yamada és mtsai, 1996, Babich és mtsai, 1998).

A NO szerepe a neuronális differenciáció jelátvitelében

Az NGF jelátvitele PC12 sejtekben

A munkám során használt PC12 patkány pheochromocytoma sejtek idegsejt növekedési faktor (NGF) hatására neuronális differenciációt mutatnak: megváltozik a fehérje-expressziós mintázatuk, leáll az osztódásuk, neuritokat növesztenek, sőt elektromos áram hatására ingerelhetőek lesznek (Dichter és mtsai, 1977). Az NGF hatásait a nagy affinitású TrkA (tropomyosin-related kinase A) receptor, illetve a nem csak NGF-re specifikus, és azt kis affinitással kötő p75 neurotrofin receptor (p75NTR) közvetíti. A TrkA receptor NGF kötését követően több jelátviteli útvonal párhuzamos aktivációja figyelhető meg: a Ras - extracelluláris szignál-regulálta kináz (ERK) útvonal tartós aktivációja szükséges a neuritnövekedéshez, a foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K) - Akt útvonal döntően a sejt túléléséért felelős, a foszfolipáz Cγ (PLCγ) útvonal szerepe a rendelkezésre álló adatok alapján kevésbé meghatározó (Szeberényi és Erhardt, 1994) (1. ábra).

Az aktivált NGF-receptorhoz adapter fehérjék közvetítésével kapcsolódó guanin-nukleotid kicserélő faktorok (GEF) aktiválják a Ras fehérjét. A Ras fehérje működését gátolhatjuk domináns gátló Ras mutáns expresszálásával. Az N17 mutáns RasH a GEF szekvesztrálásával a sejtben jelenlévő vad-típusú RasH aktivációját is gátolja (Farnsworth és Feig, 1991; Stacey és mtsai, 1991). A Ras fehérje aktivitása kritikus: a domináns gátló Ras-t expresszáló sejtvonalak NGF hatására nem képesek differenciálódni (Szeberényi és mtsai, 1990).

Az aktiválódott Ras fehérje a Raf és mitogén-aktivált protein kináz kináz (MKK) enzimek közreműködésével serkenti az ERK-et (Robbins és mtsai, 1992; Thomas és mtsai, 1992; Wood és mtsai, 1992). A tartós ERK-foszforiláció, valamint a fehérje nukleáris transzlokációja szükséges a neuronális differenciációhoz (Traverse és mtsai, 1992). Az ERK aktivációja gátolt Ras-funkció esetén nagymértékben gátolt (Boglári és mtsai, 1998) (1. ábra).

Az ERK-nek számos célfehérjéje van. Többek között a p90 riboszomális S6 kináz (p90RSK) fehérje közvetítésével aktiválja a cAMP-reszponzív elemet kötő (CREB)

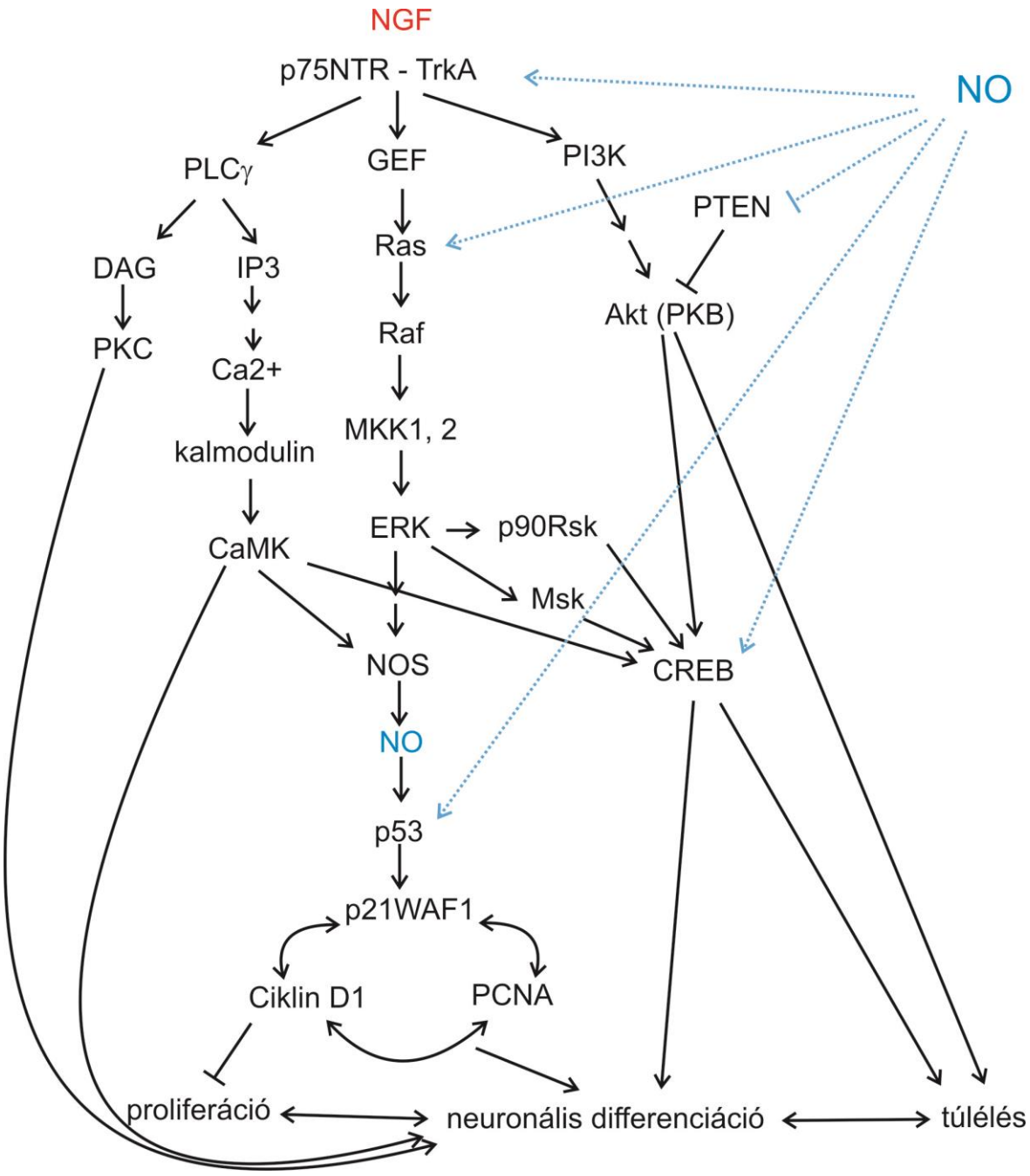
transzkripciós faktort. A CREB a Ras-ERK-en kívül számos más jelátviteli út (például cAMP-PKA, cGMP-PKG, Ca^{2+}-kalmodulin, PI3K-Akt) aktivációját követően is foszforilálódhat (Boglári és Szeberényi, 2002, DeCesare és mtsai, 1999, Du és Montminy, 1998). A CREB gátlásával is gátolható a neuronális differenciáció (Ahn és mtsai, 1998).

A Ras-ERK útvonal közreműködésével indukálódik a neuronális NOS is NGF-kezelt PC12 sejtekben (Schonhoff és mtsai, 2001). Az általa termelt NO hatására a p53 fehérje közreműködésével a p21WAF1 (wild-type p53-activated fragment 1) ciklin dependens kináz inhibitor indukálódik (Poluha és mtsai, 1997). A p21WAF1, mint a ciklin dependens kináz inhibitorok általában, a sejtciklus leállításáért felelős. A ciklin D1 mennyisége szintén megnövekszik, és ez a ciklin PC12 sejtekben a proliferáció serkentése helyett a differenciáció folyamatában játszik szerepet: az NGF hatására a p21WAF1 és ciklin D1 expresszió fokozódásával párhuzamosan lecsökken az S-fázisba lépő sejtek száma. Az S-fázisban lévő sejtek arányának csökkenését a DNS-polimeráz egyik alegységének, a PCNA-nak (proliferating cell nuclear antigen) csökkent expressziója jelzi (Yan és Ziff, 1995). Az NGF antiproliferatív hatása domináns gátló RasH-t expresszáló PC12 sejtekben nem érvényesül (Kiss és mtsai, 1998) (1. ábra).

Növekedési faktor receptorok aktivációjakor a PI3K foszfatidil-inozitol-biszfoszfát (PIP_2) foszforilálásával foszfatidil-inozitol-triszfoszfátot (PIP_3) termel, ez a PIP_3-függő kinázok (PDK) közreműködésével aktiválja a protein kináz B-ként is ismert Akt fehérjét. Az Akt fehérje számos célfehérjéje elsősorban a túlélési jelátvitelben játszik szerepet. A PIP_3 defoszforilálásával a foszfatáz és tenzin homológ (PTEN) fehérje felelős a PI3K hatásainak gátlásáért. Széruméheztetett PC12 sejtek apoptózisa kivédhető NGF adásával, ez viszont nem történik meg a TrkA mutáns nnr5 klónban (Loeb és Greene, 1993). Ennek hátterében a PI3K-Akt útvonal aktivációjának elmaradása állhat, hiszen a Ras fehérjék nem szükségesek a PC12 sejtek túléléséhez: egyrészt a domináns gátló RasH, RasK, illetve RasN fehérjét expresszáló sejtvonalak életképesek, másrészt NGF adásával kivédhető a széruméheztetéssel indukált apoptózisuk (Varga Judit, nem közölt eredmények). A differenciációhoz a PI3K-Akt jelátviteli út közvetlenül nem szükséges, bár egyes kutatócsoportok szerint pozitív szerepe lehet benne (Jackson és mtsai, 1996) (1. ábra).

A PLCγ útvonal szerepe a neuronális differenciációban ellentmondásos: egyes megfigyelések szerint nem szükséges az NGF-indukálta differenciációhoz (Loeb és mtsai,

1994), viszont a PLCγ, vagy a PKC kémiai gátlószerei gátolják a PC12 sejtek differenciációját (Kiss és mtsai, 2006) (1. ábra).



1. ábra: A NO szerepe a neuronális differenciáció jelátvitelében. →: aktiváció/indukció, →→: többlépcsős aktiváció/indukció, ┤: gátlás

A NO szerepe az NGF jelátvitelében

A NO önmagában nem idéz elő differenciációt PC12 sejtekben (Hindley és mtsai, 1997), a neuronális differenciáció folyamatában viszont fontos szerepet játszik. Ezt alátámasztja, hogy NOS-gátlók alkalmazása gátolja a differenciációt (Kalisch és mtsai, 2003). A NO által aktivált sGC-cGMP jelátviteli útvonal nem szükséges a PC12 sejtvonal neuronális differenciációjához (Phung és mtsai, 1999). Ennek alapján feltételezhető, hogy a tapasztalt hatások hátterében fehérjenitroziláció áll.

Több, a neuronális differenciáció jelátvitelében szerepet játszó fehérje potenciálisan nitrozilálható. A differenciáció szempontjából a nitrozilációjuknak serkentő és gátló szerepe egyaránt lehet, valamint a jelátviteli fehérjék közül többről még nem bizonyított, hogy *in vivo* körülmények között is nitrozilálódnak-e NGF-kezelés hatására. A tirozinon nitrozilált NGF a neuronális differenciáció és túlélés serkentése helyett a p75NTR receptor segítségével apoptózist indukál (Souza és mtsai, 2008). A Ras fehérje nitrozilációja önmagában nem aktiválja a fehérjét, azonban megkönnyíti annak GEF általi aktivációját (Lander és mtsai, 1997, Heo és Campbell, 2004). Az N17 domináns gátló Ras-mutáns nitrozilációt követően sem aktiválható (Jeong és mtsai, 2002). Az ERK aktivációja peroxinitrit jelenlétében is bekövetkezhet, akár a Ras-MKK út aktivációjától függetlenül. Az ERK fehérje S-nitrozilációja a foszforilációjának gátlását eredményezi, viszont csak nagy dózisú NO hatására következik be (Feng és mtsai, 2013; Liaudet és mtsai, 2009). A PTEN és Akt fehérjék szintén nitrozilálhatóak, ez mindkét fehérjét gátolja. A PI3K-utat gátló PTEN fehérje nitrozilációja kisebb koncentrációjú NO hatására következik be, ilyenkor az Akt fehérjekináz aktivitása fokozódik (Numajiri és mtsai, 2011). A már említetteknek megfelelően a CREB-et aktiváló jelátviteli utak közül a Ras-ERK, PI3K-Akt, cGMP-PKG utak befolyásolhatóak a NO által (1. ábra).

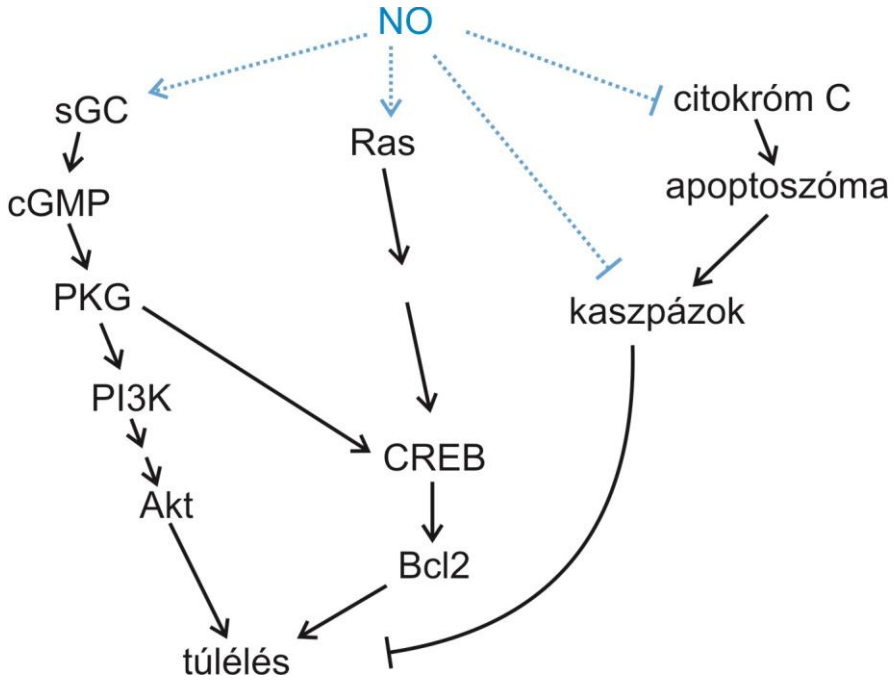
A p53 protein több tirozin aminosava is nitrálható. A tetramerizációs doménben lévő tirozin nitrációja kis mennyiségű NO hatására is bekövetkezik, és serkenti a p53 transzkripciós aktivitását (Kim és mtsai, 2011). Az NGF által is aktivált egyéb transzkripciós faktorok közül az AP1 (mind a Fos, mind a Jun alegysége), az Sp1 és az Egr1 S-nitrozilációja ismert, és gátolja ezen fehérjék DNS-hez kötődését (Sha és Marshall, 2012).

Differenciálatlan PC12 sejtekben a nitrált fehérjék jó része a citoszol frakcióból nyerhető ki. A neuronális differenciáció során nitrált fehérjék viszont zömükben a citoszkeleton fehérjéi, illetve a citoszkeletonhoz kapcsolódó fehérjék. Kimutatták az α-tubulin, a tau, valamint a periferin nitrációját NGF-fel kezelt PC12 sejtekben (Cappelletti és mtsai, 2004; Tedeschi és mtsai, 2005, 2007). A neurofilamentum könnyű lánca tirozinon nitrozilálódva viszont nem képes a neurofilamentum összeszerelésében részt venni (Souza és mtsai, 2008).

A NO antiapoptotikus hatásai

A NO kis koncentrációban citoprotektív hatású, nagyobb koncentrációban (ennek mértéke a sejttípus függvényében változik) sejthalált idéz elő. Növekedési faktor- illetve szérummegvonás, oxidatív stressz, halálligandok indukálta apoptózis kivédhető NO-dal. Elképzelhető, hogy a NO gyökfogóként működve mérsékli a szabadgyökök káros hatásait (Li és Wogan, 2005). Bizonyos sejttípusokban antiapoptotikus hatása a cGMP jelátviteli úton érvényesül. A PKG segítségével a PI3K-Akt útvonalat aktiválja, illetve a CREB foszforilációját és az antiapoptotikus hatású Bcl2 fehérje expresszióját fokozza. Más sejttípusokban a sGC-cGMP út szerepe kérdéses, így az antiapoptotikus hatás várhatóan nitrozilációs folyamatok eredménye (Kang és mtsai, 2004, Li és Wogan, 2005, Brown, 2010). Teng és munkatársai a Ras nitrozilációjának protektív szerepét igazolták (Teng és mtsai, 1999) (2. ábra).

Az antiapoptotikus hatás nemcsak a sejt túlélését segítő jelátviteli folyamatok aktiválásával, hanem az apoptózisban pozitív szerepet játszó fehérjék gátlásán keresztül is érvényesülhet. Például a nitrált citokróm c a nem nitráltnál kevésbé aktiválja az apoptoszómát (Souza és mtsai, 2008). Katalítikus doménjük S-nitrozilációjával a kaszpázok aktivációja gátolható (Brown, 2010, Shahani és Sawa, 2012) (2. ábra). Különböző, apoptotikus hatásnak nem kitett sejttípusokban detektálható a mitokondriumok intermembrán terében prokaszpáz-3, amely apoptotikus inger után már nem figyelhető meg (Mancini és mtsai, 1998). A nitroziláció elsősorban a mitokondriumhoz kötődő kaszpáz-3 fehérjékre jellemző, míg a citoszolban elhelyezkedő kaszpáz-3 általában nem nitrozilált (Gaston és mtsai, 2003).



2. ábra: A NO antiapoptotikus hatásai. →: aktiváció/indukció, →→: többlépcsős aktiváció/indukció, ┤: gátlás

A NO-indukálta sejthalál

Kellően nagy koncentrációban a NO nitrozatív stresszt indukál, így vezet sejthalálhoz. Az ehhez szükséges koncentráció sejttípusonként jelentősen eltérő: a szívizomsejtek, fogpulpasejtek pusztulásához vezető 3-4 mM SNP dózis a tízszerese a PC12 sejtek sejthalálához szükséges 200-400 μM SNP koncentrációnak (Chiusa és mtsai, 2012, Young Park és mtsai, 2013, Tamatani és mtsai, 1998). Nemcsak a szükséges dózis, hanem a sejthalál típusa is különbözhet: sejttenyészetben egyaránt találunk nekrózissal, apoptózis kaszpáz-függő, illetve -független típusával elpusztuló sejteket. A domináns sejthalál-típus a tenyésztési körülményeknek (például a tenyésztőmédium glükóz-koncentrációja), az aktuálisan használt sejttípus glikolítikus kapacitásának és egyéb tényezőknek a függvénye. Általában a NO kisebb koncentrációban inkább apoptózist, nagyobb koncentrációban inkább nekrózist okoz, természetesen ez sejttípusonként jelentősen különbözik (Li és Wogan, 2005). Az SNP PC12 sejtekben is egyaránt képes apoptózist és nekrózist előidézni, az alkalmazott koncentráció és a tenyésztőmédium összetétele függvényében (Bal-Price és Brown, 2000).

A NO által okozott nekrózis

A nagy koncentrációjú NO által okozott nekrózis hátterében az ATP-szintézis gátlása áll. Legfontosabb a légzési lánc I, II, IV, V komplexeinek irreverzibilis gátlása (Kang és mtsai, 2004) amiért fehérjenitroziláció felelős. Kisebb koncentrációjú NO reverzibilisen gátolja a citokróm c oxidázt (IV. komplex), mivel a fém központhoz kötődő NO az O_2 kötődésével kompetál (Ischiropoulos és Gow, 2005). Ilyenkor a sejt a glikolízis által tud ATP-t termelni (bár egyes enzimjeinek, például a GAPDH-nak a gátlását szintén leírták (Kang és mtsai, 2004), amennyiben ez nem elég, nekrózissal elpusztul. ATP hiányában a Ca^{++} pumpák elégtelen működése következtében Ca^{++} árasztja el a citoszolt, az ozmotikus viszonyok változása pedig a sejtmembrán károsodásához vezethet (Brown, 2010).

A NO által előidézett kaszpáz-független, programozott sejthalál

A poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) aktivációja szintén megtörténik NO hatására. A PARP többféle sejthalál-típusban is szerepet játszhat. Ez a DNS-repair enzim NAD^+-ot használ szubsztrátként, aminek pótlása ATP-t igényel. Az enzim túlzott aktivációjakor ATP-depléció lép fel, ami nekrotikus sejthalált eredményez (Brown, 2010).

A PARP-ot teszik felelőssé egy kaszpáz-független, programozott sejthalál-típus (amely a parthanatos nevet kapta) elindításáért (Galuzzi és mtsai, 2012) is. A PARP hatásának egyik fő közvetítője az apoptózis indukáló faktor (AIF), amely kaszpáz-független apoptózis és parthanatos kiváltásában is szerepet játszhat. Ez a nyugalmi sejtben mitokondriális fehérje felszabadulva a sejtmagba transzlokálódik. A sejtmagban endonukleáz-aktiváció révén indít el sejthalált, amely az apoptózishoz hasonlóan kromatin-kondenzációval jár (Cregan és mtsai, 2004, Brown, 2010, Galuzzi és mtsai, 2004).

Az apoptózisban kulcsszerepet játszó aktivált kaszpázok a PARP-ot is elhasítják. A PARP hasított formája inaktív, így nem okoz ATP-depléciót, ezáltal az apoptózis felé lendíti a sejthalál folyamatát (Blaise és mtsai, 2005).

A NO proapoptotikus hatásai

A PI3K által termelt PIP_3 serkenti az Akt kináz működését, amely számos célfehérje foszforilálásán keresztül központi szerepet tölt be PC12 sejtek és számos más

sejttípus túlélésében (Yao és Cooper, 1995; Luo és mtsai, 2003). Az Akt fehérje inaktiválása önmagában többféle sejthalál kiváltója lehet (Luo és mtsai, 2003). A PI3K-Akt jelátviteli útvonal működését több ponton befolyásolja a NO: alacsonyabb koncentrációban nitrozilációval gátolja a PTEN fehérje működését, míg magasabb koncentrációban az Akt enzim működését is. Ennek megfelelően alacsonyabb dózisú NO összességében serkenti az Akt fehérje aktivitását, míg magasabb koncentrációban a gátlás érvényesül (Numajiri és mtsai, 2011) (3. ábra).

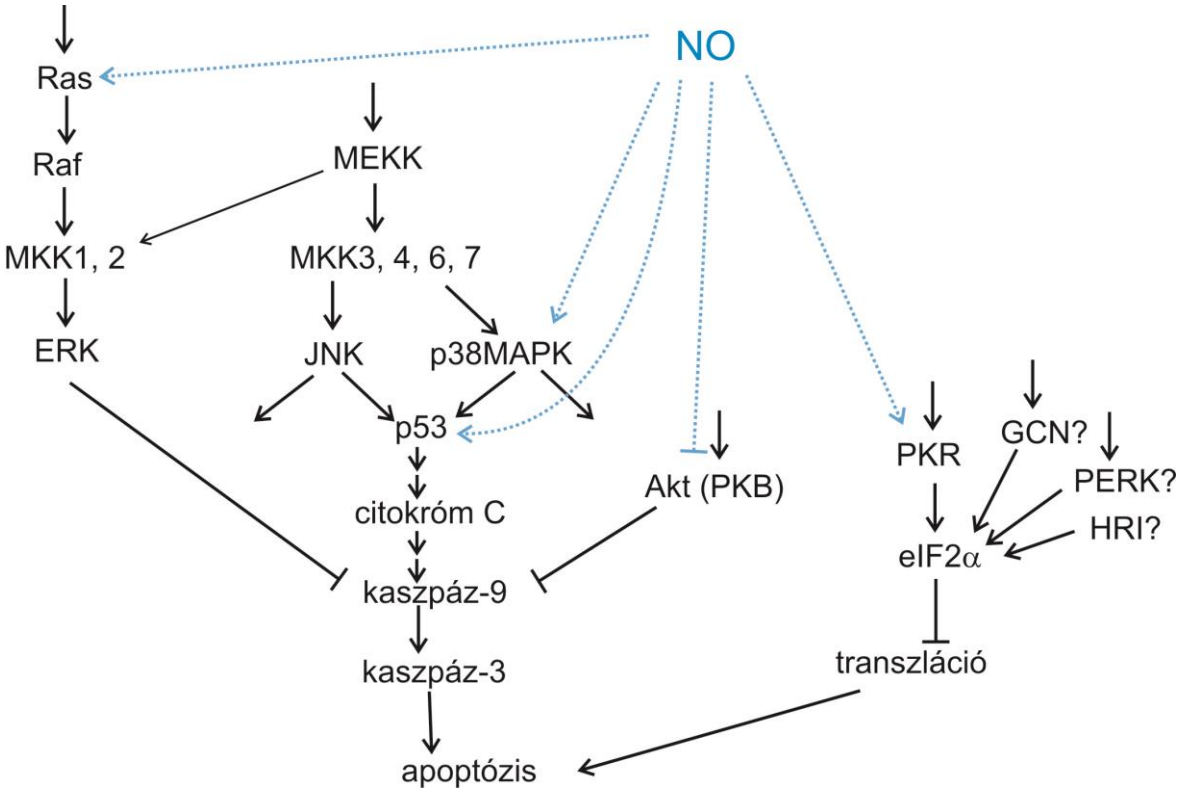
A MAPK-ok családjába tartozó stresszkinázok (c-Jun N-terminális kináz /JNK/ és p38 mitogén aktivált protein kináz /p38MAPK/) a legkülönfélébb celluláris stresszhatásokra, többek között nagy dózisú NO-kezelésre aktiválódnak (Han és mtsai, 2001; Li és mtsai, 2004). Számos célfehérjét (köztük a p53-at is) foszforilálnak a sejt stresszválasza érdekében. Átmeneti aktivációjuk a túlélést is serkentheti, tartós aktivációjuk apoptózishoz vezet (Matsuzawa és Ichijo, 2001) (3. ábra).

A NO farmakológiai dózisban endoplazmatikus retikulum (ER) stresszt is előidéz. A protein diszulfid izomeráz (PDI) S-nitrozilációja annak diszulfid izomeráz aktivitását gátolja (Shahani és Sawa, 2012). A nem megfelelő térszerkezetű fehérjék felhalmozódása a sejtben úgynevezett „unfolded protein response”-t (UPR) vált ki. A stresszválasz részeként a transzlációs aktivitás csökken. Ennek mechanizmusa, hogy a foszforilált eukarióta transzlációs iniciációs faktor 2 α-alegységének (eIF2α) jelenlétében a cap-függő transzláció iniciációja gátolt. Az eIF2α foszforilációját több különböző (és más-más körülmények közt aktiválódó) fehérjekináz képes végrehajtani: a protein kináz R (PKR), a PKR-szerű endoplazmatikus retikulum kináz (PERK), a GCN (general control non-derepressible) és a hem-regulált inhibitor kináz (HRI). Az eIF2α foszforilációja nem gátolja cap-től független transzlációra alkalmas mRNS-eken a fehérjeszintézist. Ezek a mRNS-ek az UPR-ben szerepet játszó fehérjéket kódolnak. Az aktiváló transzkripciós faktor 4 (ATF4) szintézise is az eIF2α foszforilációjakor következik be. Az eIF2α tartós foszforilációja a cap-függő transzláció iniciációjának általános gátlásával apoptózishoz vezethet (3. ábra). Ilyenkor többek között az ATF4 transzkripciós faktor hatására a C/EBP homológ protein (CCAAT/enhancer binding protein homologous protein, CHOP) indukálódik. Ez a transzkripciós faktor az ER stressz okozta apoptózis közvetítője (Brown, 2010, Tong és mtsai, 2011).

A p53 fehérje kezeletlen sejtekben is expresszálódik. Celluláris stresszhatás nélkül a p53 fehérje mennyisége mégis kevés, mert a képződött fehérje az ubikvitin-proteaszóma rendszer által lebomlik. Különféle celluláris stresszhatásokra, illetőleg stimulusokra stabilizálódhat, így a mennyisége emelkedik. A stabilizációjában különféle poszttranszlációs módosulások (többek között a fehérje foszforilációja) vesznek részt. A p53 fehérje ilyenkor antimitogén hatást fejt ki vagy apoptózist indukál. Komoly szerepe van az idegrendszer fejlődésében is (Tedeschi és DiGiovanni, 2009). A 15. pozíciójú szerinen például NO hatására bekövetkezett foszforiláció gátolja a p53 fehérje magból történő exportját, ezáltal a proteaszomális lebontását (Schneiderhan és mtsai, 2003). A p53 fehérje aktivációjával az apoptózis mitokondriális (intrinszik) útvonala aktiválódik. A p53 apoptózist előidéző hatását a sejtmagban (mint transzkripciós faktor), vagy közvetlenül a mitokondriumra hatva fejtheti ki. A proapoptotikus Puma és Noxa fehérjék indukálásával, valamint az antiapoptotikus Bcl2 és Bcl-xL fehérjék represszálásával a mitokondriumokból apoptózist előidéző fehérjék (mint a citokróm c és az AIF) szabadulnak fel. A p53 fehérje közvetlen mitokondriális hatásainak pontos mechanizmusa még nem világos: a Bax és/vagy Bak aktiválására, illetve Bcl2 vagy Bcl-xL inaktiválására is találunk adatokat (Li és Wogan, 2005, Brown, 2010, Lindenboim és mtsai, 2011). Működésképtelen p53 fehérjét expresszáló limfoblaszt sejtek kevésbé érzékenyek a NO citotoxikus hatására (Wang és mtsai, 2003). A kaszpáz-9 és -3 hasításával aktiválódó kaszpáz-kaszkád teljesíti ki az apoptózis folyamatát (3. ábra). A kaszpázok aktivációja nitrozatív stressz hatására ellentmondásos: egyrészt S-nitrozilációjuk gátolja az aktivitásukat. Másrészt hasított, aktív formájuk a citoszolban a XIAP-hoz (X-linked inhibitor of apoptosis) kapcsolódik, amely E3 ubikvitin ligáz aktivitásával az aktivált kaszpázok proteaszomális lebontását idézi elő. A nitrozilált kaszpáz-3 viszont a XIAP transznitrozilázaként működik. A XIAP S-nitrozilációja gátolja annak E3 ligáz aktivitását, ez végül az aktív kaszpázok felhalmozódásához vezet (Anand és Stamler, 2012, Shahani és Sawa, 2012).

A glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) normális körülmények között a glikolízis egyik enzimjeként a citoszolban aktív. A GAPDH S-nitrozilációja masszív nitrozatív stressz esetén gátolja annak katalítikus aktivitását, ellenben ez teszi lehetővé a citoszolban a Siah1-hez (Siah, seven in absentia homolog) kötődését. Ez egy nukleáris lokalizációs szignállal rendelkező fehérje, amely a GAPDH-val együtt a sejtmagba

transzlokálódik. A Siah1 E3 ubikvitin ligázként nukleáris fehérjék lebomlását idézi elő, ami sejthalálhoz vezet (Brown, 2010, Shahani és Sawa, 2012).



3. ábra: A NO proapoptotikus hatásai. →: aktiváció/indukció, →→: többlépcsős aktiváció/indukció, ┤: gátlás

Néhány példa a NO jelentőségére patológiás folyamatokban

Számos adat utal arra, hogy a túlzott mennyiségben, illetve nem megfelelően szabályozott módon termelődő NO szerepet játszik a neurodegeneratív betegségek kialakulásában. A túlzott mennyiségű NO jelenléte nem megfelelő konformációjú fehérjék felhalmozódásához vezethet, mert többek között a protein diszulfid izomeráz (PDI) és a HSP90 hősokk fehérje enzimaktivitását gátolja az S-nitrozilációjuk (Martinez és mtsai, 2011; Tong és mtsai, 2011). Az abnormális szerkezetű fehérjéket az ubikvitin-proteaszóma rendszer lebontja. Ilyen körülmények között azonban a lebontásukat akadályozza, hogy az E3 ubikvitin ligázok közé tartozó parkin S-nitrozilációja szintén gátolja a fehérje működését. A HSP90 kóroki szerepét leírták Alzheimer-kórban (a tau és az amiloid-béta fehérjék szolubilis állapotban tartása lenne a feladata), míg a parkin és a PDI mind a Parkinson-, mind az Alzheimer-kór kialakulásában szerepet játszik, hasonlóan

a sejtmagban felhalmozódott, ott proapoptotikus hatású GAPDH-hoz. Az apoptózist gátló XIAP ugyan nagyobb mennyiségben van jelen Parkinson- és Alzheimer-kórban szenvedő betegek idegsejtjeiben, azonban S-nitrozilálódva nem képes kifejteni antiapoptotikus hatását (Brown, 2010, Shahani és Sawa, 2012). Sokféle idegrendszeri kórképben gyulladásos reakció, mikroglia és asztrocita aktiváció figyelhető meg. Ezekben a sejtekben citokinek hatására iNOS indukálódik és nagyobb mennyiségű NO-t termelhet, mely a környező idegsejteket elpusztítja (Blaise és mtsai, 2005, Brown, 2010).

A NO indukálta apoptózisban kulcsszerepet játszik a p53 fehérje, ezért NO jelenlétében az esetleges p53-mutáció előnyös a sejtek túlélése és proliferációja szempontjából. Tehát a NO jelenléte és a p53 mutációja együttesen potenciálisan hozzájárulhat a daganatképződéshez (Li és Wogan, 2005).

Célkitűzések

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

PC12 sejtek NGF indukálta neuronális differenciációja során igazolni kívántam:

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

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

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

Kísérleti anyagok és módszerek

Felhasznált anyagok és sejtkultúrák

Kísérleteinkhez vad-típusú PC12 patkány pheochromocytoma sejtvonalat (Greene és Tischler 1976), valamint ennek különböző szubklónjait használtuk. A domináns gátló RasH-t nagy mennyiségben expresszáló sejtvonal neve M-M17-26 (Szeberényi és mtsai, 1990). Az nnr5 sejtvonalat, amely TrkA-t nem expresszál, kémiai mutagenezissel hozták létre (Green és mtsai, 1986). A sejtvonalakat 5% hőinaktivált fötális borjúszérummal és 10% szintén hőinaktivált lószérummal kiegészített, 4.5 g/l glükózt tartalmazó Dulbecco által módosított Eagle médiumban (DMEM) tenyésztettük. Nitrogén-oxid donorként nitroprusszid nátriumot (SNP) alkalmaztunk. Az SNP-t és a DMEM-et a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől szereztük be, a szérumokat és az NGF-et az Invitrogen-től (Paisley, Skócia, Nagy-Britannia) vásároltuk.

A proliferáció vizsgálata

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

Western-blot analízis

Lemezenként 5 x 10^6 sejtet ültettünk ki 100 mm-es tenyésztőlemezre. A különböző dózisú SNP-vel és/vagy NGF-fel történő kezelések végén fehérjét izoláltunk. A sejtek líziséhez proteáz- és foszfatázgátlókkal kiegészített RIPA puffert használtunk (1% NP-40, 0.5% nátrium dezoxikolát, 0.1% SDS, 1 x PBS pH 7.3 pufferben oldva, összetevőit a Sigma-Aldrich-tól vásároltuk). A kaszpázok kimutatásához Chaps-pufferrel (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) izoláltunk fehérjéket. A puffert ebben az esetben 5 mM ditiotreitollal (Cell Signaling Technology) és 1 mM fenilmetánszulfonil-fluoriddal (Sigma-Aldrich) egészítettük ki. A fehérjelizátumokat (30-50 μg fehérjét) 0.1% SDS-tartalmú 12-15%-os poliakrilamid gélben elektroforézissel elválasztottuk, PVDF

membránra transzferáltuk. A következő antitesteket használtuk: anti-P-Akt(Ser473), anti-Akt, anti-hasított kaszpáz-9, anti-hasított kaszpáz-3, anti-P-CREB(Ser133), anti-P-eIF2α, anti-eIF2α, anti-P-ERK, anti-P-JNK, anti-JNK, anti-P-p38, anti-p38, anti-P-p53(Ser15) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA); anti-p21, anti-p53, anti-PCNA, anti-ERK1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anti-PKR (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA); HRP-konjugált másodlagos – anti-nyúl illetve anti-egér – antitestek (Pierce Biotechnology, Rockford, IL USA). A membránokat ECL-reakciót követően Kodak géldokumentációs rendszer segítségével fényképeztük.

A differenciáció morfológiai vizsgálata

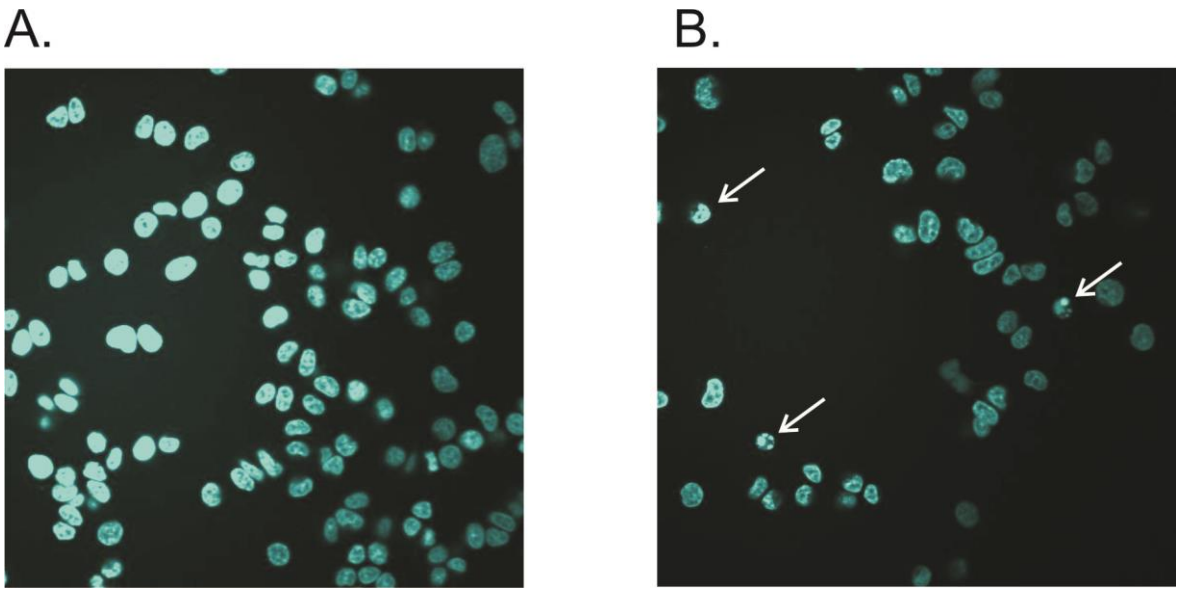
A neuronális differenciáció vizsgálatához lyukanként 10^3 sejtet ültettünk ki 24 lyukú sejttenyésztő lemezre. Másnap, illetőleg 3 nap múlva ismételten SNP-vel és/vagy NGF-fel kezeltük a sejteket. A differenciálódott sejtek arányát 2, 4 és 6 napos kezelés után mikroszkópos vizsgálattal határoztuk meg, mintánként 200 sejtet értékelve. Azokat a sejteket tekintettük differenciáltnak, amelyek legalább egy, a sejtátmérővel megegyező hosszúságú vagy annál hosszabb neuritot növesztettek. Az eredmények statisztikai analízisét Student-féle t-próbával végeztük. Szignifikánsnak a $p<0.05$ értékeket tekintettük.

A sejtek életképességének vizsgálata

Az élő sejtszám biokémiai meghatározásához WST-1 esszét használtunk (az esszé beállítását Fábián Zsolt végezte laboratóriumunkban /Fábián és mtsai, 2007/). A reagens /4-[3-(4-jodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzén diszulfonát, WST1 (Roche Hungary Ltd., Budapest, Magyarország)/ egy, az élő sejtek mitokondriális dehidrogenázai által átalakított formazánsó. Lyukanként 2 x 10^4 sejtet ültettünk ki 24 lyukú sejttenyésztő lemezre. Másnap különböző koncentrációjú SNP-oldattal kezeltünk. A 3 napos kezelési idő lejártakor a sejteket 10%-os WST-1 reagens-oldattal inkubáltuk 4 órán keresztül. Az átalakítását követően sárgás színű formazán termék kontrollhoz viszonyított fényelnyelését ELISA-olvasó segítségével, 450 nm hullámhosszon határoztuk meg. Az eredmények statisztikai analízisét Student-féle t-próbával végeztük. Szignifikánsnak a $p<0.05$ értékeket tekintettük.

A magmorfológia vizsgálata

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



4. ábra: Kontroll (A) és 200 μM SNP-vel kezelt (B) PC12 sejtek magmorfológiája Hoechst-festéssel láthatóvá téve

A DNS-fragmentáció vizsgálata

Lemezenként 5 x 10^6 sejtet ültettünk ki 100 mm-es tenyésztőlemezre. A különböző dózisú SNP-vel végzett kezelés után a sejteket a saját médiumukba kapartuk fel, 2000 fordulat/perc sebességgel, 5 percig centrifugáltuk, és 0.5 % Triton-X 100, 5 mM Tris pH 7.4, 5 mM EDTA tartalmú pufferben (összetevőit a Sigma-Aldrich-tól vásároltuk) lizáltuk.

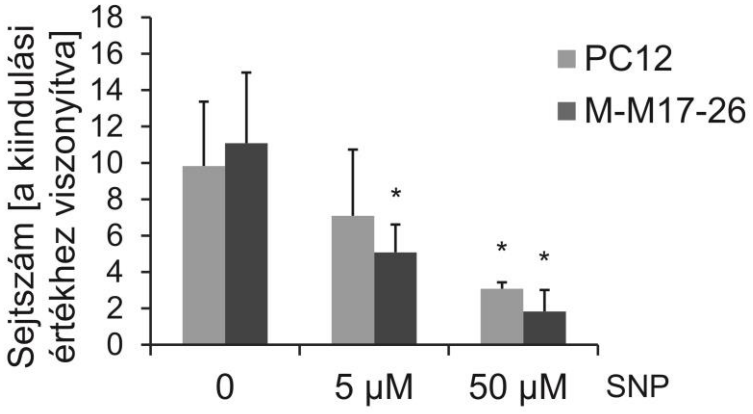
A centrifugálás utáni felülúszóból DNS-t izoláltunk fenol-kloroformos fehérjekicsapást alkalmazva, majd RNáz (Invitrogen) emésztés után 1.8%-os agaróz gélben futtattuk a mintákat (Yao és Cooper, 1995). DNS-festékként etídium-bromidot (Sigma-Aldrich) vagy SYBR Goldot (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) használtunk. A géleket Kodak géldokumentációs rendszerrel fotóztuk.

Eredmények

A citotoxikusnál kisebb koncentrációjú SNP hatásai

Az SNP Ras-független úton gátolja a sejtproliferációt

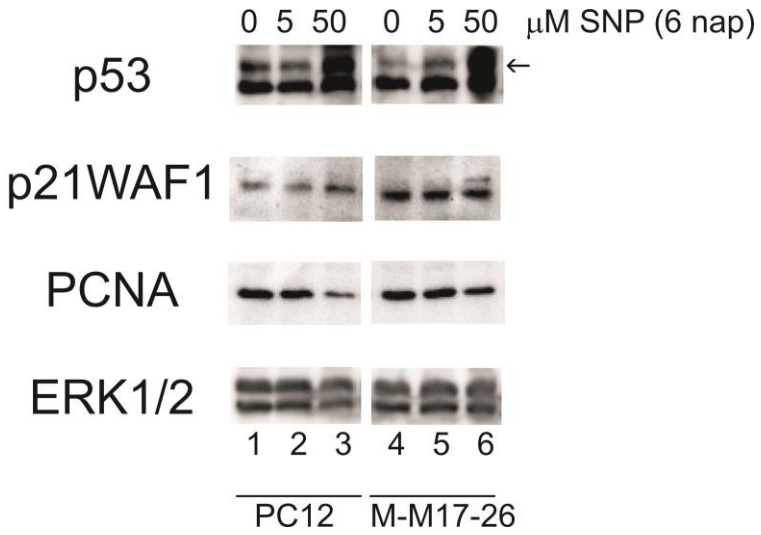
A NO sejtproliferációt gátló hatása régóta ismert (Peunova és Enikolopov, 1995). Tesztelésére vad-típusú PC12 és domináns gátló RasH-t erőteljesen expresszáló M-M17-26 sejtjeinket 5 vagy 50 µM koncentrációjú SNP-vel kezeltük 6 napon keresztül. Az alkalmazott dózissal arányos mértékű volt a NO proliferációt gátló hatása mind a vad-típusú PC12, mind az M-M17-26 sejtvonalban. Az antiproliferatív hatás PC12 sejtekben 50 µM SNP, M-M17-26 sejtekben már 5 µM SNP hatására szignifikáns volt a kezeletlen sejtekhez képest (5. ábra).



5. ábra: Az SNP hatása vad-típusú PC12 és M-M17-26 sejtek proliferációjára. 6 napos, az ábrán jelzett koncentrációjú SNP kezelés után a sejteket tripszin segítségével összegyűjtöttük, és meghatároztuk a sejtszámot a kiindulási értékhez viszonyítva. A hibajelek 3 független kísérlet szórását mutatják. A szignifikáns különbségeket *-gal jeleztük (* $p<0.05$ a kezeletlen mintához viszonyítva).

Mivel ismert, hogy az NGF antiproliferatív hatását a Ras-ERK-p53-p21WAF1 jelátviteli út közvetíti (Poluha és mtsai, 1997, Schonhoff és mtsai, 2001), vizsgáltuk, hogy ezek a fehérjék felelősek-e az SNP antiproliferatív hatásának közvetítéséért is.

Hat napig tartó, 5 vagy 50 μM SNP kezelést követően a p53, p21WAF1 és PCNA fehérjék expressziójának változását vizsgáltuk. A p53 fehérje az SNP-vel kezelt vad-típusú PC12 sejtekben dózisfüggően indukálódott. Ugyancsak dózisfüggő p53-indukciót láttunk M-M17-26 sejtekben, ami arra utal, hogy a p53 fehérje NO hatására Ras-független úton keresztül indukálódott (6. ábra). PC12 sejtekben megnőtt a p21WAF1 mennyisége is SNP-kezelésre (6. ábra). M-M17-26 sejtekben viszont magas p21WAF1 alapexpressziót detektáltunk, mely SNP-kezelés hatására sem változott (6. ábra). Az SNP sejtosztódást gátló hatásával összhangban az S-fázis marker PCNA expresszióját mindkét sejtvonalban gátolta az SNP-kezelés (6. ábra).

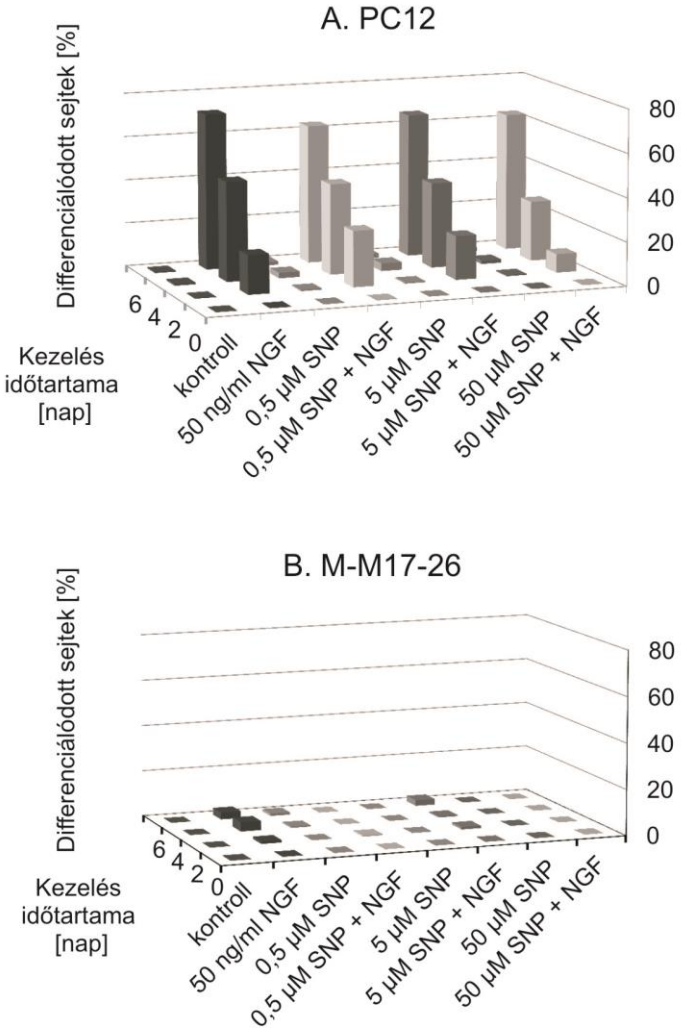


6. ábra. Az SNP hatása a p53, p21WAF1 és PCNA fehérjék expressziójára. 6 napos, az ábrán jelzett koncentrációjú SNP-kezelés után fehérjét izoláltunk, és anti-p53, anti-p21WAF1 és anti-PCNA antitestet használva Western-blot analízist végeztünk. Az anti-ERK1/2 antitestet mennyiségi kontrollként használtuk.

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

PC12 sejtekben 0.5, 5 vagy 50 μM koncentrációjú, maximum 6 napos SNP-kezelés önmagában nem idézett elő differenciációt (7.A ábra). 50 ng/ml NGF hatására a sejtek differenciálódni kezdtek, amely 2 nap múlva már szignifikáns volt a kontrollhoz viszonyítva, és 6 nap alatt elérte a 64 %-ot. Az NGF-fel együtt adott 5 μM SNP átmenetileg gyorsította a neuritnövekedést, hiszen 2 napos kombinált kezelés után a

differenciálódott sejtek száma szignifikánsan magasabb volt a csak NGF-fel kezelt sejtekéhez képest, de 4 és 6 napos kezelés után már nem volt szignifikáns különbség az NGF-fel, valamint az NGF és SNP kombinációjával kezelt minták között (7.A ábra). 50 μM SNP némileg lassította az NGF indukálta differenciációt, minden számolási napon szignifikánsan alacsonyabb számú differenciálódott sejtet találtunk (7.A ábra). M-M17-26 sejtek nem differenciálódtak sem a különböző dózisú SNP, sem 50 ng/ml NGF-kezelés hatására (7.B ábra). Mivel az SNP az M-M17-26 sejtek proliferációját is gátolta (5. ábra), megkíséreltük SNP-vel és NGF-fel együtt kezelve előidézni az M-M17-26 sejtek differenciációját, ez azonban egyik alkalmazott SNP-dózissal sem sikerült (7.B ábra). Kis dózisú NO, illetve a sejtciklus gátlása tehát nem képes oldani a Ras/ERK út blokkjának differenciációt gátló hatását.



7. ábra: Az SNP és NGF hatása vad-típusú PC12 (A) és M-M17-26 sejtek (B) neuronális differenciációjára. Az ábrán jelzetteknek megfelelően kezeltük a sejteket,

majd meghatároztuk a neurittal rendelkező sejtek százalékos arányát. A szignifikáns különbségeket a szövegben jeleztem.

Az SNP nem fokozza az NGF ERK-foszforilációt serkentő hatását

Az irodalmi adatok alapján várható módon az 50 ng/ml dózisú NGF-kezelés erőteljes ERK-foszforilációt eredményezett PC12 sejtjeinkben. Vad-típusú PC12 sejtekben az SNP kezelés által előidézett ERK-foszforiláció az NGF hatásához képest elenyésző volt. Az SNP és az NGF együttes adásakor az ERK foszforilációja nem fokozódott tovább a csak NGF-fel kezelt mintához viszonyítva (8. ábra). Az ERK fehérje aktivációját a domináns gátló RasH jelenléte nagymértékben gátolta mind az NGF-fel, mind az SNP-vel kezelt M-M17-26 sejtekben. Ebben a sejtvonalban a kombinált SNP és NGF kezelés sem indukált a PC12 sejtekéhez hasonló mértékű ERK-foszforilációt (8. ábra).

Az SNP nem befolyásolja az NGF által indukált Akt-foszforilációt

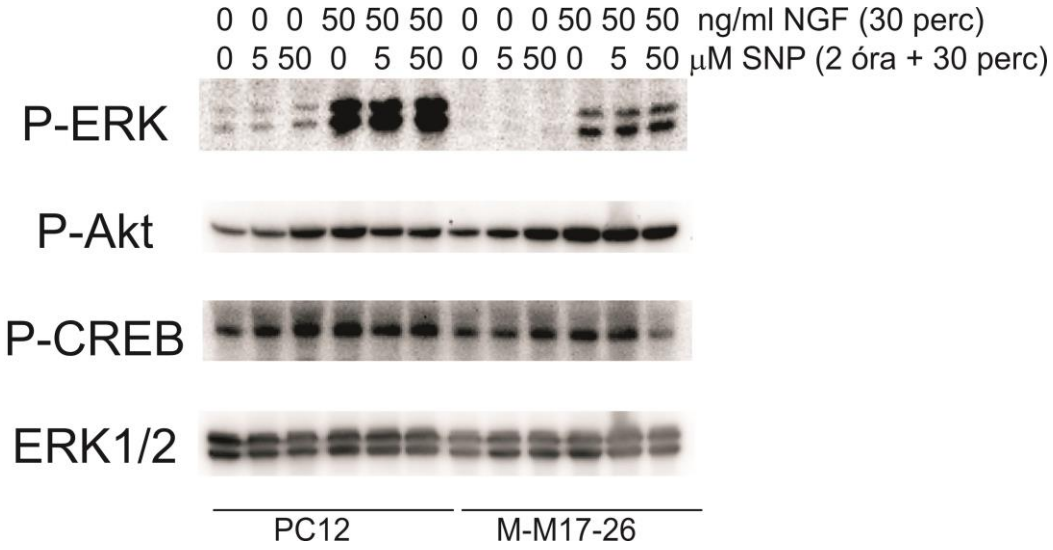
Az Akt fehérje PC12 sejtekben NGF hatására Ras-független jelátviteli úton keresztül foszforilálódva aktiválódik (Yao és Cooper, 1995).

Az Akt foszforilációja 473. pozíciójú szerin aminosavon ennek megfelelően NGF-kezelés hatására mindkét sejtvonalban fokozódott (8. ábra). Nem toxikus koncentrációjú SNP a dózissal arányosan mindkét sejtvonalban kissé serkentette az Akt foszforilációját, viszont kombinált kezelés esetén nem fokozta az NGF hatását (8. ábra).

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

Kísérleteinkben a CREB fehérje foszforilációs helyei közül a 133. pozíciójú szerin aminosav foszforilációját vizsgáltuk, mert az NGF jelátvitelében ez játszik kulcsszerepet. Ez a foszforiláció aktiválja a CREB transzkripciós faktort (DeCesare és mtsai, 1999).

NGF-kezelés hatására az irodalom alapján elvárt módon vad-típusú PC12 sejtekben erőteljes CREB-foszforilációt detektáltunk (8. ábra). Az alkalmazott 5 és 50 μM SNP-kezelés is a CREB dózisfüggően fokozott foszforilációjához vezetett PC12 sejtekben. 50 μM SNP hatására a CREB foszforilációja az NGF-kezelt mintáéhoz hasonló mértékű volt (8. ábra). Az SNP hatása nem szinergisztikus az NGF-kezelés által előidézett foszforilációval (8. ábra). M-M17-26 sejtekben a CREB foszforilációja nem fokozódott sem SNP, sem NGF-kezelés hatására, valamint a két szer együttes adásakor sem (8. ábra).



8. ábra: ERK-, Akt- és CREB-foszforiláció SNP- és NGF-kezelés hatására vad-típusú PC12 és M-M17-26 sejtekben. 2 órás, az ábrán jelzett koncentrációjú SNP-előkezelés, majd 30 perces, az SNP jelenlétében folytatott NGF-kezelés után fehérjét izoláltunk, és anti-P-ERK, anti-P-Akt(Ser473), valamint anti-CREB(Ser133) antitestet használva Western-blot analízist végeztünk. Az anti-ERK1/2 antitestet mennyiségi kontrollként használtuk.

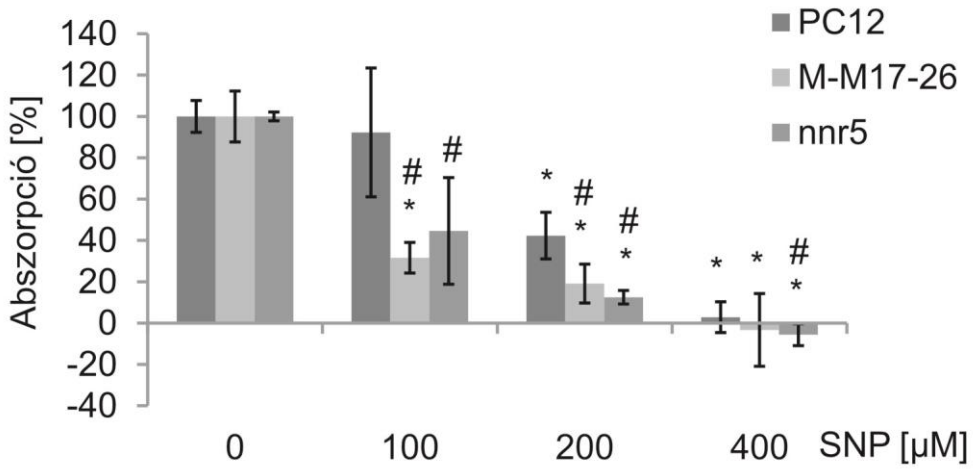
Citotoxikus koncentrációjú SNP hatásai

Kísérleteink első részében különböző tesztek segítségével meghatároztuk az SNP citotoxikus koncentrációját különböző jelátviteli fehérjéket expresszáló PC12 klónjainkban.

Az SNP hatása a sejtek életképességére

Az élő sejtszám meghatározására egy indirekt, biokémiai tesztet használtunk. A funkcióképes mitokondriális dehidrogenázok által sárgás termékké alakított WST-1 reagens színváltozását kvantitáltuk különböző dózisú SNP-vel kezelt mintáinkban. A WST-1 esszé szerint a vad-típusú PC12 sejtek életképessége szignifikánsan csökkent 200 μM SNP hatására, míg 400 μM gyakorlatilag teljes sejtpusztulást idézett elő (9. ábra). A domináns gátló RasH-t expresszáló M-M17-26 sejtvonal érzékenyebbnek bizonyult az SNP citotoxikus hatására, mint a vad-típusú PC12 sejtek, már 100 μM SNP szignifikáns sejtpusztulást okozott. A TrkA-t nem expresszáló nnr5 sejtvonal szintén, minden

alkalmazott dózis esetén érzékenyebb volt az SNP toxikus hatására, mint a vad-típusú PC12 sejtek.



9. ábra. Az SNP hatása vad-típusú PC12, M-M17-26 és nnr5 sejtek túlélésére. A sejteket 3 napig az ábrán jelzett dózisú SNP-vel kezeltük, majd WST-1 esszé segítségével meghatároztuk a mitokondriális dehidrogenázok enzimaktivitását. A hibajelek 3 független kísérlet szórását mutatják. A szignifikáns különbségeket jeleztük (* $p<0.05$ a kezeletlen mintához viszonyítva, # $p<0.05$ az azonos módon kezelt PC12 sejtekhez viszonyítva).

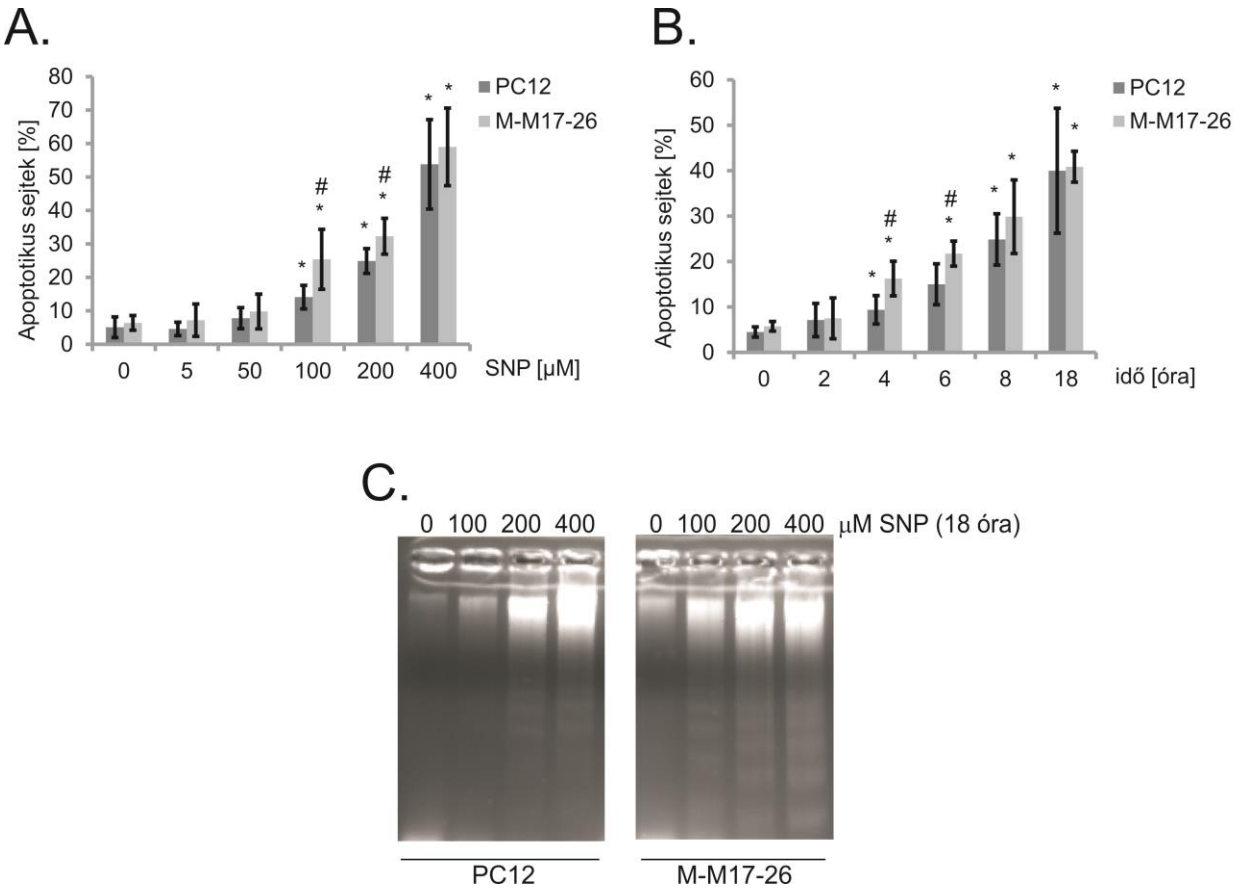
Az SNP apoptotikus hatásának kimutatása a kromatinban

A kromatin-kondenzáció megjelenése apoptózist, esetleg apoptózis-szerű sejthalált valószínűsít (Bröker és mtsai, 2005, Tait és Green, 2008). Kondenzált kromatinú sejtmagok mind a vad-típusú PC12, mind az M-M17-26 sejtvonal (minimum 100 μM dózisú, illetve minimum 4 órás) SNP-kezelését követően megjelentek, M-M17-26 sejtek esetében mind az alkalmazott dózis, mind a kezelési idő (100-200 μM illetve 4-6 óra után) függvényében szignifikánsan nagyobb arányban, mint PC12 sejtek esetében (10.A és B ábra).

Az apoptózis markereként tartja számon az irodalom a nukleázok által internukleoszomálisan végrehajtott DNS-fragmentációt. Az ilyen körülmények között hasított DNS agarózgélben megfuttatva létraszerű képet eredményez (Galuzzi és mtsai,

2012). Vad-típusú PC12 sejtekben ehhez 200 μM SNP szükséges (10.C ábra), míg M-M17-26 sejtekben a DNS-fragmentáció már 100 μM SNP hatására kimutatható mértékű volt.

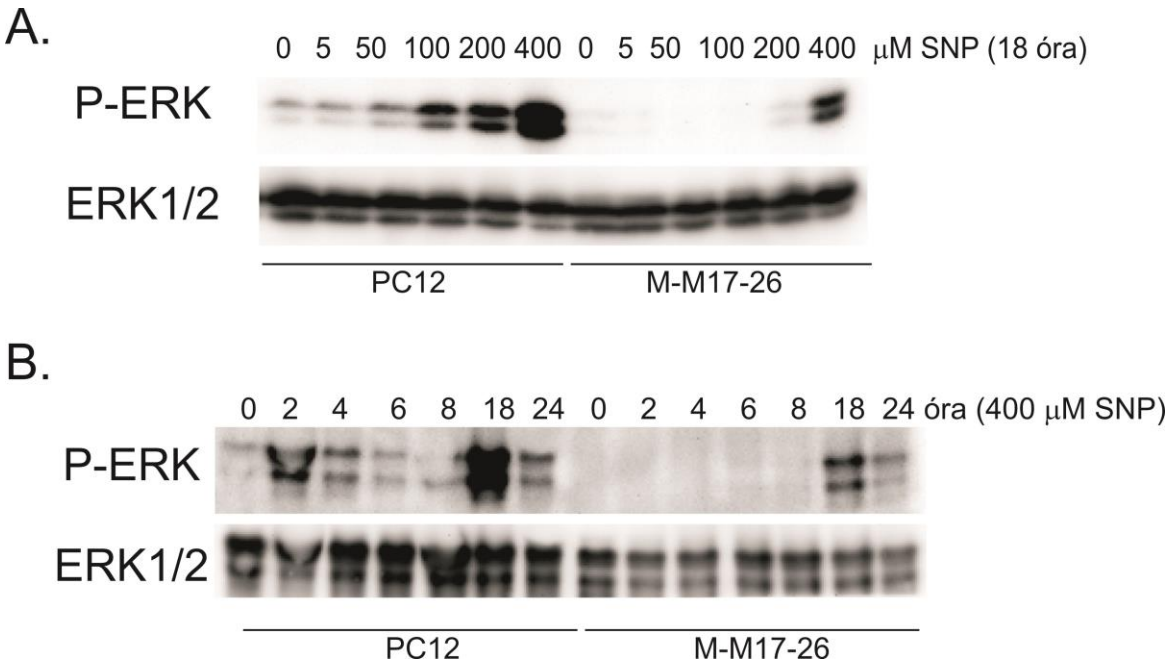
Az általunk alkalmazott tesztek alátámasztják, hogy a továbbiakban vizsgált M-M17-26 sejtvonal valamivel érzékenyebb az SNP citotoxikus hatására, mint a vad-típusú PC12 sejtek, valamint, hogy a domináns sejthalál-típus SNP-kezelt sejtjeinkben az apoptózis.



10. ábra. Az SNP apoptotikus hatásának vizsgálata vad-típusú PC12 és M-M17-26 sejtekben. Apoptotikus sejtek kvantifikálása különböző dózisú 18 órás SNP-kezelést követően (A). Apoptotikus sejtek aránya különböző időtartamú 400 μM dózisú SNP-kezelést követően (B). Apoptotikus DNS-fragmentáció kimutatása (C). A hibajelek legalább 3 független kísérlet szórását mutatják. A szignifikáns különbségeket jeleztük (*$p<0.05$ a kezeletlen mintához viszonyítva, # $p<0.05$ az azonos módon kezelt PC12 sejtekhez viszonyítva).

Az SNP-kezelés kétfázisú ERK-foszforilációt idéz elő

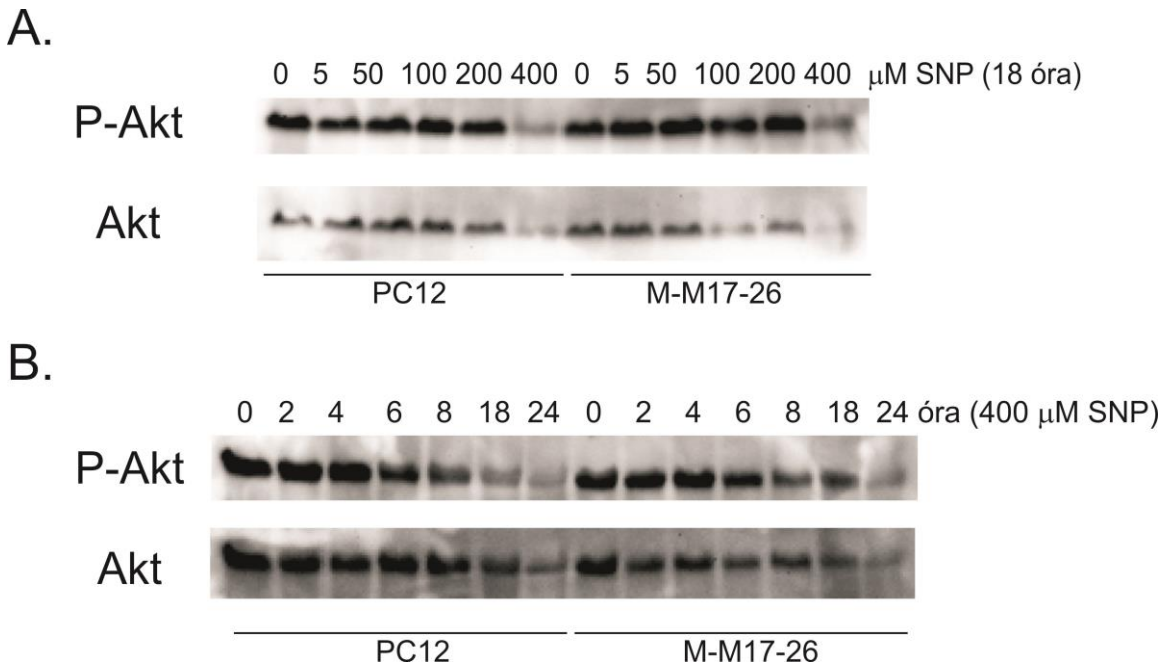
A Ras-ERK út aktivitása hozzájárulhat a PC12 sejtek túléléséhez (Yan és Greene, 1998), bár nem nélkülözhetetlen ahhoz. PC12 sejtekben 18 órás időtartamú, 5-400 μM-os SNP-kezelés az alkalmazott dózissal arányos ERK-foszforilációt idézett elő (11.A ábra). Az erősen toxikus, 400 μM-os, 2-24 órás SNP-kezelés kétfázisú ERK-foszforiláció emelkedést okozott, egy korai, 2-4 órás, és egy késői, 18 órás foszforilációs maximummal (11.B ábra). Az M-M17-26 sejtvonalban az ERK-foszforiláció nagymértékben gátolt volt. A korai aktiváció teljesen hiányzott, míg a késői foszforiláció megjelent, bár jóval gyengébben, mint a vad-típusú PC12 sejtekben (11.A és B ábra). A csökkent ERK-foszforiláció hozzájárulhat az SNP megnövekedett citotoxicitásához ebben a sejtvonalban.



11. ábra: Az SNP-indukálta ERK-foszforiláció dózis- és időfüggése vad-típusú PC12 és M-M17-26 sejtekben. 18 órás, az ábrán jelzett koncentrációjú (A), illetve 400 μM koncentrációjú, az ábrán jelzett ideig tartó (B) SNP-kezelés után fehérjét izoláltunk, és anti-P-ERK antitestet használva Western-blot analízist végeztünk. Az anti-ERK1/2 antitestet mennyiségi kontrollként használtuk.

Az SNP csak erősen toxikus koncentrációban gátolja az Akt-foszforilációt

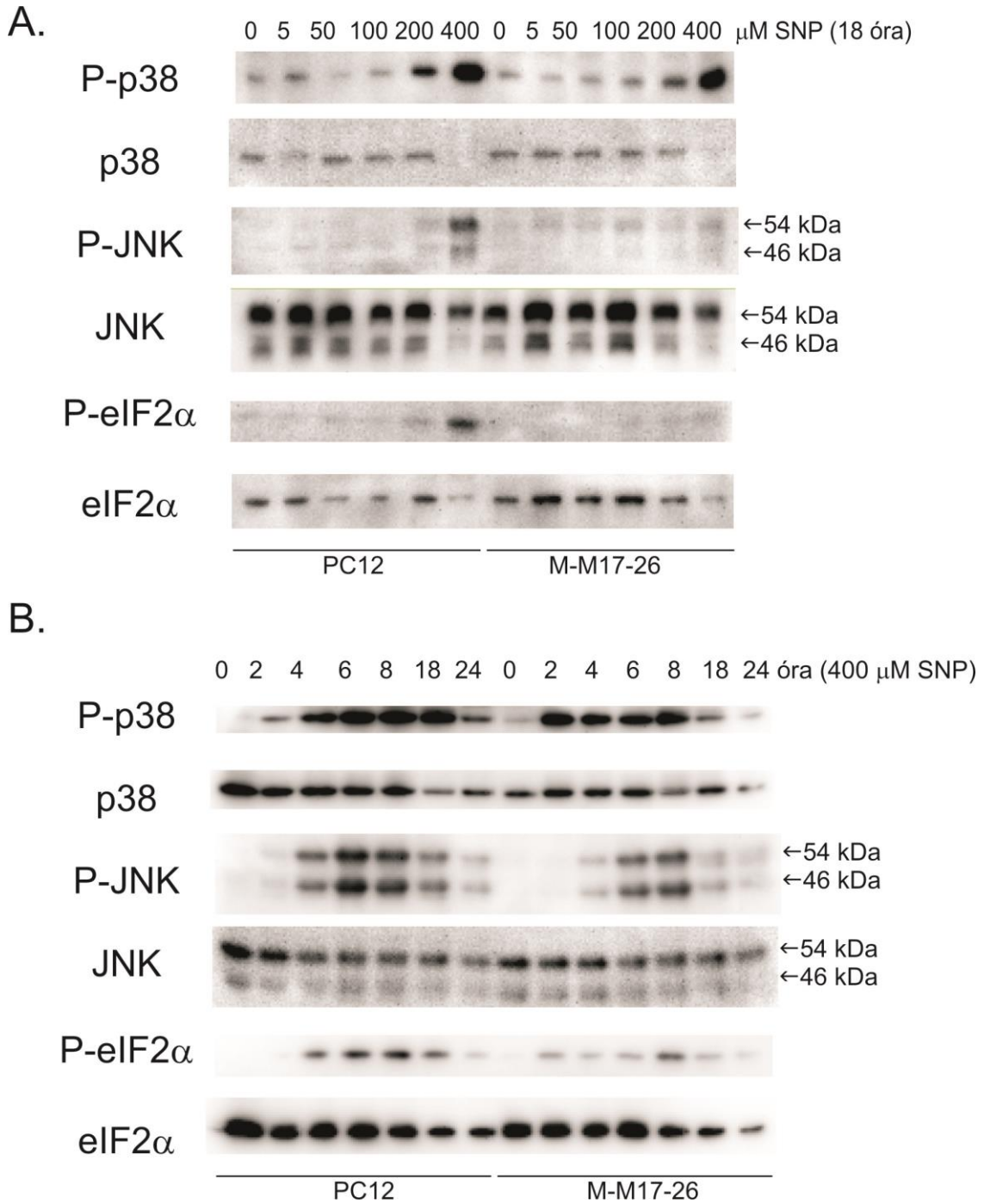
A PC12 sejtek túléléséért döntően a foszforilált Akt biztosította jelátvitel felelős. Kísérleteinkben az Akt fehérje 473. pozíciójú szerin aminosavon történt foszforilációját csak a legnagyobb alkalmazott koncentrációjú (400 μM) SNP gátolta, hosszabb idejű kezelés (legalább 18 óra) hatására PC12 sejtekben (12.A és B ábra). A gátlás az M-M17-26 sejtekben is hasonlóan a nagy koncentrációjú és hosszabb idejű SNP-kezelés hatására érvényesült (12.A és B ábra), tehát a Ras aktivitásától függetlennek bizonyult. Eszerint Akt-közvetítette jelátviteli útvonal eltérő aktivitásával a két sejtvonal eltérő SNP-érzékenysége nem magyarázható.



12. ábra: Az SNP indukálta Akt-foszforiláció dózis- és időfüggése vad-típusú PC12 és M-M17-26 sejtekben. 18 órás, az ábrán jelzett koncentrációjú (A), illetve 400 μM koncentrációjú, az ábrán jelzett ideig tartó (B) SNP-kezelés után fehérjét izoláltunk, és anti P-Akt(Ser473) antitestet használva Western-blot analízist végeztünk. Az anti-Akt antitestet mennyiségi kontrollként használtuk.

Az SNP stresszkinázok által közvetített jelátviteli utakat aktivál

Az általános celluláris stresszreakció részeként mindkét sejtvonalban az alkalmazott SNP-dózissal arányos (13.A ábra) és elhúzódó (24 órás kezelés után is kimutatható) JNK és p38MAPK aktivációt detektáltunk. A két fehérje foszforilációja 2 órás SNP-kezelést követően már kimutatható volt, maximumát 6-8 órás kezelés hatására érte el, majd a foszforiláció csökkenni kezdett, de még 24 órás kezelés esetén is magasabb maradt a kontroll sejtekénél (13.B ábra). Az endoplazmatikus retikulum stressz jelzéseképpen mindkét sejtvonalban megfigyelhetővé vált az eIF2α dózis-függő, tartós foszforilációja, hasonló időbeli lefutással, mint a stresszkinázoké (13.A és B ábra). Az M-M17-26 sejtvonal esetében egyik vizsgált kináz aktivációja sem volt nagyobb mértékű, mint a PC12 sejtek esetében (13.A és B ábra). Ez arra utal, hogy bár mindkét sejtvonal stresszválaszához hozzájárulhatnak a fenti kinázok által aktivált jelátviteli útvonalak, az M-M17-26 sejtek SNP hatására megfigyelt fokozott érzékenységéért viszont nem tehetők felelőssé.



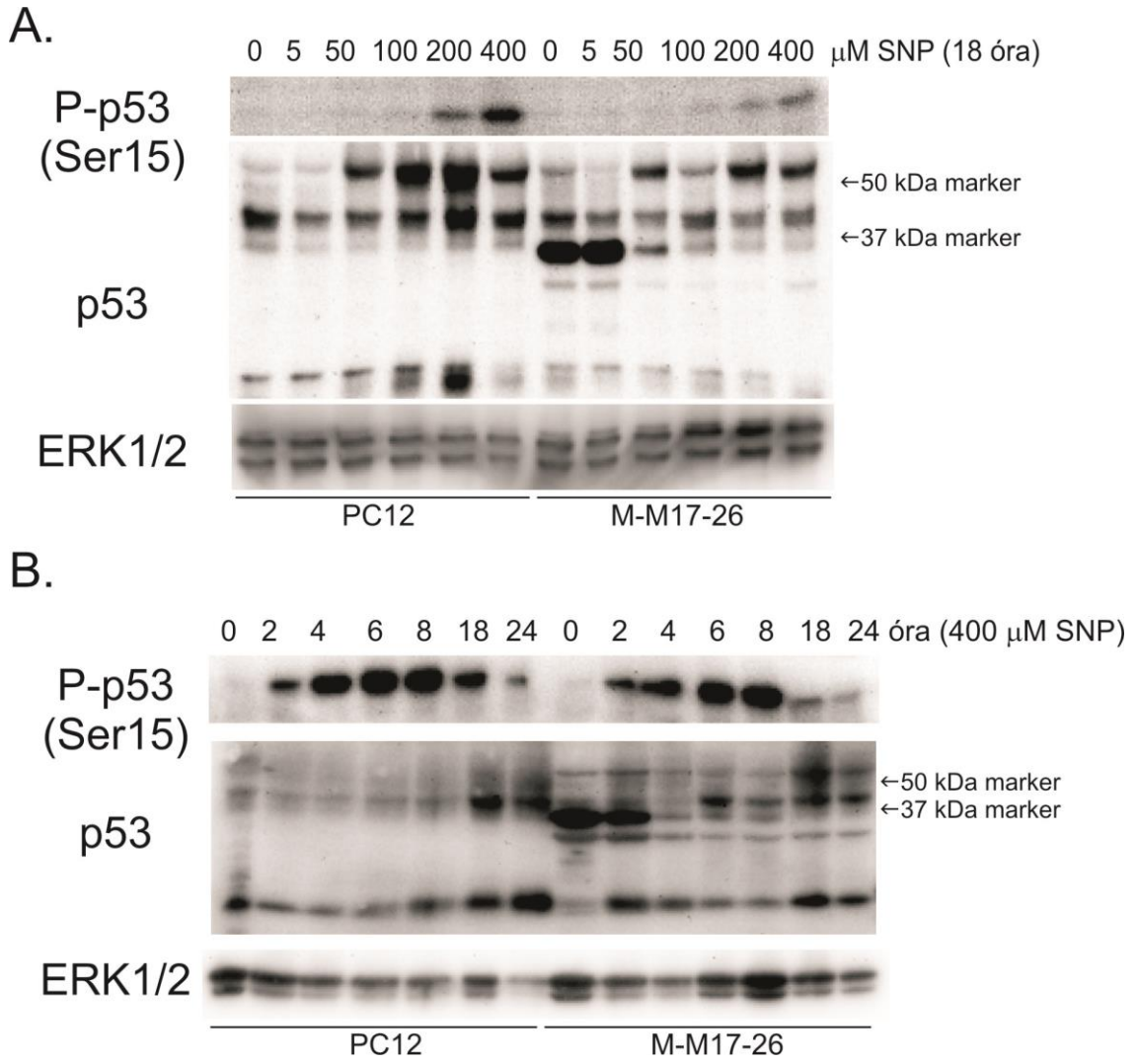
13. ábra: Az SNP indukálta JNK, p38MAPK, valamint eIF2α-foszforiláció dózis- és időfüggése vad-típusú PC12 és M-M17-26 sejtekben. 18 órás, az ábrán jelzett koncentrációjú (A), illetve 400 μM koncentrációjú, az ábrán jelzett ideig tartó (B) SNP-kezelés után fehérjét izoláltunk, és anti-P-p38, anti-P-JNK (a nyilak a 46 és 54 kDa-os JNK izoformákat jelzik), valamint anti-P-eIF2α antitest segítségével Western-blot analízist végeztünk. Az anti-p38, anti-JNK és anti-eIF2α antitesteket mennyiségi kontrollként használtuk.

A p53 fehérje foszforilációja és stabilizációja SNP-kezelés hatására

A JNK és p38MAPK számára többek között a p53 fehérje 15. szerin aminosava is foszforilációs hely (Wu, 2004).

Kimutattuk, hogy a p53 fehérje 15. pozíciójú szerin aminosavának SNP-kezelés hatására bekövetkező foszforilációja dózisfüggő (14.A ábra). A foszforiláció 2 órás, 400 μM-os SNP-kezelést követően már kimutatható, maximumát 6-8 órás SNP-kezelés hatására éri el, és még 24 órás SNP-kezelést követően is erőteljesebb, mint a kezeletlen sejtekben (14.B ábra), tehát hasonló időbeli lefutású, mint a stresszkinázok aktivációja. A p53 fehérje 15. pozíciójú szerin aminosavának foszforilációja kifejezettebb a vad-típusú PC12 sejtvonalban, mint a domináns gátló Ras-t expresszáló sejtekben, így, bár hozzájárulhat a p53 stabilizálásához, nem járul hozzá az M-M17-26 klón fokozott érzékenységéhez.

Mindkét sejtvonalban megfigyelhető a p53 fehérje „klasszikus”, 53 kDa méretű α izoformája mennyiségének dózissal és kezelési idővel arányos emelkedése, önmagában nem magyarázva a két vizsgált sejtvonal eltérő apoptotikus reakcióját SNP-kezelésre (14.A és B ábra). A domináns gátló RasH fehérje jelenléte módosította a nem kezelt M-M17-26 sejtekben a p53 expressziós mintázatát a nem kezelt vad-típusú PC12 sejtekéhez viszonyítva (14.A és B ábra). Az SNP-kezelés ugyancsak befolyásolta az egyes izoformák expressziójának mértékét (14.A és B ábra). Különösen szembetűnő az M-M17-26 sejtekben megfigyelt hatás: a csak ebben a sejtvonalban erősen expresszált, mérete alapján valószínűleg a gátló 35 kDa-os izoformának megfelelő csík teljesen eltűnt SNP-kezelés hatására (14.A és B ábra).



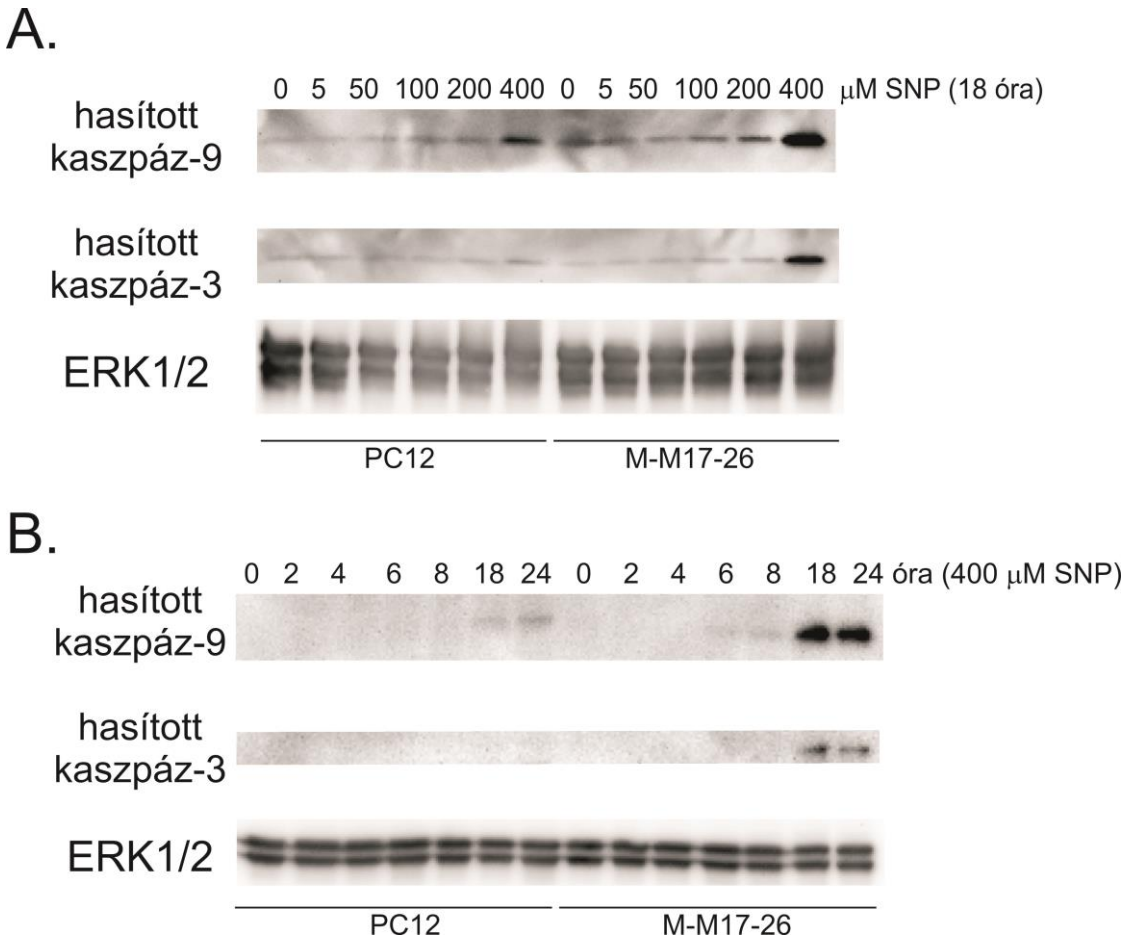
14. ábra: Az SNP indukálta p53-foszforiláció és -expresszió-változás dózis- és időfüggése vad-típusú PC12 és M-M17-26 sejtekben. 18 órás, az ábrán jelzett koncentrációjú (A), illetve 400 μM koncentrációjú, az ábrán jelzett ideig tartó (B) SNP-kezelés után fehérjét izoláltunk, és anti-P-p53(Ser15) valamint anti-p53 antitestet használva Western-blot analízist végeztünk. Az anti-ERK1/2 antitestet mennyiségi kontrollként használtuk.

Kaszpázaktiváció SNP-kezelés hatására

A p53 fehérje által indukált apoptózis során a multidomén proapoptotikus Bcl2 családtagok által létrehozott fehérjecsatornákon keresztül többek között citokróm c áramlik a citoszolba. Részvételével felépül az úgynevezett apoptoszóma, aktiválva az iniciátor

kaszpázok közé tartozó prokaszpáz-9-et. A hasított kaszpáz-9 effektor kaszpázok, többek között a prokaszpáz-3 hasításával indukál apoptózist (Allan és Clarke, 2009).

A prokaszpáz-9 dózissal arányos hasítását detektáltuk legalább 18 órás SNP-kezelés hatására vad-típusú PC12 sejtekben (15.A és B ábra). Az M-M17-26 sejtvonalban a kaszpáz-9 aktivációja jóval nagyobb mértékű volt, mint a vad-típusú PC12 sejtekben (15.A és B ábra). A prokaszpáz-3 hasítása is kimutatható volt a kaszpáz-9 aktivációjával arányosan mindkét sejtvonalban (15.A és B ábra). A fokozott kaszpázaktiváció magyarázatul szolgál az M-M17-26 sejtvonal fokozott SNP-érzékenységére.



15. ábra: Az SNP indukálta kaszpáz-9 és -3 hasítás dózis- és időfüggése vad-típusú PC12 és M-M17-26 sejtekben. 18 órás, az ábrán jelzett koncentrációjú (A), illetve 400 μM koncentrációjú, az ábrán jelzett ideig tartó (B) SNP-kezelés után Chaps puffert használva fehérjét izoláltunk, és anti-hasított kaszpáz-9 és -3 antitesttel Western-blot analízist végeztünk. Az anti-ERK1/2 antitestet mennyiségi kontrollként használtuk.

Megbeszélés

A PC12 sejtvonal alkalmas modellrendszer a NO celluláris hatásainak vizsgálatára, a NO esetleges szerepének tanulmányozására mind a neuronális differenciáció, mind a nitrozatív stressz jelátviteli folyamataiban (az SNP által befolyásolt jelátviteli molekulák rendszerét a 16. és 18. ábra tartalmazza). Az egyes jelátviteli utak tanulmányozására különböző, exogén fehérjét expresszáló PC12 szubklónok állnak rendelkezésünkre, melyekben a bevitt gén terméke a vizsgált jelátviteli út működését módosítja. Jelen dolgozat tárgyát a Ras fehérje szerepének vizsgálata képezi. Egyéb fehérjéket expresszáló PC12 sejtvonalak tanulmányozása is folyamatban van, intézetünk kutatási témáját képezi. Reményeink szerint ezek a celluláris modellek lehetőséget adnak arra, hogy a NO idegrendszeri és egyéb betegségekben játszott szerepével kapcsolatosan hasznos következtetéseket vonjunk le.

A NO antiproliferatív hatása Ras-független

PC12 sejtekben az NGF az antiproliferatív hatását (Rudkin és mtsai, 1989) a Ras fehérje aktivációján keresztül fejti ki (Kiss és mtsai, 1998). Ha az NGF antiproliferatív hatása gátolt (például a Ras gátlása mellett a p53 gátlásakor), nem jön létre PC12 sejtekben differenciáció (Kiss és mtsai, 1998, Fábián és mtsai, 2006). Viszont a proliferatív hatású epidermális növekedési faktor (EGF), antiproliferatív szerek (például dbcAMP, SNP) egyikével adva, PC12 sejtek differenciációjának előidézésére képes (Mark és Storm, 1997). Ezek alapján vizsgáltuk, hogy a Ras fehérje gátlásának negatív hatása a PC12 sejtek neuronális differenciációjára kivédhető-e NO-donor adásával.

Összehasonlítottuk vad típusú PC12 és egy domináns gátló RasH-t expresszáló PC12 szubklón (M-M17-26 sejtek) antiproliferatív válaszát SNP kezelésre (5. ábra). A p53 fehérje SNP-vel kezelt PC12 sejtekben, Brynczka és Merrick (2007) eredményeivel összhangban, dózisfüggően indukálódik (6. ábra). A két sejtvonal közt nincs különbség az SNP hatására bekövetkező p53-indukcióban, valamint a PCNA-expresszió csökkenésében. A p21WAF1 indukciójának mértéke PC12 sejtekben hasonló az NGF által előidézett p21WAF1 indukcióéhoz (saját nem közölt adat), míg M-M17-26 sejtekben sem NGF (ez egybevág Kiss Katalin személyes közlésével), sem SNP hatására nem nő tovább az expressziója (6. ábra). A magas p21WAF1 alapexpresszió kezeletlen M-M17-26 sejtekben

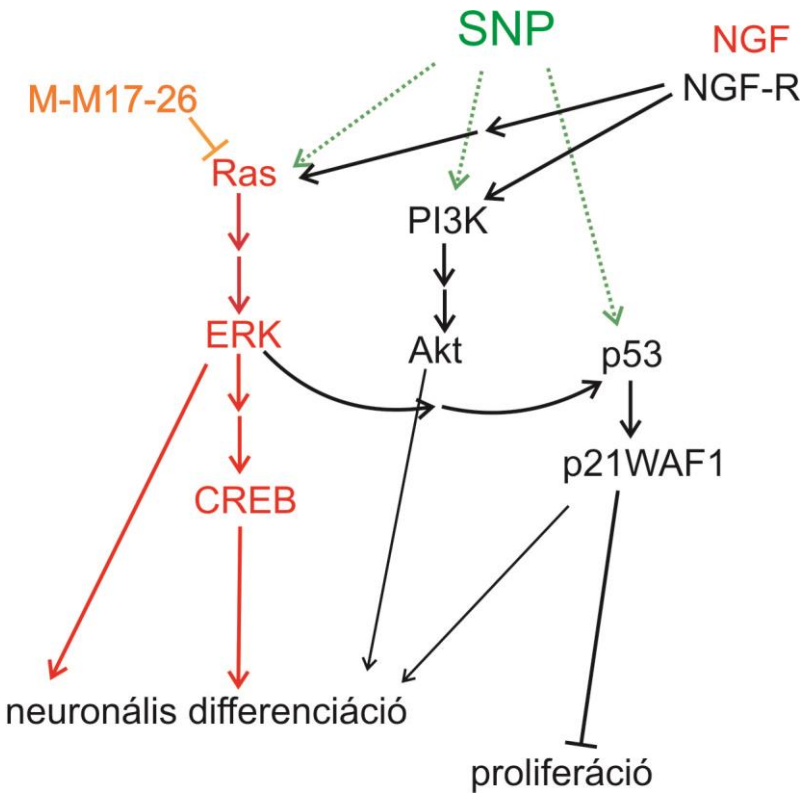
nem járt együtt a sejtvonal csökkent proliferációs képességével, valamint a proliferáció gátlásához nem volt szükség a fehérje mennyiségének további emelkedésére. Ezek alapján vagy a p21WAF1 fehérje valamilyen poszttranszlációs módosulása is befolyásolja az aktivitását, vagy valamelyik másik ciklin dependens kináz inhibitor is részt vesz a sejtciklus leállításában (Abukhdeir és Park, 2008). A kérdés tisztázása további kísérleteket igényel. Eredményeink szerint a Ras fehérjének nincsen szerepe az SNP sejtosztódást gátló hatásának közvetítésében (16. ábra). A NO hatásai dózissal arányosan érvényesülnek, azonban a differenciációs kísérleteknél alkalmazott 50 µM-nál nagyobb mennyiségű SNP kezelésnek már toxikus hatásai is vannak (9. és 10 ábra). Az 5 és 50 µM SNP még nem indukál sejthalált, amint az a citotoxicitási kísérletekből kimutatható (10.A ábra).

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

5 µM SNP-kezelés NGF-fel kombinálva kissé felgyorsítja a vad típusú PC12 sejtek differenciációját (7. ábra, összhangban Hindley és mtsai, 1997 eredményeivel), azonban végeredményben nem változtatja meg a differenciálódott sejtek arányát. Tehát az NGF és SNP együttes antiproliferatív hatása kedvez a differenciációnak, azonban nem indukálja a PC12 sejttenyészet azon sejtjeinek differenciációját, melyek NGF-kezelésre valamilyen oknál fogva rezisztensek. Bár az 50 µM SNP hatékonyabban gátolja a sejtosztódást, mégis gátolja a PC12 sejtek differenciációját is (7. ábra), feltételezhetően az általa okozott ATP depléció miatt (Varga Judit, személyes közlés).

Az M-M17-26 sejtek NGF jelenlétében a kezeletlen sejtekhez hasonló mértékben proliferálnak (Kiss és mtsai, 1998), viszont proliferációjuk kis dózisú SNP-kezeléssel gátolható (5. ábra). Mégsem következik be neuritnövekedés NGF és SNP együttes hatására (7. ábra), tehát a Ras fehérje gátlását NO adásával nem lehet áthidalni. Ennek egyik lehetséges oka, hogy a NO önmagában nem stimulálja az endogén Ras-fehérjék GTP-kötését a domináns gátló Ras jelenlétében. Az M-M17-26 sejtek differenciációja Ras-aktiváció hiányában is előidézhető NGF és különböző másodlagos messenger analógok együttes alkalmazásával, ilyen például az NGF és dbcAMP, vagy az NGF és a Ca^{2+}-ionofor ionomycin kombinációs kezelés (Szeberényi és mtsai, 1992). Eszerint a differenciáció elmaradásának másik magyarázata, hogy a NO - szemben a cAMP-vel vagy Ca^{2+}-mal - nem stimulál olyan jelátviteli mechanizmust, amely a Ras-blokkot megkerüli. A

kombinált SNP- és NGF-kezelés tanulsága az is, hogy a sejtciklus leállítása, még ha szükséges is a neuritnövekedéshez, Ras által közvetített neuritogén szignálok nélkül nem képes a nyúlványnövekedést elindítani.



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

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

Az SNP PC12 sejtekben dózissal arányosan tartós ERK-foszforilációt idéz elő (11.A és B ábrák), azonban ez jóval kisebb mértékű, mint az NGF hatására bekövetkező ERK-foszforiláció, valamint kombinált kezelések során az SNP az NGF hatását nem fokozza (8. ábra). Kis dózisú SNP-vel kezelt M-M17-26 sejtekben nem foszforilálódik az ERK, és az SNP NGF-fel együtt adva sem képes oldani a Ras-ERK út gátolt aktivációját (8. ábra).

A jelátviteli út további fontos tagja a CREB transzkripciós faktor. Megvizsgáltuk ennek a foszforilációját is, mert megfelelő körülmények között ERK-től független

jelátviteli utakon keresztül is aktiválható a CREB fehérje, például ha a p90Rsk fehérjekináz nukleáris transzlokációja megtörténik (Boglári és Szeberényi, 2001, 2002). A mi kísérleti rendszerünkben azonban ez a CREB-módosulás Ras-függőnek bizonyult, nemcsak az NGF, hanem az SNP-kezelés hatására is (8. ábra). Ezek szerint mindkét szer a Ras-ERK út aktiválásával idéz elő CREB-foszforilációt. Egy tanulmány szerint a CREB transzkripciós faktor a PC12 sejtek neuronális differenciációja során indukálódó gének harmadának promóteréhez kötődik (Mullenbrock és mtsai, 2011). Ennek ismeretében nem meglepő, hogy a CREB aktivációjának elmaradása a differenciáció elmaradást eredményezi.

A differenciációs kísérletek összefoglalásaként elmondható, hogy a NO hatás részben (antiproliferatív hatás) képes a gátolt Ras-funkciót helyettesíteni, azonban nem aktivál (legalábbis kellő mértékben) a neuritnövekedéshez vezető útvonalakat (16. ábra).

Az SNP többféle jelátviteli úton keresztül indukál sejthalált PC12 sejtekben

Az SNP többféle sejthalált is indukálhat PC12 sejtekben. Amelyik útvonal a sejttenyészet adott sejtjében a legerősebben/leggyorsabban aktiválódik, az lesz felelős az adott sejt pusztulásáért (Bal-Price és Brown, 2000). Ennek morfológiailag látható jele, hogy különböző mikroszkópos megjelenésű, különböző fokban kondenzált kromatinú sejtmagokat láthatunk SNP-kezelt sejtjeinkben (4. ábra). A kevésbé kondenzált kromatinú sejtmag az apoptózis korai fázisa mellett jele lehet apoptózis-szerű sejthalálnak, kaszpáz-független apoptózisnak is (Leist és Jäättelä, 2001, Tait és Green, 2008). Sejtvonalainkban a kaszpáz-aktiváció időben később következik be, mint az első kondenzált kromatinnal rendelkező sejtmagok megjelenése (15.B és 10.B ábra). Ez amellett, hogy bizonyítja az apoptózis mitokondriális útjának aktiválódását, egyben jelzi azt is, hogy kaszpáz-független sejthalál is indukálódik az SNP-vel kezelt sejtekben.

Vad-típusú PC12 sejtekben a TrkA receptor kapcsolódik a p75NTR fehérjével. TrkA hiányában a p75NTR homodimereket képezve halálreceptorként működik (Arévalo és Wu, 2006), ez intenzívebb stresszjelátvitelt eredményez a TrkA deficiens nnr5 klónban SNP-kezelés hatására, annak fokozott érzékenységét eredményezve (9. ábra).

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

A Ras fehérje aktivációja számos jelátviteli utat aktiválhat, köztük proapoptotikus útvonalakat is (Cox és Der, 2010). Mivel a PC12 sejtvonal kevésbé érzékeny, mint az M-M17-26 sejtek, a proapoptotikus Ras-effektorok (RASSF család /Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member/ tagjai) aktivációja nem valószínű. A PC12 sejtvonalban a PI3K-Akt útvonal aktivációja Ras-független, ezt alátámasztja az is, hogy nincs különbség a két sejtvonal között az Akt 473. helyen álló szerin aminosavának foszforilációjában (12. ábra). Az ERK fehérje SNP általi korai aktivációja teljes mértékben Ras-függő (11.B ábra), így a korai foszforilációért a nitrozilálódó Ras fehérje, esetleg valamelyik, a jelátvitelben a Ras előtt helyet foglaló fehérje aktivációja tehető felelőssé (például egy, vagy akár többféle Ras-t aktiváló növekedési faktor receptornak a vélhetően nitrozilációval bekövetkező aktivációja). A késői (18 órás SNP-kezelésre bekövetkező) ERK-foszforiláció megjelenik M-M17-26 sejtekben is (11.B ábra), tehát részben Ras-független. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy az ERK peroxinitrit jelenlétében a Ras, illetve MKK1 fehérjéktől függetlenül is aktiválódhat (Liaudet és mtsai, 2009). A késői ERK-aktiváció ezen kívül lehet a MEKK1, egy, a Ras-út által nem szabályozott MAPKKK aktivációjának következménye. Ez a fehérje elsősorban a JNK aktivációjáért felelős, másodlagosan a MKK1 foszforilálásával az ERK-et is aktiválhatja (Matsuzawa és Ichijo, 2001, Lu és Xu, 2006) (18. ábra).

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

A PKR fehérje hasítással történő aktivációját (Pap és Szeberényi, 2008) látjuk hosszú idejű (18 és 24 órás) SNP-kezelés hatására (Varga Judit, személyes közlés). Az eIF2α-foszforiláció viszont ennél korábban (2-4 óra elteltével) is detektálható (13.B ábra). Ezek alapján az eIF2α korai aktivációjáért valószínűleg a PERK, a GCN, esetleg a HRI fehérjekináz tehető felelőssé (18. ábra).

A p38MAPK és a JNK foszforilációja időbeli lefutását tekintve megegyezik a p53 fehérje 15. pozíciójú szerin aminosavának foszforilációjával (13.B és 14.B ábrák), így bármelyikük felelőssé tehető a p53 aktivációjáért. A 15. pozíciójú szerin aminosav

foszforilációja eredményezheti a p53 fehérje stabilizációját, viszont önmagában nem magyarázza a két sejtvonal eltérő SNP-érzékenységét (14. ábra).

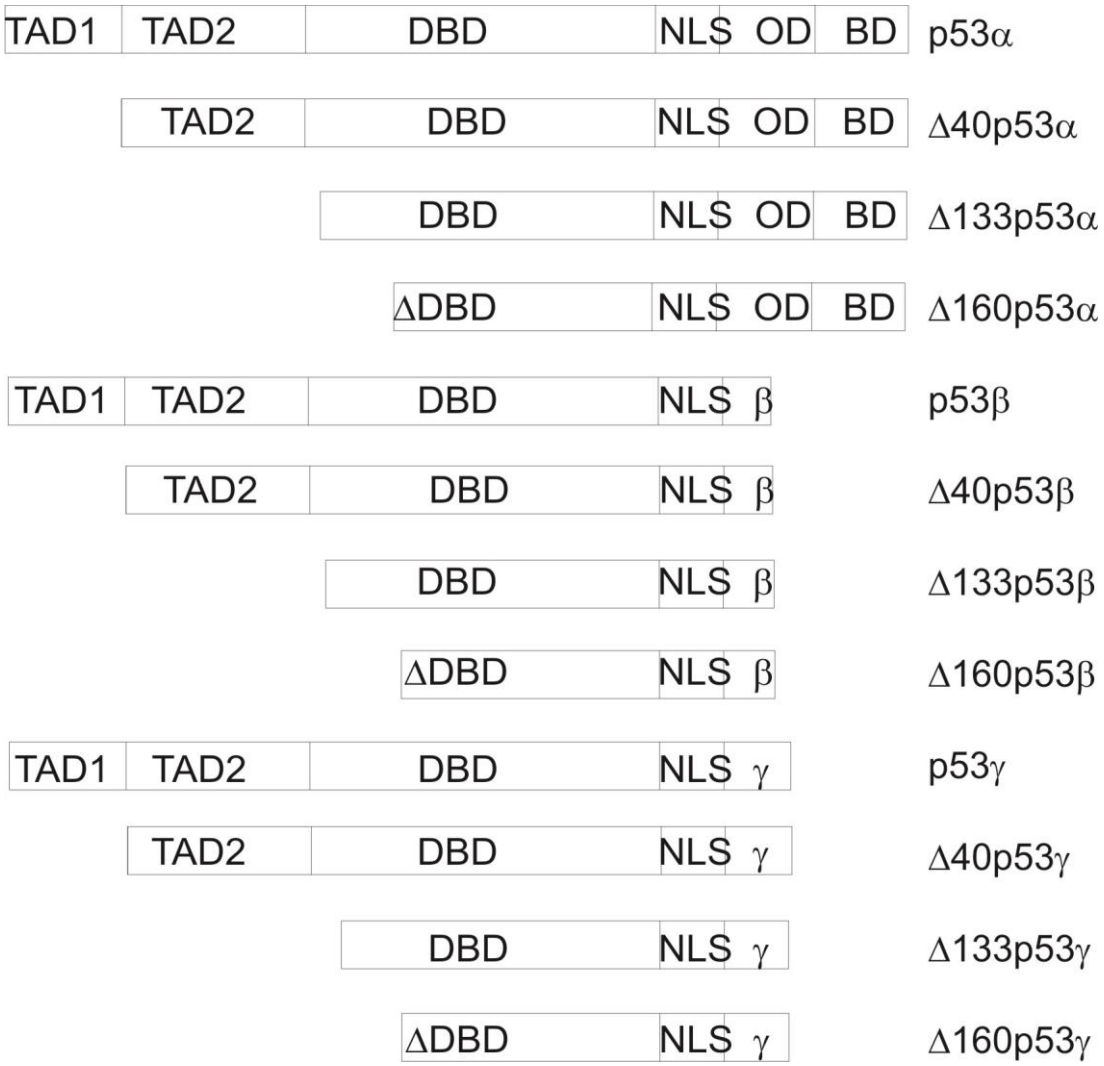
Az SNP-kezelés, valamint a domináns gátló RasH expressziója befolyásolja a p53 fehérje expresszióját

A p53 fehérjének számos izoformája létezik, melyek különbözőképpen szabályozzák a sejtproliferáció, differenciáció, apoptózis folyamatait. A „klasszikus", teljes hosszúságú, 53 kDa-os izoforma a p53α, N-terminálisán két egymást követő transzaktivációs domént, majd a szekvencia-specifikus DNS-kötésért felelős DNS-kötő domént, oligomerizációs domént és a struktúra-specifikus DNS-kötésben fontos bázikus domént is tartalmaz. Az N-terminális rövidülésével a Δ40, Δ133 és Δ160 izoformák jönnek létre, a C-terminális módosulásával képződött izoformák a β és γ nevet kapták. A Δ40 izoformáknak az egyik transzaktivációs doménje, a Δ133 és Δ160 izoformáknak mindkét transzaktivációs doménje, és a DNS-kötő domén kisebb-nagyobb része is hiányzik. A C-terminális rövidülésével a β és γ izoformáknak hiányzik az oligomerizációs, valamint a bázikus doménje. Ennek megfelelően hatásaik különböznek a p53α izoforma hatásaitól. Az egyes izoformák egymás jelátviteli hatásait is képesek módosítani (Bourdon és mtsai, 2005, Jänicke és mtsai, 2009, Khoury és Bourdon, 2011, Marcel és Hainaut, 2010) (17. ábra).

Az általunk használt poliklonális, a teljes hosszúságú p53α fehérje elleni, ezáltal minden ismert izoformát felismerő antitesttel Western-blotjainkon több csíkot detektálhatunk. Az egyes csíkok azonosításához az egyes izoformák közötti kis méretbeli eltérések miatt további vizsgálatok szükségesek monoklonális, és így csak egyes izoformákat/néhány izoformát felismerő antitestekkel. A legfelső detektálható csík minden valószínűség szerint az 51-53 kDa-os p53α. Alatta kevéssel a 46-48 kDa-os p53β és p53γ, illetve Δ40p53α izoforma lehet. Hozzávetőlegesen 41 kDa körüli méretűek a Δ40p53β és a Δ40p53γ izoformák. 35 kDa-os csíkot ad a Δ133p53α. Végül 25-26 kDa-osnak azonosították a Δ133p53β és γ, illetve a Δ160p53β és γ izoformákat. A membránokon detektálható csíkok közül a p53 fehérje „klasszikus", 53 kDa-os α izoformája mennyiségének emelkedése vad-típusú PC12 (összhangban Brynczka és Merrick, 2007 eredményeivel) és M-M17-26 sejtjeinkben hasonló mértékű, ez valószínűsíti más izoformák részvételét az M-M17-26 sejtek fokozott apoptózisának kiváltásában. A 46-48 kDa-os izoformák mindegyike részt vehet apoptózis előidézésében, ezek SNP-kezelés

hatására mindkét sejtvonalban indukálódnak (14. ábra). A 41 kDa-os izoformák szerepe még nem ismert. A Δ133p53α izoforma a p53α domináns gátló fehérjéjeként hat, eszerint a p53 által kiváltott apoptózist is gátolja. Csak az M-M17-26 sejtekben találunk ennek az izoformának megfelelő méretű csíkot (bár a molekulasúly-marker korlátozott megbízhatósága és a felfedezett p53 izoformák még mindig bővülő sora miatt teljes biztonsággal nem állíthatjuk, hogy erről az izoformáról van szó). A csík toxikus dózisú SNP-kezelés hatására eltűnik, a fehérje gátló hatásának megszűnése segítheti a p53 indukálta apoptózist. A kis mólsúlyú izoformák közül a Δ133p53β és γ izoformák jelenlegi ismereteink szerint nem vesznek részt az apoptózis kiváltásában, a Δ160 izoformák szerepe pedig még nem ismert (Bourdon és mtsai, 2005, Jänicke és mtsai, 2009, Khoury és Bourdon, 2011, Marcel és Hainaut, 2010, Olivares-Illana és Fahraeus, 2010). Ezek szerint a RasH fehérje elsősorban a Δ133p53α expresszióját (14. ábra), ezáltal a p53 fehérjék antimitogén vagy apoptotikus folyamatokban játszott szerepét befolyásolja (Agarwal és mtsai, 2001, Halaschek-Wiener és mtsai, 2004). Vélhetően ez lehet az egyik kulcsa az M-M17-26 sejtek fokozott érzékenységének. A toxikus SNP-dózisok adásakor megnövekedő mennyiségű 46-48, illetve 53 kDa-os p53 izoformák jelenléte magyarázhatja (14. ábra), hogy a differenciációs kísérletekben tapasztalt antimitogén hatás helyett a p53 proapoptotikus hatása érvényesül. A leírtak bizonyítása természetesen további kísérleteket igényelne.

A p53 fehérje a pro- és antiapoptotikus Bcl2 családtagok szabályozásával az apoptózis intrinsic útját aktiválja. A csak BH3-domént tartalmazó proapoptotikus családtagok közül bármelyik expressziója gátolható, azonban a NO indukálta apoptózis nem marad el (Snyder és mtsai, 2009). Eszerint ezen családtagok egyike sem nélkülözhetetlen a NO indukálta apoptózis kiváltásában. Az antiapoptotikus családtagok közül NO hatására az Mcl1 mennyisége bizonyítottan csökken, ez hozzájárulhat a multidomén proapoptotikus Bcl2 fehérjék aktiválásához. A multidomén proapoptotikus Bax és Bak fehérjék expressziójának együttes gátlásával a NO által okozott sejtpusztulás kivédhető (Snyder és mtsai, 2009). A különböző Bcl2 családtagok esetleges szerepének igazolása PC12 sejtjeinkben további kísérleteket igényel.

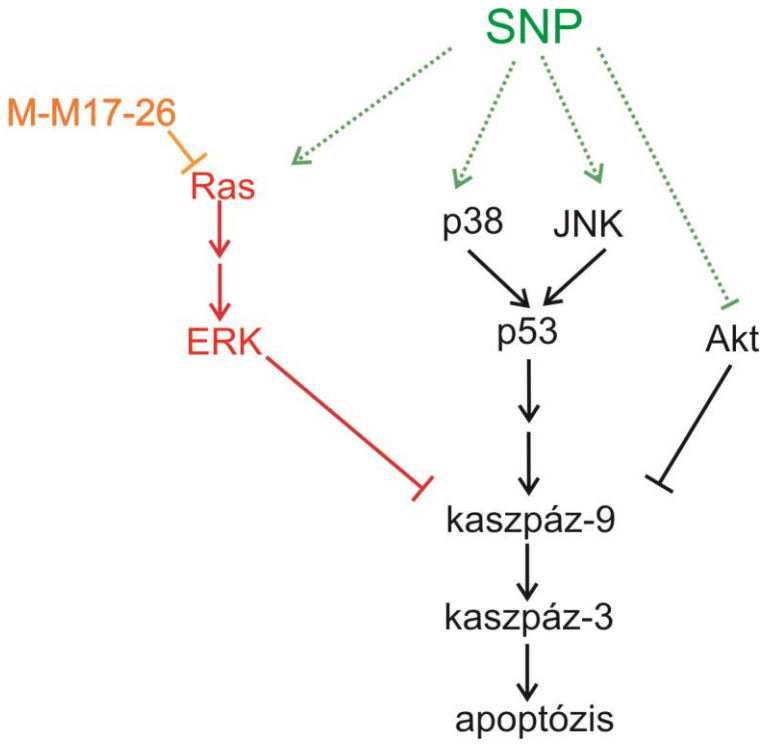


17. ábra: A p53 izoformák szerkezete (Jänicke és mtsai, 2009, Khoury és Bourdon, 2011. cikkek ábrái alapján). TAD: transzaktivációs domén, DBD: (szekvencia-specifikus DNS-kötésért felelős) DNS-kötő domén, NLS: nukleáris lokalizációs szignál, OD: oligomerizációs domén, BD: (struktúra-specifikus DNS-kötésben fontos) bázikus domén, β: β izoformák jellemző C-terminálisa, γ: γ izoformák jellemző C-terminálisa

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

Túlélést serkentő jelátviteli folyamatok gátolják a kaszpázok aktivációját. Többek között a PI3K-Akt útvonal még nem azonosított célfehérjéje és az ERK fehérje foszforilálhatja a prokaszpáz-9-et. Mindegyik foszforiláció gátló hatású (Allan és Clarke, 2009). Esetünkben az Akt fehérje defoszforilációja megegyező a két sejtvonalban, tehát

nem lehet felelős az eltérő kaszpáz-aktivációért (12. és 15. ábra). Az ERK fehérjék foszforilációja M-M17-26 sejtekben gátolt (11. ábra), eszerint a kaszpáz-9 foszforilációja, tehát aktivációjának gátlása sem valósulhat meg (18. ábra). A feltételezés bizonyítása foszfo-kaszpáz-9 antitesttel történhetne, azonban patkányra specifikus formát még nem forgalmaznak.



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

Nem tudunk egyértelmű választ adni arra, mitől válik toxikussá PC12 sejtekre a 100-200 μM SNP kezelés. Az általunk vizsgált stresszkinázok aktivációja dózisfüggő, és elérhet egy küszöbértéket, amely apoptózis kiváltásához elegendő. A p53 fehérje esetében a mai napig nem bizonyított, hogy miért érvényesül bizonyos körülmények között az antiproliferatív, máskor a proapoptotikus hatása. A p53 fehérje mennyiségének növekedése mellett valószínűsíthető a poszttranszlációs módosulásainak megváltozása is, amelyek módosítják a fehérje biológiai hatásait. Kisebb mértékű nitrációja (csak meghatározott tirozin aminosavon) serkenti a transzkripciós aktivitását, míg a DNS-kötő doménjén található tirozin aminosavak nagyobb koncentrációjú NO hatására bekövetkező nitrációja

gátolja azt (Kim és mtsai, 2011). Transzkripciós faktorként antiproliferatív és proapoptotikus hatásokat egyaránt közvetít, míg transzkripciótól függetlenül elsősorban proapoptotikus hatásai érvényesülnek. Elképzelhető, hogy ha a NO koncentrációja elég ahhoz, hogy a transzkripciós aktivitását gátolja, akkor az antiproliferatív hatás apoptotikus jellé változik.

Az apoptózis kiváltásánál szóba jöhet általunk nem vizsgált proapoptotikus fehérjék indukciója/aktivációja is, amelyhez adott dózisú NO-felszabadulás szükséges.

A munka gyakorlati jelentősége

Kutatásunk sejttenyészeten végrehajtott, alapkutatás jellegű munka. Eredményei közvetlenül a gyógyászatban ennek megfelelően nem hasznosíthatóak. A NO idegsejtekre gyakorolt hatásainak jobb megismerése azonban közelebb vezethet a NO komplex idegrendszeri hatásainak megértéséhez. Ezzel talán közelebb kerülhetünk egy sor neurodegeneratív és egyéb idegrendszeri betegség pathomechanizmusának megértéséhez, így lefolyásának lassításához.

A NO számos szisztémás jelátviteli hatása egyben azt is valószínűsíti, hogy NO-donorok vagy NOS-gátlók gyógyászati alkalmazása esetén akár súlyos mellékhatásokkal is számolhatunk. Ez megnehezíti a NO mennyiségét befolyásoló, nem túl szelektíven ható vegyületek gyógyászatban való felhasználását. A NO jelátvitelének jobb megismerése reményeink szerint lehetővé teheti olyan szerek kifejlesztését, amelyek szelektívebbek a befolyásolni kívánt jelátviteli folyamatra.

Összefoglalás

A nem toxikus koncentrációjú SNP-kezelések alapján (16. ábra):

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

A toxikus koncentrációjú SNP-kezelés többféle jelátviteli utat aktivál (18. ábra):

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

Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

Felhasznált irodalom

Abello, N., Kerstjens, H. A., Postma, D. S., and Bischoff, R. 2009. Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. J. Proteome Res. 8(7): 3222-3238.

Abukhdeir A. M. and Park B. H. 2008. P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. Expert Rev Mol Med. 10:e19.

Agarwal, M. L., Ramana, C. V., Hamilton, M., Taylor, W. R., DePrimo, S. E., Bean, L. J., Agarwal, A., Agarwal, M. K., Wolfman, A., Stark, G.R. 2001. Regulation of p53 expression by the RAS-MAP kinase pathway. Oncogene. 20(20): 2527-2536.

Ahn, S., Olive, M., Aggarwal, S., Krylov, D., Ginty, D. D., and Vinson, C. 1998. A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. Mol. Cell. Biol. 18(2): 967-977.

Allan, L. A., and Clarke, P. R. 2009. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. FEBS J. 276(21): 6063-6073.

Anand, P., and Stamler, J. S. 2012. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. J. Mol. Med. (Berl.). 90(3):233-244.

Arévalo, J. C., and Wu, S. H. 2006. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! Cell Mol. Life Sci. 63(13): 1523-1537.

Babich, H., Zuckerbraun, H. L., Ricklis, A. S., and Blau, L. 1998. In vitro toxicity of sodium nitroprusside to human endothelial ECV304 cells. Environ. Toxicol. Pharmacol. 5(2): 135-144.

Bal-Price, A., and Brown, G. C. 2000. Nitric-oxide-induced necrosis and apoptosis in PC12 cells mediated by mitochondria. J. Neurochem. 75: 1455-1464.

Bian, K., Ke, Y., Kamisaki, Y., and Murad, F. 2006. Proteomic modification by nitric oxide. J. Pharmacol. Sci. 101(4): 271-279.

Blaise, G. A., Gauvin, D., Gangal, M., and Authier, S. 2005. Nitric oxide, cell signaling and cell death. Toxicology. 208(2): 177-192.

Boglári, G., Erhardt, P., Cooper, G. M., and Szeberényi, J. 1998. Intact Ras function is required for sustained activation and nuclear translocation of extracellular signal-

regulated kinases in nerve growth factor stimulated PC12 cells. Eur. J. Cell. Biol. 75(1): 54-58.

Boglári, G., and Szeberényi, J. 2001. Nerve growth factor in combination with second messenger analogues causes neuronal differentiation of PC12 cells expressing a dominant inhibitory Ras protein without inducing activation of extracellular signal-regulated kinases. Eur. J. Neurosci. 14: 1445-1454.

Boglári, G. and Szeberényi, J. 2002. Nuclear translocation of $p90^{Rsk}$ and phosphorylation of CREB is induced by ionomycin in a Ras-independent manner in PC12 cells. Acta Biol. Hung. 53: 325-334.

Bourdon, J. C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D. P., Saville, M. K. and Lane, D. P. 2012. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. Genes Dev. 19: 2122-2137.

Brown, G. C. 2010. Nitric oxide and neuronal death. Nitric Oxide, 23(3): 153-165.

Bröker, L. E., Kruyt, F. A., and Giaccone, G. 2005. Cell death independent of caspases: a review. Clin. Cancer Res. 11(9): 3155-3162.

Brynczka, C., and Merrick, B.A. 2007. Nerve growth factor potentiates p53 DNA binding but inhibits nitric oxide-induced apoptosis in neuronal PC12 cells. Neurochem. Res. 32(9): 1573-1585.

Cappelletti, G., Tedeschi, G., Maggioni, M. G., Negri, A., Nonnis, S., and Maci, R. 2004. The nitration of tau protein in neurone-like PC12 cells. FEBS Lett. 562(1-3): 35-93.

Chiusa, M., Timolati, F., Perriard, J. C., Suter, T. M., and Zuppinger, C. 2012. Sodium nitroprusside induces cell death and cytoskeleton degradation in adult rat cardiomyocytes in vitro: implications for anthracycline-induced cardiotoxicity. Eur. J. Histochem. 56(2): e15.

Circu, M. L., and Aw, T. Y. 2012. Glutathione and modulation of cell apoptosis. Biochim. Biophys. Acta. 1823(10): 1767-1777.

Cox, A.D., and Der, C.J. 2010. Ras history: The saga continues. Small Gtpases. 1(1): 2-27.

Cregan, S. P., Dawson, V. L., Slack, R. S. 2004. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. Oncogene. 23(16): 2785-2796.

De Cesare, D., Fimia, G. M. and Sassone-Corsi, P. 1999. Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. Trends Biochem. Sci. 24: 281-285.

Dichter, M. A., Tischler, A. S., Greene, L. A. 1977. Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of a rat pheochromocytoma cell line. Nature. 268(5620): 501-504.

Du, K. and Montminy, M. 1998. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. J. Biol. Chem. 273: 32377-32379.

Fábián, Z., Vecsernyés, M., Pap, M., and Szeberényi, J. 2006. The effects of a mutant p53 protein on the proliferation and differentiation of PC12 rat phaeochromocytoma cells. J Cell Biochem. 99(5): 1431-1441.

Fábián, Zs., Csatary, C. M., Csatary, L. K., and Szeberényi, J. 2007. p53-independent endoplasmic reticulum stress-mediated cytotoxicity of a Newcastle disease virus strain in tumor cell lines J. Virol. 81(6): 2817-2830.

Farnsworth, C. L., and Feig, L. A. 1991. Dominant inhibitory mutations in the Mg(2+)-binding site of RasH prevent its activation by GTP. Mol. Cell. Biol. 11(10): 4822-4829.

Feng, X., Sun, T., Bei, Y., Ding, S., Zheng, W., Lu, Y. and Shen, P. 2013. S-nitrosylation of ERK inhibits ERK phosphorylation and induces apoptosis. Sci Rep. 3: 1814.

Francis, S. H., Busch, J. L., Corbin, J. D. and Sibley, D. 2010. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. Pharmacol Rev. 62(3): 525-563.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fuld,a S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M. E., Piacentini, M., Rubinsztein, D. C., Shi, Y., Simon, H. U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovsky, B., Melino, G., and Kroemer, G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death Differ. 19(1): 107-120.

Gaston, B. M., Carver, J., Doctor, A., and Palmer, L. A. 2003. S-nitrosylation signaling in cell biology. Mol. Interv. 3(5): 253-263.

Green, S. H., Rydel, R. E., Connolly, J. L., and Greene, L. A. 1986. PC12 cell mutants that possess low- but not high-affinity nerve growth factor receptors neither respond to nor internalize nerve growth factor. J. Cell. Biol. 102(3): 830-843.

Greene, L.A., and Tischler, A.S. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73(7): 2424-2428.

Halaschek-Wiener, J., Wacheck, V., Kloo, Y., and Jansen, B. 2004. Ras inhibition leads to transcriptional activation of p53 and down-regulation of Mdm2: two mechanisms that cooperatively increase p53 function in colon cancer cells. Cell Signal. 16(11): 1319-1327.

Han, O. J., Joe, K. H., Kim, S. W., Lee, H. S., Kwon, N. S., Baek, K. J., and Yun, H. Y. 2001. Involvement of p38 mitogen-actived protein kinase and apoptosis signal-regulating kinase-1 in nitric oxide-induced cell death in PC12 cells. Neurochem. Res. 26(5): 525-532.

Heinrich, T. A., da Silva, R. S., Miranda, K. M., Switzer, C. H., Wink, D. A. and Fukuto, J. M. 2013. Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. Br. J. Pharmacol. 169(7): 1417-1429.

Heo, J. and Campbell, S. L. 2004. Mechanism of p21Ras S-nitrosylation and kinetics of nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange. Biochemistry 43: 2314-2322.

Hindley, S., Juurlink, B. H., Gysbers, J. W., Middlemiss, P. J., Herman, M. A. and Rathbone M. P. 1997. Nitric oxide donors enhance neurotrophin-induced neurite outgrowth through a cGMP-dependent mechanism. J. Neurosci. Res. 47: 427-439.

Ischiropoulos, H., and Gow, A. 2005. Pathophysiological functions of nitric oxide-mediated protein modifications. Toxicology. 208(2): 299-303.

Jackson, T.R., Blader, I. J., Hammonds-Odie, L. P., Burga, C. R., Cooke, F., Hawkins, P. T., Wolf, A. G., Heldman, K. A. and Theibert, A. B. 1996. Initiation and maintenance of NGF-stimulated neurite outgrowth requires activation of a phosphoinositide 3-kinase. J Cell Sci. 109 (Pt 2): 289-300.

Jänicke, R. U., Graupner, V., Budach, W., and Essmann, F. 2009. The do's and don'ts of p53 isoforms. Biol. Chem. 390(10): 951-963.

Jeong, H.S., Kim, S.W., Baek, K.J., Lee, H.S., Kwon, N.S., Kim, Y.M., and Yun, H.Y. 2002. Involvement of Ras in survival responsiveness to nitric oxide toxicity in pheochromocytoma cells. J. Neurooncol. 60(2): 97-107.

Kalisch, B.E., Demeris, C. S., Ishak, M. and Rylett, R. J. 2003. Modulation of nerve growth factor-induced activation of MAP kinase in PC12 cells by inhibitors of nitric oxide synthase. J. Neurochem. 87: 1321-1332.

Kang, Y. C., Kim, P. K., Choi, B. M., Chung, H. T., Ha, K. S., Kwon, Y. G., and Kim, Y. M. 2004. Regulation of programmed cell death in neuronal cells by nitric oxide. In Vivo. 18(3): 367-376.

Khoury, M. P., and Bourdon, J. C. 2011. p53 Isoforms: An intracellular microprocessor? Genes Cancer. 2(4): 453-465.

Kim, D. H., Kundu, J. K., and Surh, Y. J. 2011. Redox modulation of p53: mechanisms and functional significance. Mol. Carcinog. 50(4): 222-234.

Kiss, K., Bartek, B., Nusser, N., and Szeberényi, J. 1998. Ras-dependence of nerve growth factor induced inhibition of proliferation of PC12 cells. Acta Biol. Hung. 49: 97-102.

Kiss, K., Salamon, S., Törőcsik, B., and Szeberényi, J. 2006. Role of phospholipase C-gamma in NGF-stimulated differentiation and gene induction. Acta Biol. Hung. 57(2):147-155.

Lander, H. M., Hajjar, D. P., Hempstead, B. L., Mirza, U. A., Chait, B. T., Campbell, S., and Quilliam, L. A. 1997. A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. J. Biol. Chem. 272(7): 4323-4326.

Leist, M., and Jäättelä, M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2(8): 589-598.

Li, C. Q., and Wogan, G. N. 2005. Nitric oxide as a modulator of apoptosis. Cancer Lett. 226(1), 1-15.

Li, L., Feng, Z., and Porter, A. G. 2004. JNK-dependent phosphorylation of c-Jun on Ser63 mediates nitric oxide-induced apoptosis of neuroblastoma cells. J. Biol. Chem. 279(6): 4058-4065.

Liaudet, L., Vassalli, G. and Pacher, P. 2009. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. Front Biosci. (Landmark Ed). 14: 4809-4814.

Lindenboim, L., Borner, C., and Stein, R. 2011. Nuclear proteins acting on mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. 1813(4): 584-596.

Lirk, P., Hoffmann, G. and Rieder, J. 2002. Inducible nitric oxide synthase--time for reappraisal. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 1(1): 89-108.

Loeb, D. M., and Greene, L. A. 1993. Transfection with trk restores "slow" NGF binding, efficient NGF uptake, and multiple NGF responses to NGF-nonresponsive PC12 cell mutants. J. Neurosci. 13(7): 2919-2929.

Loeb, D. M., Stephens, R. M., Copeland, T., Kaplan, D. R., and Greene, L. A. 1994. A Trk nerve growth factor (NGF) receptor point mutation affecting interaction with phospholipase C-gamma 1 abolishes NGF-promoted peripherin induction but not neurite outgrowth. J. Biol. Chem. 269(12): 8901-8910.

Lu, Z., and Xu, S. 2006. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. IUBMB Life. 58(11): 621-631.

Luo, H. R., Hattori, H., Hossain, M. A., Hester, L., Huang, Y., Lee-Kwon, W., Donowitz, M., Nagata, E., and Snyder, S. H. 2003. Akt as a mediator of cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. 100(20): 11712-11717.

Mancini, M., Nicholson, D. W., Roy, S., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Casciola-Rosen, L. A., Rosen, A. 1998. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. J. Cell Biol. 140(6): 1485-1495.

Marcel, V. and Hainaut, P. 2010. p53 isoforms - a conspiracy to kidnap p53 tumor suppressor activity? Cell Mol Life Sci. 66 (2009) 391-406, and Olivares-Illana, V., Fåhraeus, R. p53 isoforms gain functions. Oncogene. 29: 5113-5119.

Mark, M. D. and Storm, D. R. 1997. Coupling of epidermal growth factor (EGF) with the antiproliferative activity of cAMP induces neuronal differentiation. J. Biol. Chem. 272(27): 17238-17244.

Martinez-Ruiz, A. and Lamas, S. 2004. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. Cardiovasc. Res. 62: 43-52.

Martínez-Ruiz, A., Cadenas, S. and Lamas, S. 2011. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. Free Radic. Biol. Med. 51(1): 17-29.

Matsuzawa, A., and Ichijo, H. 2001. Molecular mechanisms of the decision between life and death: regulation of apoptosis by apoptosis signal-regulating kinase 1. J. Biochem. 130(1): 1-8.

Mullenbrock, S., Shah, J. and Cooper, G. M. 2011. Global expression analysis identified a preferentially nerve growth factor-induced transcriptional program regulated by sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase

(ERK) and AP-1 protein activation during PC12 cell differentiation. J Biol Chem. 286(52): 45131-45145.

Niknahad, H., and O'Brien, P. J. 1996. Involvement of nitric oxide in nitroprusside-induced hepatocyte cytotoxicity. Biochem. Pharmacol. 51(8): 1031-1039.

Numajiri, N., Takasawa, K., Nishiya, T., Tanaka, H., Ohno, K., Hayakawa, W., Asada M., Matsuda, H., Azumi, K., Kamata, H., Nakamura, T., Hara, H., Minami, M., Lipton, S.A., and Uehara, T. 2011. On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108(25): 10349-10354.

Olivares-Illana, V., Fåhraeus, R. 2010. p53 isoforms gain functions. Oncogene. 29:5113-5119.

Pap, M., and Szeberényi, J. 2008. Involvement of proteolytic activation of protein kinase R in the apoptosis of PC12 Pheochromocytoma cells. Cell. Mol. Neurobiol. 28: 443-456

Peunova, N. and Enikolopov, G. 1995. Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. Nature 375: 68-73.

Phung, Y. T., Bekker, J. M., Hallmark, O. G. and Black, S. M. 1999. Both neuronal NO synthase and nitric oxide are required for PC12 cell differentiation: a cGMP independent pathway. Brain Res. Mol. Brain Res. 64: 165-178.

Poluha, W., Schonhoff, C. M., Harrington, K. S., Lachyankar, M. B., Crosbie, N. E., Bulseco, D. A. and Ross, A. H. 1997. A novel, nerve growth factor-activated pathway involving nitric oxide, p53, and p21WAF1 regulates neuronal differentiation of PC12 cells. J. Biol. Chem. 272: 24002-24007.

Robbins, D. J., Cheng, M., Zhen, E., Vanderbilt, C. A., Feig, L. A., and Cobb, M. H. 1992. Evidence for a Ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 89(15): 6924-6928.

Rudkin, B. B., Lazarovici, P., Levi, B. Z., Abe, Y., Fujita, K. and Guroff, G. 1989. Cell cycle-specific action of nerve growth factor in PC12 cells: differentiation without proliferation. EMBO J. 8: 3319-3325.

Ryberg, H. and Caidahl, K. 2007. Chromatographic and mass spectrometric methods for quantitative determination of 3-nitrotyrosine in biological samples and their

application to human samples. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 851(1-2): 160-171.

Schneiderhan, N., Budde, A., Zhang, Y., and Brüne, B. 2003. Nitric oxide induces phosphorylation of p53 and impairs nuclear export. Oncogene. 22(19): 2857–2868.

Schonhoff, C. M., Bulseco, D. A., Brancho, D. M., Parada, L. F. and Ross, A. H. 2001. The Ras-ERK pathway is required for the induction of neuronal nitric oxide synthase in differentiating PC12 cells. J. Neurochem. 78: 631-639.

Sha, Y., and Marshall, H. M. 2012. S-nitrosylation in the regulation of gene transcription. Biochim. Biophys. Acta. 1820(6): 701-711.

Shahani, N., and Sawa, A. 2012. Protein S-nitrosylation: role for nitric oxide signaling in neuronal death. Biochim. Biophys. Acta. 1820(6): 736-742.

Snyder, C. M., Shroff, E. H., Liu, J., and Chandel, N. S. 2009. Nitric oxide induces cell death by regulating anti-apoptotic BCL-2 family members. PLoS One. 4(9): e7059.

Souza, J. M., Peluffo, G., and Radi, R. 2008. Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? Free Radic. Biol. Med. 45(4): 357-366.

Stacey, D. W., Feig, L. A., and Gibbs, J. B. 1991. Dominant inhibitory Ras mutants selectively inhibit the activity of either cellular or oncogenic Ras. Mol. Cell. Biol. 11(8): 4053-4064.

Szeberényi, J., Cai, H., and Cooper, G. M. 1990. Effect of a dominant inhibitory Ha-Ras mutation on neuronal differentiation of PC12 cells. Mol. Cell. Biol. 10(10): 5324-5332.

Szeberényi, J., Erhardt, P., Cai, H. and Cooper, G. M. 1992. Role of Ras in signal transduction from the nerve growth factor receptor: relationship to protein kinase C, calcium and cyclic AMP. Oncogene 7: 2105-2113.

Szeberényi, J. and Erhardt, P. 1994. Cellular components of nerve growth factor signaling. Biochim. Biophys. Acta 1222: 187-202.

Tait, S. W., and Green, D. R. 2008. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. Oncogene. 27(50): 6452-6461.

Tamatani, M., Ogawa, S., Niitsu, Y., and Tohyama, M. 1998. Involvement of Bcl-2 family and caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis. J Neurochem. 71(4): 1588-1596.

Tedeschi, G., Cappelletti, G., Negri, A., Pagliato, L., Maggioni, M. G., Maci, R., and Ronchi, S. 2005. Characterization of nitroproteome in neuron-like PC12 cells differentiated with nerve growth factor: identification of two nitration sites in alpha-tubulin. Proteomics. 5(9): 2422-2432.

Tedeschi, G., Cappelletti, G., Nonnis, S., Taverna, F., Negri, A., Ronchi, C., and Ronchi, S. 2007. Tyrosine nitration is a novel post-translational modification occurring on the neural intermediate filament protein peripherin. Neurochem. Res. 32(3): 433-441.

Tedeschi, A., and Di Giovanni, S. 2009. The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon. EMBO Rep. 10(6): 576-583.

Teng, K. K., Esposito, D. K., Schwartz, G. D., Lander, H. M., and Hempstead, B. L. 1999. Activation of c-Ha-Ras by nitric oxide modulates survival responsiveness in neuronal PC12 cells. J. Biol. Chem. 274(52): 37315-37320.

Thomas, S. M., DeMarco, M., D'Arcangelo, G., Halegoua, S., and Brugge, J. S. 1992. Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. Cell. 68(6): 1031-1040.

Tong, L., Heim, R. A., and Wu, S. 2011. Nitric oxide: a regulator of eukaryotic initiation factor 2 kinases. Free Radic. Biol. Med. 50(12): 1717-1725.

Traverse, S., Gomez, N., Paterson, H., Marshall, C. J. and Cohen, P. 1992. Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Biochem. J. 288: 351-355.

Wada, K., Okada, N., Yamamura, T., and Koizumi, S. 1996. Nerve growth factor induces resistance of PC12 cells to nitric oxide cytotoxicity. Neurochem. Int. 29(5): 461-467.

Wang, C., Trudel, L. J., Wogan, G. N., and Deen, W. M. 2003. Thresholds of nitric oxide-mediated toxicity in human lymphoblastoid cells. Chem. Res. Toxicol. 16(8): 1004-1013.

Wink, D. A., Cook, J. A., Pacelli, R., DeGraff, W., Gamson, J., Liebmann, J., Krishna, M. C., and Mitchell JB. 1996. The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. Arch. Biochem. Biophys. 331(2): 241-248.

Wood, K. W., Sarnecki, C., Roberts, T. M., and Blenis, J. 1992. ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1 and Rsk. Cell. 68(6): 1041-1050.

Wu, G. S. 2004. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. Cancer Biol. Ther. 3(2): 156-161.

Yamada, M., Momose, K., Richelson, E., and Yamada, M. 1996. Sodium nitroprusside-induced apoptotic cellular death via production of hydrogen peroxide in murine neuroblastoma N1E-115 cells. J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 35(1): 11-17.

Yamakura, F. and Ikeda, K. 2006. Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitric oxide species. Nitric Oxide 14: 152-161.

Yan, C. Y., and Greene, L. A. 1998. Prevention of PC12 cell death by N-acetylcysteine requires activation of the Ras pathway. J. Neurosci. 18(11): 4042-4049.

Yan, G. Z. and Ziff, E. B. 1995. NGF regulates the PC12 cell cycle machinery through specific inhibition of the Cdk kinases and induction of Cyclin D1. J. Neurosci. 15(9), 6200-6212.

Yao, R., and Cooper, G. M. 1995. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. Science. 267(5206): 2003-2006.

Young Park, S., Jeong, Y. J., Kim, S. H., Jung, J. Y., and Kim, W. J. 2013. Epigallocatechin gallate protects against nitric oxide-induced apoptosis via scavenging ROS and modulating the Bcl-2 family in human dental pulp cells. J. Toxicol. Sci. 38(3): 371-378.

A PhD-kutatás keretében született publikációk

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

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

Előadások és poszterek:

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

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

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

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

Bátor J., Varga J., Harci A., Stark B., Tarjányi O., Szeberényi J.: Nitroziláció hatása PC12 sejtek neuronális differenciációjára, Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006. augusztus 30. – szeptember 2.

Bátor J.: A nitrogén-oxid szerepe a neuronális differenciációban. Magyar Biológiai Társaság Szakülése, Pécs, 2007.

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

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

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

Bátor J.: Nitrogén-monoxid szerepe idegi eredetű sejtek apoptózisában. Magyar Biológiai Társaság Szakülése, Pécs, 2011.

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

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

Egyéb, a témához nem kapcsolódó közlemények

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

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

Előadások és poszterek

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

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

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

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

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

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

Bátor, J., Varga, J., Péter, M., Pap, M., Szeberényi, J.: The role of p53 protein in nitric oxide induced cell death of PC12 cells, EMBO Meeting on Cellular Signaling and Molecular Medicine, Horvátország, Cavtat, 2008. máj. 29 – jún. 4. (Absztrakt: P48)

Varga J., Bátor J., Szeberényi J.: Nitric oxide-induced apoptosis of PC12 cells, 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference, Athén, Görögország, 2008. jún. 28 - júl. 3. (Absztrakt: PP7A-90)

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

Bátor, J., Fábián, Z., Pap, M., Sétáló G. Jr., Csatáry, L. K., Szeberényi, J.: Defects in endoplasmic reticulum stress and interferon signaling in Newcastle

disease virus resistant PC12 cells, 6th Swiss Apoptosis Meeting, Bern, Svájc, 2010. szept.30 – okt. 1. (Absztrakt: No. 04.)

Bátor J., Fábián Z., Pap M., ifj. Sétáló G., Csatáry K. L., Szeberényi J.: Az interferon jelátvitel és az endoplazmatikus retikulum stressz jelátvitelének zavarai Newcastle betegség vírusra rezisztens PC12 sejtekben IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011. márc. 25-27. (Absztrakt O092)

Varga J., Bátor J., Péter M., Pap M., ifj. Sétáló G., Szeberényi J.: Domináns gátló p53 fehérjét expresszáló PC12 sejtek fokozottabban érzékenyek a nitrogén-oxid apoptotikus hatására, IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011. márc. 25-27. (Absztrakt O093)

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