Fehérjekináz aktiváció és transzlokáció jelentősége PC12 sejtek neuronális differenciációjában

Ph. D. értekezés tézisei

Készítette: Boglári Gábor
Témavezető: Szeberényi József
PTE ÁOK Orvosi Biológia Intézet

2002

Bevezetés

Jelen dolgozat a PTE ÁOK Orvosi Biológia intézetében folyó, a *"Ras fehérjék szerepe a jelátvitelben"* című Ph. D. program keretében elvégzett munka eredménye; a téma vezetője Szeberényi József professzor. Az intézet egyik fő célkitűzése az idegsejt növekedési faktor (NGF) által kiváltott neuronális differenciációhoz vezető jelátviteli folyamatok részleteinek tisztázása. Erre a célra a legszélesebb körben - így általunk is - használt modellrendszert a PC12 patkány phaeochromocytoma sejtvonal képezi; bár a rendszer által szolgáltatott eredményeket általános következtetések levonása szempontjából számos kutató limitáltnak tartja, ezidáig megbízhatóbban detektálható és reprodukálható morfológiai változásokat produkáló sejtvonalat létrehozni még nem sikerült. Az eredetileg kis, kerek kromaffin sejtek NGF kezelés hatására hosszú nyúlványokat növesztenek, alakjuk megváltozik, összességében tipikus, szimpatikus jellegű neuronokhoz hasonló fenotípust alakítanak ki. Az ehhez vezető intracelluláris jelátviteli utakban központi szerepet játszik egy - számos különböző humán tumorban etiológiai tényezőként felismert - onkogénfehérje, a Ras. Ez a kis G-fehérjék csoportjába tartozó, a membrán belső felszínén elhelyezkedő molekula közvetíti a sejtfelszíni receptorra érkező növekedési faktorok által generált szignált a citoplazmatikus jelátviteli rendszer enzimei felé. Effektorai közül - eddigi ismereteink alapján - egy fehérjekináz-kaszkád képezi a legfontosabb differenciációs útvonalat. Ezen kaszkád elemei közül a mitogén-aktivált proteinkinázok (MAPK-ok) családjába tartozó extracelluláris szignál által regulált kináz (ERK) enzimek aktivitásának időkinetikáját és sejten belüli lokalizációs változásait kritikus jelentőségűnek tartják a differenciációs válasz szempontjából. Ezek az enzimek aktiválják ugyanis a jelátviteli rendszer végső célpontjait képező, a sejtmagban található transzkripciós faktorokat, amelyek a differenciációban szerepet játszó egyes korai és késői gének indukciójában vesznek részt.

Kutatási témámban elsősorban az ERK-ek és néhány egyéb ($p90^{Rsk}$, JNK, p38MAPK, p70S6 kináz), PC12 sejtek jelátviteli útjaiban részt vevő Ser/Thr specifikus fehérjekináz szerepét - aktiválódásukat, annak időkinetikáját, transzportjukat, nukleáris transzlokációjukat, ill. ezen folyamatok Ras-függését - vizsgáltam, különös tekintettel arra, milyen jelentőséggel bírnak mindezek a differenciációs szignál továbbításának szempontjából. Bizonyossággal állítható, hogy a fenti enzimek eltérő idő- és térbeli aktivációs mintázatot mutatnak különböző növekedési faktorok és másodlagos messenger analógok hatására, és szerepük jelentős mértékben különbözik egymástól az NGF által indukált jelátviteli folyamatokban. Bízom abban,

hogy a dolgozatban leírt megfigyelések hozzájárulhatnak az egyes fehérjék specifikus szerepének és viselkedésbeli különbségeinek, ezen keresztül pedig az NGF-szignalizáció bonyolult mechanizmusának jobb megértéséhez.

Kísérleti módszerek

Sejttenyésztés

A normál PC12 sejtek ill. mutáns szubklónjaik (Z-M17-5, M-M17-26 és nnr5 sejtvonalak) tenyésztését Dulbecco által módosított Eagle médiumban végeztük. Az optimális növekedési feltételek biztosítására a médiumot 5% borjú-, ill. 10% lószérummal egészítettük ki. A sejtek különböző ágensekkel történő kezelése - az egyes kísérleteknél feltüntetett ideig - az alábbi koncentrációkban történt: NGF - 50-100 ng/ml; EGF - 20-50 ng/ml; db,cAMP (dibutril ciklikus AMP) - 0,5 mM; TPA (12-0-tetradekanoil forbol-13-acetát) - 20 nM; ionomycin - 0,25 μM; anisomycin - 10 ng/ml; okadailsav - 1-10 nM; ortovanadát - 1-10 μM; Trk inhibitor K252a - 200 nM; MEK inhibitor PD98059 - 20 μM; p38MAPK inhibitor SB203580 - 1 μM.

A differenciáció morfológiai vizsgálata

A sejttenyésztés 24 lyukú tenyésztőedényben [redacted] után (10^4 sejt/lyuk) az egyes ágensekkel alacsony szérumtartalmú (0,5% [redacted]) [redacted] végeztük a kezelést két héten át. A tenyészetekben két-három naponként [redacted] differenciáció mértékét, oly módon, hogy megállapítottuk azon sejtek [redacted] amelyek több mint egy, a sejttestük átmérőjénél kétszer hosszabb nyúlványt növesztettek.

Western blot analízis

A sejteket 100 mm átmérőjű tenyésztőedénybe ültettük ki ($5x10^6$ sejt/edény), majd a megfelelő kezelést megelőzően a médiumot két napra teljesen szérummentes médiumra cseréltük le, hogy a lehető legalacsonyabb mértékűre szorítsuk a vizsgálni kívánt kináz alapaktivitását. A kezeléseket ezt követően friss, szérummentes médiumban végeztük. A médium eltávolítása után az edényt 4°C-os PBS-el leöblítettük, majd a sejtek feltárását 1 ml RIPA pufferrel végeztük el, amelyet frissen hozzáadott foszfatáz és proteáz inhibitorokkal (aprotinin, PMSF, ortovanadát) egészítettünk ki. A sejteket lekapartuk, majd a lizátumot 2-3x 21G-s tűn passzíroztuk át, a DNS szétroncsolása céljából. 30 perces jégen történő inkubációt követően a lizátumot 15.000 g-vel 20 percen keresztül centrifugáltuk, majd a felülúszó 40 μl-ét ugyanilyen mennyiségű mintapufferrel összekeverve 5 percig forraltuk. Rövid hűtés után a fehérjéket SDS jelenlétében 10%-os poliakrilamid gélben választottuk szét (50 mA, 2 óra), majd elektroblotot végeztünk (200 mA, 12 óra). A membránon a keresett fehérjék specifikus

antitesttel történő kimutatása az alábbi protokoll szerint történt: háttérblokkolás 5%-os tejpor/PBS-ben 1 órán át, első antitest a megfelelő higításban (anti P-ERK 1:1000, anti P-CREB 1:1000, anti ERK2 1:5000, anti P-p38MAPK 1:500, anti JNK 1:1000, anti P-JNK 1:1000, anti $p90^{Rsk}$ 1:2000, anti p70S6 kináz 1:1000, anti Nck 1:1000) 1%-os tejpor/PBST-ben 1órán át, 3x5 perc mosás 1%-os tejpor/PBST-ben, második antitest (HRP-konjugált anti nyúl vagy anti egér immunglobulin 1:2000 vagy 1:1000) 1%-os tejpor/PBST-ben 30 percen át, 3x20 perc mosás 1%-os tejpor/PBST-ben, végül kemilumineszcencián alapuló detektálás ECL kit felhasználásával.

Nck kötődési teszt

A sejttenyésztés az előbbiekben [illegible] ez esetben lemezenként 1 ml, proteáz- és foszfát[illegible] puffert használtunk. Lekaparás és 13.000 g-n 5 [illegible] felülúszót kettéosztottuk, egyik felét 20 µl teljes Nck/GST [illegible] Nck-SH3/GST jelenlétében, másik felét 5 µl kontroll GST-vel [illegible] inkubáltuk. 1000 g-n 5 percig történő centrifugálás [illegible] fel majd újra centrifugáltuk, [illegible] felülúszót Hamilton [illegible] azt 5 percig forraltuk. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis és az ez [illegible] a fent leírtak alapján történt. A kapcsolódott fehérjék specifikus kimutatására anti P-Tyr antitestet használtunk (1:10.000-es higításban), egyebekben a Western blotnál leírt protokollt követtük.

Gélben végzett kináz aktivációs esszé

A sejttenyésztés, kezelés és feltárás előbbiekben részletezett lépéseinek elvégzése után az extraktumot olyan SDS-poliakrilamid gélben futtattuk, amely - a gélbe polimerizált formában - 0,5 mg/ml koncentrációjú mielin bázikus proteint (MBP) tartalmazott foszfátakceptorként. Az elektroforézis elvégzése után a kinázreakciót (γ^{32}P)ATP felhasználásával végeztük el. A nem inkorporálódott radioaktív foszfátcsoportok intenzív mosással történő eltávolítása után az ERK-eket jellemző csúcsok vizualizálása és kvantitálása Phosphor Imager segítségével történt.

Immuncitokémia

A sejtek tenyésztése ebben az esetben 30 mm-es tenyésztőedényekben, steril, poli-L-lizinnel fedett fedőlemezeken történt ($5x10^4$ sejt/edény). A megfelelő kezelések után PBS-el történő mosást követően a sejteket -20°C-os metanol/aceton 7:3 arányú keverékében fixáltuk 2 percig. 3x5 perces PBS-el történő mosás után az endogén peroxidáz aktivitás gátlása céljából 10 percig 0,1%-os H_2O_2-ban inkubáltuk a sejteket, majd az ABC festési eljárás protokollját követve az alábbi lépésekkel mutattuk ki a fehérjék sejten belüli lokalizációját: 1,5%-os blokkoló szérum/PBS 1 órán át, első antitesttel történő inkubáció (anti ERK2 1:2000, anti P-ERK 1:250, anti $p90^{Rsk}$ 1:1500, anti p70S6 kináz 1:500, anti CREB 1:1000, anti P-CREB 1:1000, anti Jun 1:1000, anti Fos 1:1000, anti p38MAPK 1:500, anti JNK 1:500) éjszakán át 4°C-on, 3x5 perc mosás PBS-ben, inkubáció biotin-konjugált második antitesttel (anti nyúl vagy anti egér 1:1000) 30 percig, 3x5 perc mosás PBS-ben, inkubáció avidin-biotin enzimreagenssel 30 percig, 3x5 perc mosás, inkubáció peroxidáz-szubsztráttal (Vectastain Nova Red vagy Ni-DAB) a megfelelő színreakció eléréséig (egyes esetekben ezüst-intenzifikálással kiegészítve), végül dehidratálás felszálló alkoholsorozattal és xilollal majd lefedés DePex vagy VectaMount lefedőszerrel. (Egyes esetekben metilzölddel ill. metilzöld-pironinnal történő sejtfestést is alkalmaztunk.)

Célkitűzések és kísérleti eredmények

1/ ERK aktiváció, különös tekintettel annak időfüggésére

Évek óta ismert, több sejttípusban is leírt megfigyelés, hogy az ERK enzimek stimulációja számos külső hatásra igen gyorsan (percek alatt) bekövetkezik, ám eltérő biológiai hatást kiváltó ágensek az enzimek eltérő idejű aktiváltsági állapotát képesek fenntartani. PC12 sejtekben például a sejtek proliferációját kiváltó növekedési faktorok (ilyen az EGF) átmeneti, mintegy 30 percen belül megszűnő, míg differenciációt kiváltani képes ágensek (pl. az NGF) elnyújtott, több órán át is észlelhető ERK aktivációt okoznak. Amennyiben az ERK aktivációt mesterségesen teszik tartóssá, pl. EGF receptor overexpresszióját követő EGF kezeléssel, úgy a [illegible] nyúlványokhoz hasonló neuritokat növesztenek. Ezeken a [illegible], mely szerint a különböző növekedési faktorok eltérő [illegible] okozott eltérő időkinetikájú ERK aktiváció fenntartásán keresztül [illegible]

Ras szerepe az ERK aktivációban

Elsődleges célkitűzésünk a fent bemutatott bizonyítása volt, az általunk használt kísérleti rendszer segítségével. Ennek érdekében 5-től 180 percig tartó, EGF-el ill. NGF-el történő kezelés után speciális, csak a foszforilált - azaz aktivált állapotban levő - fehérjékhez kapcsolódó antitestek segítségével végzett Western blot analízissel követtük nyomon az ERK aktivációt a rendelkezésünkre álló sejtvonalakon. Vad típusú PC12 sejtjeinkben - az irodalmi adatokkal összhangban - az alábbi eredményeket kaptuk: EGF-hatásra az ERK foszforiláció csúcspontja 5 perces kezelésnél jelentkezik, 15 percnél ehhez képest mintegy 50%-os intenzitással észlelhető, majd 45 percnél teljesen lecseng; az NGF kezelés hatására bekövetkező foszforiláció csúcspontja azonban 5-15 perc körül látható és fokozatos csökkenés után csak mintegy 3 órás kezelés után tűnik el teljesen. Amennyiben a sejtek kezelését NGF mellett az ERK-eket aktiváló MEK enzimek specifikus inhibitorával (PD98059) egészítettük ki, még átmeneti ERK aktiváció sem következett be, és a neuronális differenciáció is elmaradt. Ez a megfigyelés egyértelművé teszi, hogy az ERK-ek esszenciális szerepet játszanak a differenciációs válasz jelátvitelében. Ez a szerep eddigi ismereteink szerint a jelátvitel első fázisára szorítkozik, arra nézve azonban nincs adatunk, vajon van-e jelentősége az ERK

foszforilációnak a fenotípusváltozás későbbi szakaszaiban. NGF-el 1-től 7 napig kezelt PC12 sejtek anti P-ERK Western blot analízise azonban nem mutatott detektálható ERK foszforilációt ezen időintervallumban - azaz ilyen hosszan fennálló ERK aktivitás bizonyosan nem szükséges a neuritnövekedéshez.

Vad típusú PC12 sejtekkel szemben a domináns gátló Ras-t expresszáló PC12 sejtvonalak NGF kezelésre nem mutatnak differenciációt - kíváncsiak voltunk, vajon ERK foszforiláció bekövetkezik-e ezekben a sejtekben növekedési faktor-stimuláció hatására. Eredményeink szerint a gátló Ras fehérjét alacsony mértékben expresszáló Z-M17-5 sejtekben mind EGF, mind NGF képes gyenge, Western blot-tal alig kimutatható ERK aktiváció előidézésére. A foszforiláció itt is, csakúgy mint a vad típusú PC12 sejtekben, 5 perces kezelés után jelentkezik, ám mindkét növekedési faktor esetében 30 perc elteltével le is cseng - azaz intakt Ras funkció hiányában nem csak a differenciáció marad el, de elnyújtott ERK aktiváció sem következik be. Ami a magas gátló Ras expressziójú M-M17-26 sejtvonalat illeti, ezekben a sejtekben sem EGF-, sem NGF-hatásra bekövetkező ERK foszforilációt kimutatni nem tudtunk. Még feltűnőbb volt az egyes sejtvonalak, ill. az EGF/NGF hatás közti különbség, ha az ERK aktivációt gélben végzett kináz esszé segítségével vizsgáltuk meg. Ebben az esetben 10 perces NGF-hatásra M-M17-26 sejtekben a szubsztrátként használt myelin bázikus protein (MBP) ERK-ek általi foszforilációja a kezeletlen sejtekben mérhető értékhez képest (Phosphor Imager analízis alapján) alig 5x-ösére, míg Z-M17-5 sejtekben mintegy 15x-ösére emelkedett - ez jóval kisebb mértékű volt, mint normál PC12 sejtekben, ahol az ERK aktivitás-növekedés kb. 40x-esnek mutatkozott. Elnyújtott idejű NGF kezelés még szembetűnőbb különbséget mutatott: míg normál PC12 sejtekben 120 perc elteltével is jelentős ERK aktivitás volt kimutatható, a Z-M17-5 sejtvonalban az ERK aktivitás mintegy 30 perc elteltével az alapaktivitás értékére esett vissza, feltűnően hasonló módon ahhoz, ahogy az vad típusú PC12 sejtekben EGF hatására következik be. Ezek az eredmények egyértelműen megerősítik egyrészt azt, hogy normál Ras funkció esszenciális az elnyújtott ERK aktivitáshoz, másrészt, hogy tartós ERK aktivitás csak neuronális differenciációt kiváltani képes növekedési faktor hatására játszódik le.

Másodlagos messenger analógok-kiváltotta ERK aktiváció

Az ERK aktivitás jelentőségét vizsgáló kísérleteink következő fázisában különböző másodlagos messenger analógokkal önmagukban, ill. növekedési faktorral kombinálva kezeltük a sejteket. Kísérleti adatok ugyanis mind Ca^{++}-, mind cAMP-függő hatásoknak több

vonatkozásban is szerepet tulajdonítanak a differenciációs jelátvitelben; KCl-indukálta, emelkedett Ca^{++} influxhoz vezető membrán depolarizáció pl. Ras által közvetített ERK aktivációhoz vezet, ráadásul KCl EGF-el kombinációban történő adása neuritnövekedést indukál PC12 sejtekben. Ami a ciklikus AMP-t illeti, az önmagában nem képes differenciációs válasz kiváltására, de potencírozza az NGF ilyen irányú hatását, másfelől egyes adatok szerint EGF/cAMP kombinációs kezelés hatására a sejtek neuritokat növesztenek. Ugyanilyen eredményhez vezet, ha PC12 sejtekben a cAMP jelátviteli utat az agyalapi mirigyből származó cAMP-aktivátor polipeptiddel (PACAP) stimulálják. Ami a cAMP út ERK aktivációra kifejtett hatását illeti, mind az adenilát cikláz-aktivátor forskolinnal, mind a cAMP analóg dibutyril cAMP-vel történő kezelés átmeneti ERK stimulációt eredményez, mégpedig Ras-függő módon. Leírták azonban azt is, hogy egy nem hidrolizálódó, rendkívül membrán-permeabilis cAMP analóg, a 8-(4-chlorophenylthio)-cAMP (CPT-cAMP) tartós ERK aktivációt és evvel járó neuritnövekedést képes indukálni PC12 sejtekben. Érdekes megfigyelés ugyanakkor, hogy bár a forbolészterek közé tartozó 12-0-tetradekanoil forbol-13-acetát (TPA) is képes elnyújtott ERK aktivációt okozni, ezt nem kíséri morfológiai változás. Kísérleteink során tisztázni szerettük volna ezeket a némileg ellentmondásos eredményeket, megpróbálván ok-okozati összefüggést találni az ERK aktiváció tartóssága és a neuronális differenciáció között. Munkánkban egyrészt - az előbbiekben már leírt anti foszfo-ERK Western blot analízis segítségével - az ERK foszforilációt vizsgáltuk, másrészt nyomon követtük a sejtmorfológiában bekövetkező esetleges változásokat. Ami az ERK aktivációt illeti, az összes általunk használt másodlagos messenger analóg - dbcAMP, TPA és a Ca^{++} ionofor ionomycin - képes ERK foszforilációt indukálni, mégpedig egymáshoz nagyon hasonló, és az EGF hatásával megegyező módon: az 5 perces kezelésekre jelentkező erőteljes foszforiláció 30 perc elteltével már alig észlelhető, órákkal később pedig teljesen eltűnik. Vagyis ezen ágensek hatása az ERK aktivációra önmagukban egyértelműen átmeneti. Amennyiben a másodlagos messengerekkel EGF-el kombinációban kezeltük a sejteket, hatásuk nem változott: EGF-el együtt adva sem voltak képesek sem az ERK aktiváció felerősítésére, sem tartóssá tételére. Összhangban ezekkel az eredményekkel, sem dbcAMP, sem ionomycin, sem TPA, sem pedig ezeknek EGF-el történő kombinációja nem volt képes az NGF hatásához hasonló differenciációs választ kiváltani PC12 sejtekben. Tény, hogy az EGF/dbcAMP és EGF/ionomycin kombinációs kezelések hatására a sejtek alakja megváltozik, sőt, 10-15%-ban még rövid nyúlványokat is növesztenek, ám ezeknek sem hossza, sem száma, sem arborizációja nem emlékeztet az NGF-re adott differenciációs válasz során

megfigyelhető neuritnövekedéshez. Ezekben az esetekben bizonyos tehát, hogy - legalábbis az általunk használt sejtvonalakon - neuronális differenciáció nem következik be, amikor az ERK aktiváció gyorsan lecseng. Nem tudjuk, hogy az elnyújtott ERK aktiváció és a neuritnövekedés között ok-okozati összefüggés áll-e fenn, de az bizonyos, hogy a két jelenség az általunk vizsgált esetekben együtt jár; az ezt leíró elméletet pedig olyan körülmények között támasztottuk alá, ahol modellrendszerünkben a különböző sejtvonalak mindegyikén ugyanarról a receptorról induló jelátviteli utakat tudtunk tanulmányozni. E rendszer nagy előnye, hogy kizárja esetleges egyéb szignálok jelenlétét, azaz nyilvánvalóbbá teszi, hogy az egyes sejtvonalak ugyanarra a jelre adott eltérő válasza mögött fellelhető különbségek - mint a tartós vs. átmeneti ERK aktiváció - alapvető jelentőséggel bírnak ezen eltérő biológiai válaszok kialakításában.

Egyéb fehérjekinázok aktivációja a differenciáció során

Végeztünk kísérleteket egyéb, a differenciációs jelátviteli utakban még kevésbé tisztázott jelentőségű fehérjekináz aktivációját illetően is. Vizsgálatainkat a MAPK család egyes elemeire, a JUN kinázokra és a p38MAPK-ra ill. az ERK-szubsztrát p90 riboszómális S6 kinázra ($p90^{Rsk}$) és a p70S6 kinázra terjesztettük ki. EGF, NGF és esetenként másodlagos messenger analóg kezelések hatására az enzimek aktivációs állapotában bekövetkező változásokat próbáltuk meg detektálni, egyrészt a foszforilált állapotú fehérjét felismerni képes antitesttel végzett Western blot, másrészt – ahol ilyen antitest még nem áll rendelkezésre – a foszforiláció által előidézett esetleges vándorlási "shift" kimutatásának segítségével. A JUN kinázok (JNK) a MAPK-k azon családját képezik, amelyek főként a sejtet érő stresszhatásokra aktiválódnak, de a tumor nekrózis faktor (TNF) vagy növekedési faktorok hatására bekövetkező indukciójuk is leírt. PC12 sejtekben a sejtek NGF által indukált differenciációját gátolni képes anisomycin JNK aktivációt idéz elő, melyet a Ras-gátlás alig befolyásol. Ez a megállapítás a p38MAPK-ra is igaz, amely enzimet egyébként elsőként mint lipopoliszacharidok által aktiválódni képes kinázt írták le, majd más megfigyelések a cAMP hatásainak közvetítésében tulajdonítottak neki szerepet. Mindkét fent említett enzim részt vesz az NGF-megvonás kiváltotta apoptózisban PC12 sejtekben, de a differenciációs válaszban betöltött esetleges szerepük nem ismeretes. Anti P-JNK és anti P-p38MAPK Western blotjaink alapján valószínűsíthető, hogy ez a szerep nem is lehet túl jelentős; ugyan vad típusú PC12 sejtekben mind EGF-re, mind NGF-re bekövetkezik JNK foszforiláció, ez azonban jóval gyengébb és

rövidebb ideig tartó, mint az anisomycin-indukálta aktiváció - anisomycin azonban nem okoz differenciációt -, ráadásul ugyanezt az eredményt kaptuk gátló Ras-t expresszáló sejtvonalainkon is. Ami a p38MAPK-t illeti, cAMP kezelés hatására gyengébb, anisomycinre valamivel markánsabb foszforilációt detektáltunk, növekedési faktorok azonban ebben a tekintetben hatástalannak bizonyultak.

Mint arról már az elméleti háttér tárgyalása során esett szó, az ERK-ek egyik legismertebb és legsokoldalúbb citoplazmatikus szubsztrátja a p90 riboszómális S6 kináz, amely számos célfehérje - elsősorban transzkripciós faktorok - foszforilációját végzi. A két enzim eukarióta sejtekben heterodimerként, egymással fizikai asszociációban található a citoplazmában *in vivo*, és lokalizációjuk megváltozása is együtt zajló folyamat. Ugyanakkor a $p90^{Rsk}$ foszforilációs kinetikája nem mindig korrelál az ERK aktivációval, vagyis indukciójában egyéb fehérjekinázok is szerepet játszhatnak. PC12 sejtekben kimutatott, hogy NGF-hatásra a $p90^{Rsk}$ is aktiválódik, mégpedig az ERK-hez hasonlóan Ras-függő módon. Miután az Rsk foszforilált formája elleni antitest nem áll rendelkezésre, aktiválódásának nyomon követésére olyan Western blot eljárást alkalmaztunk, melynek során a fehérjének a foszforiláció hatására a gélben bekövetkező lelassult vándorlását próbáltuk meg detektálni. Kísérleteink alapján Rsk foszforiláció mind növekedési faktorok, mind ionomycin hatására bekövetkezik, és a jelenség Ras-függő módon valósul meg - ami pedig az NGF-kiváltotta aktiváció tartósságát illeti, a foszforiláció 2 órás kezelés során is kimutatható. Ez erősen emlékeztet az ERK aktiváció időkinetikájára, ami sugallhatja a $p90^{Rsk}$-nak a differenciációban az ERK enzimekéhez hasonló szerepét. Ami a p70S6 kinázt illeti, az enzim riboszómális fehérjék foszforilálását végzi, és mitogén hatások során aktiválódik. Aktivációját növekedési faktorok, inzulin vagy interleukinok hatására a foszfatidil-inozitol 3 kináz (PI3K) mediálja, függetlenül a Ras-tól és a MAPK szignalizációs kaszkádtól. Az enzim NGF-kiváltotta differenciációban betöltött esetleges szerepének tisztázására fordított erőfeszítéseink sajnos nem jártak eredménnyel - vándorlási "shiftet" a p70S6 kináz esetében egyik általunk alkalmazott kezelés során sem sikerült kimutatnunk. Összefoglalva a JNK, p38MAPK, $p90^{Rsk}$, p70S6K enzimek vizsgálata során kapott eredményeket, pozitív, az ERK-eken kívül a differenciációban jelentőséggel bíró fehérje szerepének betöltésére a fentiek közül egyedül a $p90^{Rsk}$ bizonyult alkalmas jelöltnek.

2/ ERK transzlokáció jelentősége

ERK transzlokáció Ras-függése

Az ERK enzimek citoplazmából a magba történő transzlokációja számos különböző hatásra (hormonok, növekedési faktorok), számos különböző sejttípusban bekövetkező jól ismert jelenség. A fentiekben már részletesen ismertetett elmélet szerint mindez olyan körülmények között valósul meg, amikor az ERK enzimek aktivitása tartósan fennáll - ez a „mennyiségi" ERK-különbség vezet valamilyen módon „minőségi" (azaz lokalizációs) eltéréshez. Bár maga a jelenség jól ismert, a transzlokáció mechanizmusára vonatkozóan rendkívül szerények az irodalmi adatok. Bizonyos, hogy az ERK-ek nem rendelkeznek nukleáris lokalizációs szignállal, így a klasszikus, importint és Ran fehérjéket felhasználó sejtmagba történő transzport esetükben nem működik. Simaizomsejtekben kimutatták, hogy bombezin hatására bekövetkező kontrakció során az ERK a Hsp27 chaperonfehérjével együtt transzlokálódik a sejtmagba. Más adatok szerint egy rövid élettartamú, az ERK aktivációt kiváltani képes ágensek hatására szintetizálódó nukleáris horgonyfehérje játszana szerepet a transzlokációban. Bármi is azonban a transzlokáció tényleges mechanizmusa, PC12 sejtekben kimutatott, hogy az átmeneti ERK aktivációt előidéző EGF hatására nem, a tartós ERK aktivációt okozó NGF hatására azonban egy órán belül bekövetkezik az enzimek magba történő vándorlása. Kísérleteink során sejtvonalainkon anti ERK ill. anti P-ERK antitestekkel végzett immuncitokémiai festés segítségével határoztuk meg az enzimek lokalizációját, ill. követtük nyomon az egyes kezelések során bekövetkező változásaikat. Normál körülmények között (szérum tartalmú tápoldatban) tenyésztett vad típusú PC12 sejtekben immunlokalizáció alapján az enzimek mind a citoplazmában, mind a sejtmagban fellelhetők; általában a citoplazma mutatott erősebb festődést, de számos sejtben a magban található ERK populáció is jelentős. Ugyanezt a némileg meglepő eredményt kaptuk akkor is, amikor az alacsony gátló Ras expressziót mutató Z-M17-5, ill. a magas gátló Ras expressziójú M-M17-26 típusú sejteken végeztük el az immuncitokémiai festést. Miután ilyen körülmények között a sejtek természetesen nem differenciálódnak, kézenfekvő a következtetés, hogy egy bazális ERK-jelenlét a sejtmagban semmiképpen nem elégséges feltétele a neuritnövekedéshez szükséges génexpressziós változások előidézésének. Amikor a festést két napos széruméheztetést követően végeztük el, az immunreakció mindhárom sejtvonalban szinte kizárólag a citoplazmában jelentkezett: a sejtek mintegy 80%-ában az ERK enzimek a sejtmagon kívül lokalizálódtak. Egy

órás EGF kezelés ezen gyakorlatilag nem változtatott - hatására transzlokáció nem következett be. Ezzel szemben ugyanilyen idejű NGF kezelés markáns változást indukált: a normál PC12 sejtek mintegy 70%-ában az enzimek a sejtmagba vándoroltak, az immunfestődés erőteljes nukleáris és gyenge citoplazmatikus lokalizációt mutatott. Z-M17-5 és M-M17-26 sejtekben azonban ez nem következett be; a sejtek túlnyomó többségében az enzimek a citoplazmában maradtak. Ezek az eredmények világosan igazolják, hogy még a részleges Ras-gátlás - amely az ERK aktivációt nem gátolja, csak átmenetivé teszi - is képes az ERK transzlokáció gyakorlatilag teljes megakadályozására.

Másodlagos messenger analógok hatása az ERK transzlokációra

Az ERK aktiváció vizsgálatánál alkalmazott másodlagos messenger analógokkal történő kezeléseket megismételtük az ERK transzlokáció tanulmányozása során is. Immuncitokémiai festéseink eredményeit összegezve megállapítható, hogy sem dbcAMP, sem ionomycin, sem TPA - mindegyiknek átmeneti ERK aktivációt indukál - nem képes ERK transzlokáció előidézésére vad típusú PC12 sejtekben. Amennyiben a fenti kezeléseket EGF-el egészítettük ki, az eredmény ugyanaz maradt - kombinált kezelések sem vezettek ERK-lokalizációs változáshoz. Összegezve elmondható tehát, hogy átmeneti ERK aktivációt kiváltó ágensek egyik esetben sem voltak képesek előidézni az enzimek magba történő transzportját, tartós ERK aktivációt előidézők azonban igen - hozzátéve mindehhez, hogy a transzlokáció bekövetkezéséhez kb. egy órás kezelés is elégséges, azaz nem szükséges hozzá az általunk detektált három órán át is elhúzódó ERK foszforiláció.

Foszforilált ERK populáció transzlokációja

Kísérleteink másik részében azt szerettük volna kideríteni, hol aktiválódnak pontosan az ERK-ek, ill. hol aktiválják célfehérjéiket. A transzlokáció funkcionális jelentőségét ugyanis az támasztaná alá, ha sikerülne bizonyítani, hogy ténylegesen a foszforilált (azaz aktiválódott) ERK szubpopuláció vándorol a sejtmagba a differenciációt előidézni képes kezelések hatására. Ezen ERK frakció nyomon követése érdekében anti P-ERK antitesttel végeztünk immuncitokémiai vizsgálatokat. Eredményeink szerint két napig szérummentes tápoldatban tenyésztett PC12 sejtek immunreakciót egyáltalán nem mutatnak, bennük még bazális ERK foszforiláció sem detektálható. Ehhez képest normál szérumtartalmú oldatban tenyésztett sejtek mintegy 50%-ában a citoplazmában enyhe festődés észlelhető - azaz ebben az esetben

bekövetkezik egy igen alacsony mértékű ERK aktiváció. 5 perces NGF kezelést követően mind a jelölődött sejtek száma, mind a jel erőssége egyértelműen megnő, ám a festődés lokalizációja továbbra is kizárólag citoplazmatikus; 60 perces NGF kezelés után azonban - hasonlóan a „normál" anti ERK antitest alkalmazása során észleltekhez - a citoplazmában már alig, míg az addig festetlen magokban erőteljes immunfestődés észlelhető. Ezek az eredmények mindenképpen arra utalnak, hogy az NGF-hatásra bekövetkező ERK foszforiláció színtere a citoplazma, ahonnan az így aktiválódott ERK szubpopuláció az, ami a sejtmagba vándorol. Abban az esetben, ha EGF-el kezeltük a sejteket, 5 perc után itt is markáns citoplazma festődés volt detektálható, ami azonban 60 perces kezelés után jelentősen gyengült, lokalizációs változás nélkül - vagyis EGF-hatásra az ERK aktiváció egy órán belül lecsengett és transzlokáció nem következett be.

Ami a bekezdés elején feltett kérdés második felét illeti (azaz hol történik a transzkripciós faktorok ERK-ek általi foszforilációja), a probléma megközelítéséhez mind anti Fos, anti Jun (mindkét fehérje az ERK *in vitro* szubsztrátjaként kimutatott), mind a normál CREB-et ill. annak csak foszforilált formáját felismerni képes antitestek (anti CREB és anti P-CREB) felhasználásával végeztünk immuncitokémiai festéseket. Kontroll és NGF-kezelt PC12 sejteket festve elmondható, hogy az összes általunk vizsgált transzkripciós faktor mindkét esetben kizárólagosan nukleáris lokalizációjú. Anti P-CREB festés esetén kezeletlen sejtekben jel nem volt detektálható, de 1 órás NGF kezelés után a sejtmagok itt is erőteljes festődést mutattak. Miután a foszforilálatlan transzkripciós faktor eleve a sejtmagban lokalizálódik, a CREB-foszforiláció színtere egyértelműen a sejtmag.

Egyéb fehérjekinázok transzlokációja

Az ERK-eken kívül más fehérjekinázoknak is szerepük lehet az NGF génexpressziós hatásainak közvetítésében, kézenfekvő tehát a kérdés, vajon transzlokálódnak-e a citoplazmatikus kaszkád egyéb elemei is NGF ill. kombinált kezelések hatására a különböző sejtvonalakban? A génindukciós hatás közvetítésére számos jelölt akad, közülük a legesélyesebbek a CREB-kinázok, melyek közül a Ca^{++}-indukálta CREB foszforiláció fő közvetítője az Rsk2 izoenzim. Kimutatott, hogy a $p90^{Rsk}$ lokalizációja növekedési faktorok hatására az ERK-ekkel együtt változik, sőt PC12 sejtekben depolarizáció hatására is végbemegy a fehérje nukleáris transzlokációja. Vizsgálataink szerint NGF kezelés hatására a $p90^{Rsk}$ magba történő vándorlása vad típusú PC12 sejtekben az ERK-éhez hasonlóan lejátszódik, míg Z-M17-

5 sejtekben elmarad. Ugyanakkor az ERK transzlokációval ellentétes eredmény, hogy ionomycin is képes a $p90^{Rsk}$ sejtmagba történő transzportjának előidézésére, ráadásul - miután ez Z-M17-5 és M-M17-26 sejtekben is bekövetkezik - egy Ras-tól független jelpálya szerepe valószínűsíthető ebben a folyamatban. (Ebben a kérdésben ugyanakkor ellentmondás van azzal az ugyancsak általunk leírt megfigyeléssel, hogy az ionomycin-kiváltotta Rsk foszforiláció viszont Ras-függő módon valósul meg; jelenlegi ismereteink alapján ezt a jelenséget megmagyarázni nem tudjuk. Ezek az eredmények mindenesetre azt sugallják, hogy ebben az esetben a transzlokáció talán nem függ az enzim aktuális aktiváltsági állapotától.) A továbbiakban vizsgálatainkat kiterjesztettük a JNK, p70S6 kináz és a p38MAPK enzimekre is. Az aktivációs vizsgálatok eredményei alapján nem meglepő módon, egyik fehérje esetében sem sikerült nukleáris transzlokációt kimutatnunk EGF ill. NGF kezelés hatására vad típusú PC12 sejtekben. Az egyetlen pozitív eredményt JNK esetében a sejtek anisomycinnel történő kezelése szolgáltatta - ez a megfigyelés azonban inkább az enzim stressz-aktiválta jelátviteli utakban, semmint a differenciációban betöltött szerepére utal.

3/ ERK-független, alternatív differenciációs útvonalak

Amint arról az előzőekben esett már szó, NGF hatására sem Z-M17-5, sem M-M17-26 sejtekben - ahol a Ras gyengén ill. erőteljesen gátolt állapotú - nem következik be neuronális differenciáció. Ez a gátlás azonban részlegesen megkerülhető NGF plusz ionomycin ill. NGF plusz dbcAMP együttes stimulációjával -, ezekben az esetekben az NGF által normál PC12 sejtekben kiváltott neuronális differenciációhoz mind morfológiájában, mind arányában hasonló biológiai válasz észlelhető a gátló Ras-t expresszáló sejtvonalakon, sőt, a kombinált kezelések korai válasz gének indukciójához is vezetnek. Amennyiben a tartós ERK aktiváció és az ezzel együtt járó transzlokáció valóban esszenciális a neuronális differenciációhoz - ahogy azt eddigi eredményeink sugallják -, a fenti kombinációs kezeléseknek ebből a szempontból is képesnek kellene lenniük a Ras-gátlás megkerülésére. Az alább ismertetésre kerülő kísérletek azonban ennek ellenkezőjét bizonyítják, feltételezve ezzel, hogy egyes esetekben ERK-független jelátviteli utakon közvetített szignálok is eredményezhetnek neuritnövekedést.

Kombinációs kezelések által indukált differenciáció Ras-, MEK- és Trk-függése

Kísérleteink első részében vad típusú PC12 és a domináns gátló Ras-t magas fokban expresszáló M-M17-26 sejtvonalak morfológiai változásait vizsgáltuk meg. Az NGF/ionomycin

ill. NGF/dbcAMP kombinációs kezeléseken túl kíváncsiak voltunk arra is, hogy bekövetkezik-e neuritnövekedés azokban az esetekben, ha a Ras-gátlás mellett a jelátviteli pálya más állomásait is kiiktatjuk speciális gátlószerek segítségével. Eredményeink szerint normál PC12 sejtekben az NGF-indukálta neuritnövekedés az ERK-aktivátor MEK PD98059 általi gátlásával blokkolható, ám az NGF plusz ionomycin ill. NGF plusz dbcAMP kezelés kiváltotta differenciáció ebben az esetben is bekövetkezik. Amennyiben azonban a kezelések során a nagy affinitású NGF receptor aktivitását gátoltuk (specifikusnak tekintett gátlószere a K252a jelű ágens) a neuritnövekedés mindegyik - a kombinált kezelések esetében is - elmaradt. Ugyanez volt megfigyelhető M-M17-26 sejtek vizsgálata során is; az NGF/ionomycin ill. NGF/dbcAMP kombinált kezelések által indukált neuritnövekedés (mely mértékében ugyan elmarad a PC12 sejtekben NGF hatására bekövetkezőtől, de a neuritok hossza és száma tekintetében megközelíti azt) TrkA gátlásával kivédhető, MEK gátlásával azonban nem.

Kombinált kezelések hatása az ERK aktivációra és transzlokációra

Miután az ERK-ek egyetlen ismert aktivátora a MEK (pontosabban a MEK1 és 2 izoenzim), az a megfigyelés, hogy a MEK gátló PD98059 csak egy igen enyhe inhibitorikus hatást volt képes kifejteni a kombinált kezelések által kiváltott differenciációra, erősen kérdésessé teszi az ERK-ek szerepét is ebben a folyamatban. Ami az ERK-eknek a kombinációs kezelések során használt másodlagos messenger analógok hatására bekövetkező foszforilációját illeti, mint arról az ERK aktiváció részletes tárgyalása során már volt szó, mind ionomycin, mind dbcAMP átmeneti ERK foszforilációt indukál vad típusú PC12 sejtekben, NGF-el együtt adva pedig annak hatását az ERK aktivációra kimutatható mértékben egyik ágens sem potencírozza. M-M17-26 sejtekben azonban a másodlagos messengerek sem önmagukban, sem NGF-el kombinálva nem képesek még átmenetileg detektálható ERK foszforiláció előidézésére sem (holott mint láttuk, ez utóbbi esetekben a sejtek neuritokat növesztenek). Nyilvánvaló, hogy ebben az esetben a neuritnövekedéshez vezető szignáltranszdukcióban az ERK aktiváció nem játszhat szerepet.

Megvizsgálva az ERK-ek nukleáris transzlokációját hasonló körülmények között, az aktivációs kísérletekkel összhangban M-M17-26 sejtekben sem NGF, sem a differenciációt okozó NGF/ionomycin ill. NGF/dbcAMP kombináció nem képes az ERK-ek magba történő transzportjának előidézésére. (Ez a megfigyelés, azon túl, hogy további bizonyítékkal szolgál egy ERK-ek nélküli differenciációs jelátviteli útvonal jelenlétére, újfent megerősíti eddigi

eredményeinket, melyek szerint tartós ERK aktiváció hiányában nincs transzlokáció. A fenti eredmények tehát egy olyan, NGF által indukált és mind cAMP, mind Ca^{++} szignálokkal potencírozható differenciációs jelátviteli pálya meglétét valószínűsítik, amely független a klasszikus Ras/MEK/ERK úttól, de szükséges hozzá az NGF receptor épsége. (Ez utóbbit azok a megfigyeléseink is megerősítik, melyek szerint PC12nnr5 sejtek, amelyekből hiányzik a nagy affinitású TrkA receptor, rezisztensnek bizonyultak az NGF/ionomycin ill. NGF/dbcAMP kombinációs kezelésekre.) Ez természetesen nem kérdőjelezi meg az ERK-ek differenciációban betöltött jelentőségét, de egyértelműen jelzi, hogy egymással interkommunikáló szignalizációs mechanizmusok kivételes esetekben egy mégoly esszenciálisnak hitt komponens helyettesítésére is képesek lehetnek.

Rsk szerepe a kombinációs kezelések által kiváltott differenciációban

Felmerül természetesen a kérdés, hogy ha nem az ERK-ek, akkor a jelátviteli utak mely egyéb elemei lehetnek felelősek a differenciációs válasz közvetítéséért ezekben az esetekben. Irodalmi adatok alapján szóba jöhetnének az új PKC család egyes tagjai, pl. a PKCδ, amelyről kimutatták, hogy szerepet játszik a neuritnövekedésben, a Ca^{++} hatásokra PC12 sejtekben génexpressziót indukáló kalmodulin dependens kinázok (CaMK), a cAMP-stimulációra foszforilálódó p38MAPK, vagy az előbbiekben más összefüggésben már tárgyalt ERK szubsztrát $p90^{Rsk}$ - mi e két utóbbi enzim lehetséges szerepét vizsgáltuk meg a rendelkezésünkre álló sejtvonalakon. A cAMP-szupportálta jelátviteli útban való részvételre elsődleges jelöltünk a p38MAPK enzim volt, de - annak ellenére, hogy egyes megfigyelések szerint gátlása megakadályozza a forskolin-indukálta neuritnövekedést -, specifikus gátlószerének (SB203580) alkalmazásakor sem a sejtek túlélésében, sem differenciációjában nem láttunk változást a kontrollhoz képest a kombinációs kezelések során. Ezek az eredmények erősen kérdésessé teszik - ha nem is zárják ki teljes bizonyossággal - a p38MAPK részvételét az NGF/cAMP-indukálta neuritnövekedésben. Ezek után figyelmünk az NGF/ionomycin kombinációs kezelés által beindított szignalizációs mechanizmus felé fordult, a $p90^{Rsk}$-ról ugyanis már az előzőekben leírtuk, hogy ionomycin hatására Ras-függő módon aktiválódik, de Ras-független módon képes nukleáris transzlokációra. Foszforiláció által okozott vándorlási shift anti $p90^{Rsk}$ Western blot detektálásával ráadásul sikerült kimutatnunk, hogy M-M17-26 sejtekben az Rsk NGF kezelésre nem, de NGF/ionomycin kombinációra enyhe aktiválódást mutat, sőt, az enzim magba történő vándorlását CREB foszforiláció megjelenése kíséri. Miután a CREB az a transzkripciós faktor,

amelyet növekedési faktorok, cAMP és Ca^{++}-vezérelte szignálok konvergenciapontjának tekintenek, feltételezhető, hogy az általunk alkalmazott kísérleti rendszerben az NGF/ionomycin és NGF/dbcAMP kombinált kezelések során is betöltheti ezt a szerepet. (Nem szabad ugyanakkor figyelmen kívül hagyni, hogy CREB foszforiláció önmagában nem elégséges a differenciációhoz.) Mindazonáltal abban a jelátviteli útban, amely az NGF receptorról indulva, Ca^{++}-indukálta szignálok segítségével kerüli meg a Ras/MEK/ERK utat, eredményeink szerint talán a $p90^{Rsk}$ töltheti be az ERK-eknek a citoplazma és a mag közötti jeltovábbításban játszott szerepét.

4/ Az EGF és NGF eltérő hatásának hátterében álló lehetséges mechanizmusok

Kísérleteink egyik fő célkitűzését - az egyes fehérjekinázok specifikus szerepének felismerése mellett - az EGF és NGF által beindított intracelluláris folyamatok közötti, az eltérő biológiai hatás kiváltásában szignifikáns különbségek feltérképezése jelentette. A kérdés megközelítését sajnálatos módon meglehetősen nehezíti az a tény, hogy eddigi ismereteink alapján mindkét növekedési faktor ugyanazt a - Ras-Raf-MEK-ERK - jelátviteli útvonalat használja a sejten belül, azzal, a fentiekben már bőségesen tárgyalt különbséggel, hogy az ERK-ek aktivációjának időkinetikája az egyes esetekben eltérő. Arról azonban még nem esett szó, hogy mi lehet az EGF ill. NGF által kiváltott átmeneti vs. tartós ERK aktiváció mechanizmusa?

Foszfatázok szerepe az ERK aktivációban

Az ERK-ek növekedési faktorok által történő aktivációját specifikus tirozin és treonin oldalláncaik foszforilációja eredményezi a kettős specificitású MEK enzimek által. Kézenfekvő feltevés, hogy az aktiváció tartósságát befolyásolhatja ezen foszfátcsoportok turnovere, amely folyamatban protein foszfatáz enzimek játszhatnak kulcsszerepet. Ilyen szabályozási mechanizmus jelenlétére az első bizonyítékot azok a kísérletek szolgáltatták, amelyek szerint kezeletlen PC12 sejtekből származó citoplazma-extrakt képes az ERK aktivitás redukálására, és mindez foszfatáz inhibitorokkal gátolható. A lehetséges foszfatáz jelöltek közül kiemelkedik a nemrégiben felfedezett, és évről évre új taggal bővülő MAPK-foszfatázok (MKP-k) csoportja - ezek különböző sejttípusokban expresszálódó kettős specificitású foszfatázok, amelyek mindegyike képes az ERK-ek in vitro defoszforilációjára, és tagjaik között mintegy 40-80%-os szekvenciarokonság mutatkozik. PC12 sejtekben az eddigi kutatások alapján főként az MKP2 és MKP3 szerepe lehet jelentős: kimutatott, hogy NGF kezelés hatására indukciójuk fokozódik

és képesek az Elk-1 transzkripciós faktor (az ERK-ek egyik legfontosabbnak tartott célpontja) aktiválódásának megakadályozására. Egyes adatok szerint aktivációjukat maga az ERK kaszkád indukálná, bekapcsolva így egy negatív feed-back mechanizmust önmaga leállítására. Az ERK aktiváció szabályozásának egy másik lehetséges kulcsenzime a PP2A foszfatáz, amelyről kimutatott, hogy képes PC12 sejtekben az ERK-ek specifikus treoninon bekövetkező defoszforilálására és inaktiválására. Kísérleteink első részében az ortovanadát (protein tirozin foszfatáz inhibitor) és az okadailsav (protein Ser/Thr foszfatáz inhibitor, amely már igen kis koncentrációban - 1nM - blokkolja a PP2A-t) ERK aktivációra, transzlokációra és a neuronális differenciációra gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Feltételezésünk az volt, hogy amennyiben foszfatázok EGF-hatásra indukálódnának - így téve átmenetivé az ERK aktivációt -, foszfatázgátló plusz EGF kezelés tartós ERK aktivációt és ezzel együtt járó neuritnövekedést kellene, hogy eredményezzen. EGF/ortovanadát ill. EGF/okadailsav egyidejű adásával azonban PC12 sejtekben - P-ERK Western blotok alapján - nem váltható ki tartós ERK aktiváció (foszforiláció 30 perc elteltével már egyik esetben sem észlelhető). Ezzel összhangban, ilyen kombinációs kezelések ERK transzlokáció kiváltására sem bizonyultak alkalmasnak - ezen adatok tehát kizárják egy EGF-hatásra aktiválódó, majd az ERK-eket defoszforiláló foszfatáz működését, amely az átmenetivé váló ERK aktivációért ily módon lenne felelős. Ami a differenciációs kísérleteket illeti, az ezzel kapcsolatos irodalmi adatok meglehetősen ellentmondásosak; egyes szerzők szerint a foszfatáz inhibitorok serkentik, mások szerint gátolják az NGF-indukálta neuritnövekedést. Az általunk használt vad típusú PC12 sejteken az ezekben a cikkekben leírt koncentrációban mind az ortovanadát, mind az okadailsav toxikus hatásúnak bizonyult, alacsonyabb koncentrációkat alkalmazva pedig önmagában egyik foszfatázgátló sem váltott ki neuronális differenciációt. Kombinációs kezelések során sem EGF plusz ortovanadát, sem EGF plusz okadaiksav nem bizonyult képesnek neuritnövekedés kiváltására. Amennyiben a foszfatázgátlókat NGF-el együtt adva kezeltük a sejteket, az ágensek a neuritnövekedés kezdeti stádiumát nem gátolták (sőt, számos esetben még gyorsították is a folyamatot), ám hosszan tartó kezelés során a differenciációs folyamatok leálltak, és egy hét után egyre jelentősebb sejtpusztulás volt megfigyelhető. (Két hét elteltével már alig érte el a 20%-ot a túlélő sejtek aránya, azaz hosszú távon még a legalacsonyabb, a foszfatáz-gátlás szempontjából hatásos koncentráció is toxikus a sejtek számára. Nyilvánvaló, hogy a foszfatázok generális gátlása számos, a sejtek életben maradásához is szükséges mechanizmust blokkol - ilyen körülmények között azonban a differenciációra kifejtett esetleges hatásuk

érdemben nem vizsgálható.) Végeztünk előkísérleteket a foszfatázgátlók korai és késői gének expressziójára kifejtett hatását illetően is. Ezek szerint önmagukban sem *fos*, sem *tranzin* indukciót nem okoznak, de nem is gátolják az NGF ilyen irányú hatásait. Mindebből messzemenő következtetést levonni nem lehet, az azonban nyilvánvaló, hogy ezek az ágensek nem gátolják az NGF által kiváltott jel sejtmagba jutását. Összefoglalva, a foszfatázok szerepét célzó kísérleteinkből csupán negatív következtetéseket vonhattunk le: valószínűsíthető, hogy nem ilyen típusú enzimek felelősek az EGF ill. NGF-hatásra bekövetkező eltérő idejű ERK aktivációért.

Nck adapterfehérje jelentősége

Az EGF-NGF hatás különbségeit vizsgálva azt is megpróbáltuk kideríteni, lehetnek-e eltérések a két jelátviteli pálya receptorokhoz legközelebbi szintjén, nevezetesen, hogy kötődnek-e az egyes esetekben különböző adapterfehérjék a receptorokhoz. Figyelmünk elsősorban az Nck adapterfehérje felé irányult, mert egyes adatok szerint ennek overexpressziója képes az NGF által előidézett neuronális differenciáció megakadályozására. A fehérje egy SH2 és három SH3 alegységből áll és ismereteink szerint az eddig vizsgált összes sejttípusban ubikviter módon expresszálódik. (Western blot-al kimutathatóan a mi PC12 sejtvonalainkban is.) Vizsgálatához a SOTE Biokémiai Intézetétől kaptunk értékes [illegible] rendelkezésünkre bocsájtva az Nck GST fúziós fehérje formájában általuk előállított [illegible] Ezen fehérjével ún. kötődési tesztet végeztünk, amely során a növekedési faktorokkal stimulált sejtek extraktumában vizsgáltuk az Nck-hoz való kötődést: a kapcsolódott fehérjéket anti P-Tyr Western blot segítségével mutattuk ki. Kísérleteink alapján 5 perces EGF kezelést követően mind normál PC12, mind Z-M17-5 sejtekben bekövetkezik az Nck és az aktiválódott EGF receptor összekapcsolódása, ám hasonló időtartamú NGF kezelés ezt egyik sejttípusban sem képes kiváltani - az NGF receptor és az Nck között nem jön létre asszociáció. A foszforilálódott EGF receptorhoz való kötődés viszont abban az esetben is bekövetkezett, ha az Nck-nak egy csonkított, csupán az SH2 domént tartalmazó darabjával végeztük el a kísérletet. A csak SH3 doméneket tartalmazó rész használata esetén azonban a csonka Nck nem asszociálódott az EGF receptorhoz - azaz a kötődés (elméleti ismereteink alapján is várható módon) az SH2 doménen keresztül valósul meg. Ezen kísérletek alapján valószínűsíthető, hogy már a receptorokhoz toborzódó adapterek szintjében is van különbség az EGF ill. NGF jelátvitele között. Ennek tényleges jelentőségét az Nck esetében akkor ismerhetnénk fel, ha fel tudnánk térképezni a

fehérje SH3 doménjein keresztül a receptorhoz "downstream" kapcsolt további jelátviteli komponenseket. Erre a szerepre az egyik jelölt az immunsejtekben kimutatottan az Nck-hoz kötődni képes p21-aktivált kináz (PAK) lehetne, amelynek főként a JNK jelátvitelben tulajdonítanak szerepet. A másik, esetünkben még érdekesebb pedig a guanin nukleotid kicserélő faktorként a Ras-t aktiválni képes Sos fehérje. A Sos esetleges jelentőségére különösen azok az adatok hívják fel a figyelmet, melyek szerint T-limfocitákban EGF kezelésre gyors ERK aktiváció következik be, aminek következményeképpen a Sos is foszforilálódik. A Sos foszforilációja az adapterfehérjéknek a receptortól való disszociálódásához vezet, ami leállítja - vagyis átmenetivé teszi! - az ERK-aktivációt. Nem tudjuk, hogy ez a mechanizmus működik-e PC12 sejtekben, de EGF receptor-Nck-Sos koimmunprecipitációs kísérletekkel tisztázni lehetne ezen fehérjék egymáshoz való kötődését. Amennyiben ez az asszociáció bekövetkezik - hozzátéve, hogy az Nck differenciációt gátló hatású -, úgy a fenti mechanizmus is magyarázatul szolgálhat az ERK aktiváció tranzienssé válására, ennek következményeképpen pedig a neuritnövekedés elmaradására.

EGF és NGF együttes hatásai

Végezetül végeztünk előkísérleteket az EGF és NGF együttes hatásának vizsgálata céljából - ilyen irányú kísérletek nem szerepelnek az irodalomban, pedig érdekes lehetne a sejt biológiai válaszának, és az esetlegesen e mögött meghúzódó eltérő jellegű ERK aktivációnak a detektálása olyan körülmények között, amikor a sejt egyidejűleg van kitéve mindkét stimulációnak. Különösen, ha az EGF valóban egy általa aktivált mechanizmussal „terelné" az ERK aktivációt átmeneti, a sejt biológiai válaszát pedig a proliferáció irányába. Eredményeink szerint azonban a kettős kezelések során mind az ERK aktiváció és transzlokáció, mind a sejt biológiai válasza vonatkozásában egyértelműen az NGF hatása érvényesül; amennyiben a sejteket NGF/EGF kombinációval kezeljük elnyújtott ERK foszforiláció következik be, ezt követő nukleáris transzlokációval, a sejtek pedig neuritokat növesztenek. Nem tudjuk, miért dominál az NGF által indukált szignál az EGF jelátvitel felett, különösen azon megfigyelés tükrében, hogy a génindukcióra kifejtett hatásuk egymást potencírozza: *zif* indukció nyomon követése egyértelműen a gén fokozódó átírását mutatja a kombinált kezelés során. Mindazonáltal az a hipotézis, miszerint az EGF nem átmeneti ERK aktivációt indukálna, hanem elnyújtott ERK aktivációt rövidítene le, a fenti eredmények ismeretében nem tűnik támogathatónak.

Összefoglalás

1. Kimutattuk, hogy részleges Ras-gátlás jelentősen lecsökkenti és átmenetivé teszi, teljes Ras-gátlás pedig megszünteti az NGF-hatásra bekövetkező ERK aktivációt.

2. EGF és másodlagos messenger analógok mind önmagukban, mind egymással kombinációban csak átmeneti ERK aktiváció indukálására képesek.

3. Tranziens ERK aktivációt egyetlen általunk vizsgált esetben sem követ ERK transzlokáció.

4. Tranziens ERK aktiváció egyetlen esetben sem jár együtt neuritnövekedéssel.

⇒ *A fentiekből következik egyrészt, hogy intakt Ras funkció szükséges az elnyújtott ERK aktivációhoz és az enzimek magba történő transzportjához, másrészt, hogy amennyiben a differenciációs szignál a klasszikus ERK útvonalon transzdukálódik, annak átviteléhez az ERK-ek tartós aktivitása és nukleáris transzlokációja szükséges.*

5. Speciális esetekben (NGF/dbcAMP ill. NGF/ionomycin kezelések során) a bekövetkező neuronális differenciációhoz nem szükséges MEK és ERK aktiváció és ERK transzlokáció.

6. Szükséges azonban hozzá az NGF receptor épsége.

⇒ *Léteznek Ras/MEK/ERK-független, alternatív jelátviteli utak, amelyek az NGF receptorról indulnak ki, és mind Ca^{++}-, mind cAMP-függő hatások segítségével képesek neuronális differenciáció előidézésére.*

7. Az ERK-eken kívül, az általunk vizsgált egyéb enzimek közül sem a JNK, sem a p38MAPK, sem p70S6K nem mutat NGF-hatásra bekövetkező szignifikáns foszforilációt és nukleáris transzlokációt PC12 sejtekben, míg a $p90^{Rsk}$ igen.

8. NGF-el szemben ionomycin kezelés Ras-független módon is képes Rsk – de nem ERK - aktiváció és transzlokáció kiváltására.

9. Az ily módon bekövetkező Rsk transzlokáció CREB foszforilációval jár együtt.

⇒ *Az NGF/ionomycin kezelésre Ras-tól függetlenül bekövetkező, neuritnövekedéshez vezető jelátviteli utakban a $p90^{Rsk}$ helyettesítheti az ERK-eket.*

10. Foszfatázgátlók (sem okadailsav, sem ortovanadát) nem képesek az EGF által kiváltott tranziens ERK aktiváció tartóssá tételére és az ERK-ek nukleáris transzlokációjának kiváltására.

11. EGF plusz foszfatázgátló kezelés nem okoz neuritnövekedést.

12. A sejtek EGF és NGF-el történő együttes kezelése során az NGF hatásai érvényesülnek.

⇒ *Az EGF valószínűleg nem egy - ezidáig ismeretlen - általa aktivált mechanizmussal teszi átmenetivé az ERK aktivációt; ha mégis, azt nem foszfatáz enzimek indukciója révén éri el.*

13. A megfelelő növekedési faktor stimulációját követően az NGF receptor nem, az EGF receptor azonban asszociálódni képes az Nck adapterfehérjéhez.

⇒ *Az EGF vs. NGF jelátvitel már a sejtmembránhoz legközelebbi szinten, a receptorokhoz kapcsolódó adapterek vonatkozásában is különbségeket mutat.*

Publikációk

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Boglári, G., Erhardt, P. Cooper, G. M., 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, 54-8 (IF: 2,801)

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, 1445-54 (IF: 3,862)

Boglári, G. and Szeberényi, J. (2001) Nuclear translocation of $p90^{Rsk}$ and phosphorylation of CREB is induced by ionomycin in a Ras-independent manner in PC12 cells. *Acta Biol. Hun.*, közlésre elfogadva (IF: 0,291)

Impakt faktorral bíró absztrakt

Boglári, G. and Szeberényi, J. (1999) Analysis of the time-course of ERK phosphorylation in the neuronal differentiation of PC12 cells. *Biochimie*, Vol. 81. suppl. No.6., s249 (IF: 1,635)

Előadás és poszter

Boglári, G., Nusser, N., Szeberényi, J. (1994) NGF jelátvitel, Ras fehérjék és génexpresszió. *"Jelátviteli utak sejtes rendszerekben", tudományos ülés*, Salgótarján

Boglári, G., Sétáló, Gy. jr., Pap, M., Nusser, N., Szeberényi, J. (1994) Ras fehérje szerepének vizsgálata az NGF-indukálta korai génexpresszióban PC12 sejtekben. *A Magyar Genetikusok Egyesületének III. konferenciája*, Debrecen

Boglári, G., Sétáló, Gy. jr., Pap, M., Nusser, N., Szeberényi, J. (1995) Differential role of H-Ras in the expression of early response genes induced by NGF in PC12 cells. *FEBS Advanced Course on "Single Cell Techniques in Signal Transduction Research"*, Leiden, The Netherlands

Boglári, G., Sétáló, Gy. jr., Pap, M., Nusser, N., Szeberényi, J. (1995) Differential role of H-Ras in the expression of early response genes induced by NGF in PC12 cells. *6th IMP Spring Conference*, Wien, Austria

Boglári, G. and Szeberényi, J. (1996) ERK-ek nukleáris transzlokációja PC12 sejtvonalakban. *IV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok*, Visegrád

Boglári, G., Sétáló, Gy. jr., Szeberényi, J. (1996) Nuclear translocation of Ser/Thr kinases in PC12 subclones treated with NGF, dbcAMP, TPA and ionomycin. *12th Annual Meeting on Oncogenes*, Frederick, USA

Boglári, G., Sétáló, Gy. jr., Szeberényi, J. (1996) Nuclear translocation of Ser/Thr kinases in PC12 subclones treated with NGF, dbcAMP, TPA and ionomycin. *FEBS Advanced Course on "Molecular Mechanisms of Signaling and Targeting"*, Spetses, Greece

Boglári, G., Sétáló, Gy. jr., Szeberényi, J. (1998) ERK-ek NGF és másodlagos messengerek hatására bekövetkező nukleáris transzlokációja PC12 szubklónokban. *VI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok*, Szeged

Boglári, G., Erhardt, P., Szeberényi, J. (1998) Intact Ras function is required for nuclear translocation of ERKs in NGF-treated PC12 cells. *Silver Jubilee FEBS Meeting*, Copenhagen, Denmark

Boglári, G. and Szeberényi, J. (2000) Fehérjekináz aktiváció és nukleáris transzlokáció szerepe PC12 sejtek neuronális differenciációjában. *VIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok*, Pécs

Egyéb, a témához nem kapcsolódó közlemények

Szeberényi, J., Boglári, G., Komáromy, L., Nusser, N., Pap, M., Sétáló, Gy. jr., Tigyi, A. (1996) Problem-oriented teaching of Molecular Cell Biology. *Med. Edu.*, **30**, 323-4 (IF: 1,078)

Szeberényi, J., Boglári, G., Komáromy, L., Nusser, N., Pap, M., Sétáló, Gy. jr., Tigyi, A. (1996) How Molecular Cell Biology is taught at the University Medical School of Pécs, Hungary. *Med. Teacher*, **3**, 213-8 (IF: 0,785)

Szeberényi, J., Boglári, G., Komáromy, L., Nusser, N., Pap, M., Sétáló, Gy. jr., Tigyi, A. (1997) Problem-based teaching of Molecular Cell Biology. *in Med. Edu-21: An account for initiative for change in Europe for the 21st century*, 25-9

Előadás és poszter

Boglári, G., Horváth, G., Lakatos, A., Szeberényi, J. (1998) The use of interactive computer programs in self-instructed learning of Molecular Cell Biology. *AMEE Conference*, Prague, Czech Republic

Boglári, G. and Szeberényi, J. (1999) The method of examination in Molecular Cell Biology in the Medical School of Pécs, Hungary. *AMEE Conference*, Linköping, Sweden