DIFFERENCIÁCIÓS ÉS TÚLÉLÉSI JELÁTVITEL PATKÁNY PHEOCHROMOCYTOMA SEJTEKBEN

PhD ÉRTEKEZÉS

DR. PAP MARIANNA

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. SZEBERÉNYI JÓZSEF

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ORVOSI BIOLÓGIA INTÉZET

2001

TARTALOM

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 4

2. BEVEZETÉS 6

3. AZ NGF ÁLTAL KIVÁLTOTT NEURONÁLIS DIFFERENCIÁCIÓ JELÁTVITELE 9

3.1. PC12 sejtek jellemzése 9

3.2. A Ras/Raf/ERK jelátviteli út PC12 sejtekben 9

3.2.1. A Ras fehérjék szerepe 10

3.2.2. A fehérjekináz kaszkád aktivációja 11

3.2.3. Génexpressziós változások 11

4. A SEJTTÚLÉLÉS JELÁTVITELE 13

4.1. A PI 3-K aktivációja 13

4.2. A PI 3-K szerepe a sejttúlélésben 13

4.3. Az Akt szerepe a sejttúlélésben 13

4.3.1. Az Akt szerkezete 14

4.3.2. Az Akt aktiválódása 14

4.4. Akt szubsztrátok 15

4.4.1. Bad 16

4.4.2. Kaszpáz 9 17

4.4.3. Forkhead transzkripciós faktor 18

4.4.4. CREB 20

4.4.5. IKKα 20

4.4.6. Glikogén szintáz kináz-3 (GSK-3) 21

4.5. Az eukariota transzlációs iniciációs faktor 2B jellemzői 22

5. CÉLKITŰZÉSEK 24

6. ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 26
6.1. Sejtkultúrák 26
6.2. Northern blot 26
6.3. Mobility shift analízis 26
6.4. GSK-3 kináz aktivitásának meghatározása 27
6.5. Tranziens transzfekció 27
6.6. Pontmutáció létrehozása irányított mutagenezissel 27
6.7. Sejtek szortírozása áramlási citométerrel 27
6.8. Fehérjeszintézis vizsgálata 28
6.9. Citokróm *c* immunhisztokémia 28

7. EREDMÉNYEK 29

8. KÖVETKEZTETÉSEK 36

9. ÖSSZEFOGLALÁS 40

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 41

11. A MUNKA ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK 42

12. IRODALOM 45

13. MELLÉKLETEK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AC, adenilát-cikláz

Apaf-1, apoptózist aktiváló faktor

CaM-kináz, Ca^{++}/kalmodulin-függő proteinkináz

CHX, cikloheximid

c-IAP, apoptózist gátló fehérje

CBP, CREB kötő fehérje

CRE, cAMP-reszponzív elem

CREB, CRE binding protein

DAG, diacilglicerin

dbcAMP, dibutiril ciklikus AMP

DMEM, Dulbecco's modified Eagle Medium

EGF, epitélsejt növekedési faktor

eIF2B, eukariota transzlációs iniciációs faktor 2B

ERK, extracelluláris szignál regulált kináz

FGF, fibroblaszt növekedési faktor

GAP, GTPáz aktiváló fehérje

GEF, guanin nukleotid kicserélő faktor

GFP, zöld fluoreszcens fehérje

Grb2, növekedési faktor receptor kötő fehérje

GSK3, glikogén szintáz kináz-3

IKK, IκB kináz

IκB, inhibitor protein κB

IP_3, inozitol-triszfoszfát

JNK, c-Jun N terminális kináz

MAPK, mitogén aktivált proteinkináz

MAPKK, mitogén aktivált proteinkináz kináz

MAPKKK, mitogén aktivált proteinkináz kináz kináz

MEK, mitogén aktivált/extracelluláris szignál regulált kináz kináz

MEKK, MEK kináz

NFκB, nuklear faktor κB

NGF, idegsejt növekedési faktor

NGFR, idegsejt növekedési faktor receptor

$p140^{Trk}$, nagy affinitású NGF receptor

p70S6K, riboszómális S6 kináz

$p75^{NTR}$, kis affinitású neurotrofin receptor

PDGF, trombocita eredetű növekedési faktor

PDK, 3-foszfoinozitol-dependens fehérjekináz

PH, pleckstrin-homologia domén

PI 3-K, foszfatidilinozitol-3-kináz

PI (3,4) P_2, foszfatidilinozitol 3,4 biszfoszfát

PI (3,4,5) P_3, foszfatidilinozitol 3,4,5 triszfoszfát

PIP_2, foszfatidilinozitol-biszfoszfát

PKA, cAMP-függő proteinkináz A

PKB, proteinkináz B

PKC, proteinkináz C

PKR, kettős láncú RNS által aktiválódó fehérjekináz R

PLC, foszfolipáz C

PTB, foszfotirozin kötő domén

RAC-PK, Proteinkináz A-hoz és Proteinkináz C-hez hasonló proteinkináz

SH2, Src homologia 2 domén

SOS, son of sevenless

TNF, tumor nekrózis faktor

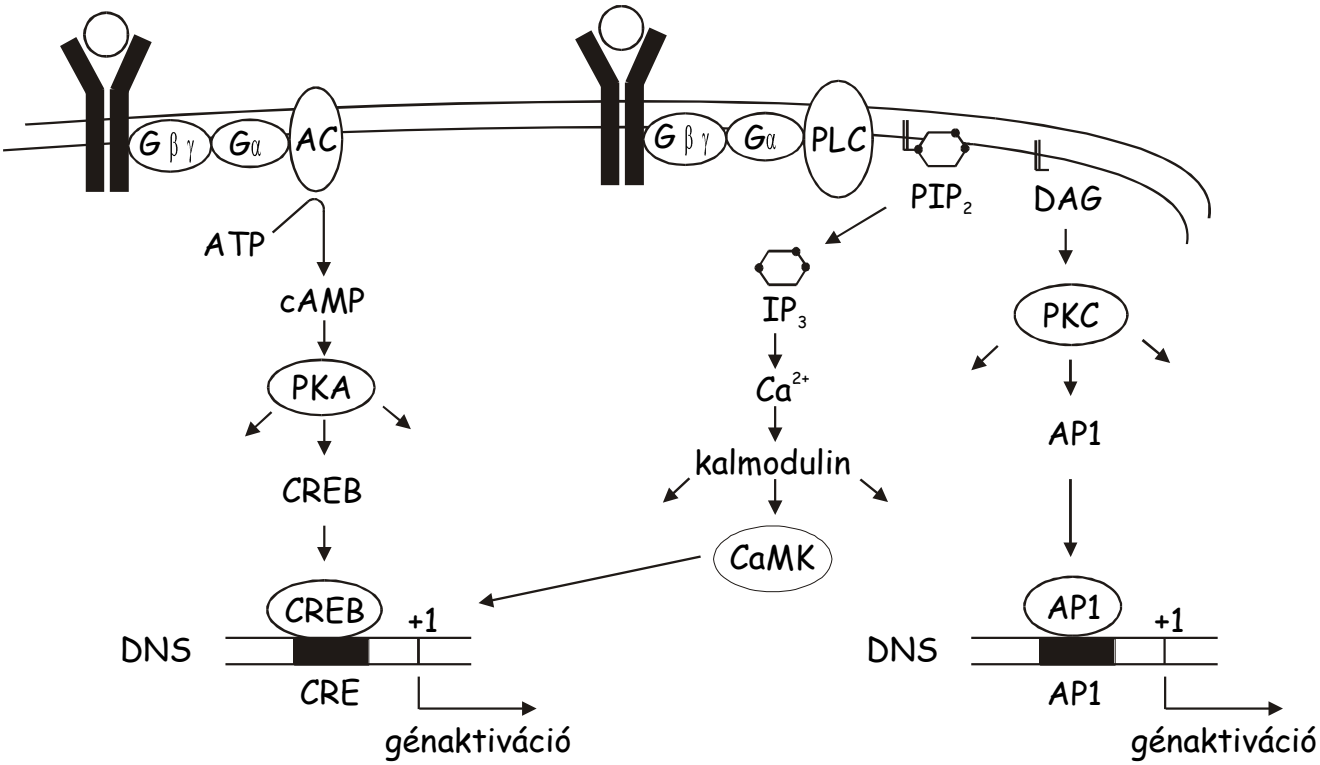
TOR, rapamicin célfehérjekináz

TPA, tetradekanoil forbol acetát

2. BEVEZETÉS

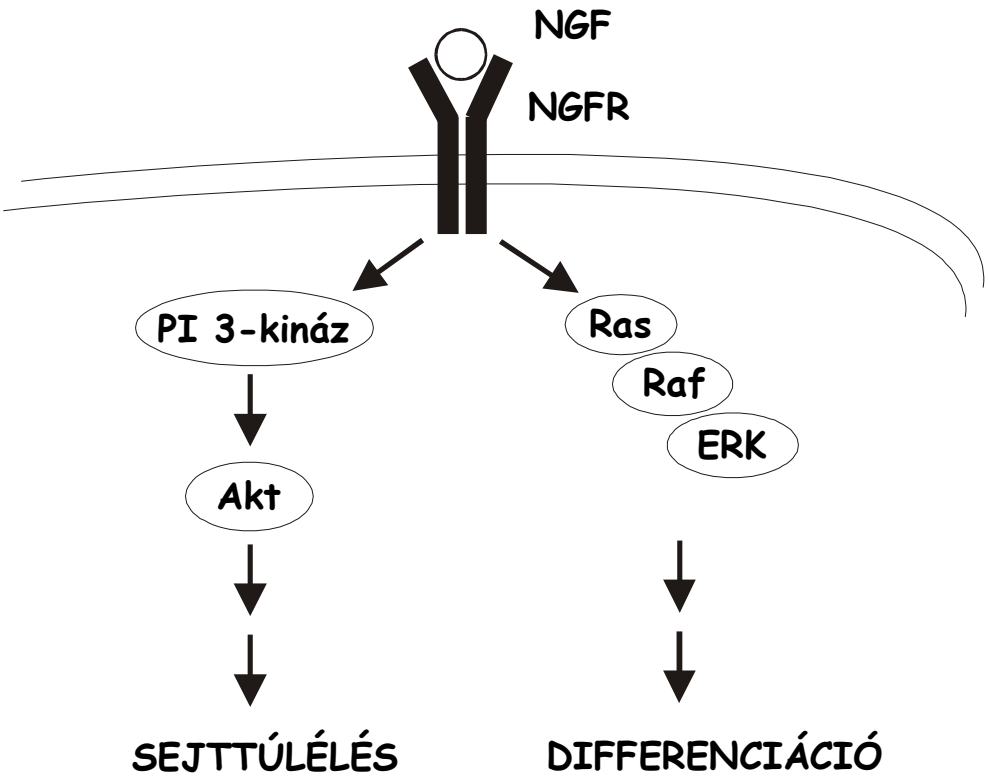
A sejtek közötti kommunikáció és a környezeti változásokra bekövetkező válaszadás képessége nélkülözhetetlen a sejt metabolizmus, proliferáció, differenciáció és a sejttúlélés szabályozásában. A jelnek a sejtmembrántól a sejtmagig történő továbbításának és a sejtmagban lejátszódó génexpressziós változásoknak a hátterében speciális jelátviteli folyamatok játszanak szerepet. A jelátviteli utak biokémiai folyamatok láncreakciói, amelyek egymással párhuzamosan futnak, konvergálhatnak illetve divergálhatnak. Az elmúlt évtizedekben e jelátviteli utak kutatásában jelentős előrelépések történtek, számos intracelluláris jelátviteli fehérjét és utat azonosítottak.

A jelátviteli mechanizmusok közül kiemelkedő jelentőségű a G-protein-kötött receptorokon és a katalítikus receptorokon keresztül történő szignalizáció. A heterotrimer G-proteinek a ligand kapcsolódásakor aktív, GTP-kötött állapotban különböző célfehérjéket stimulálnak, köztük az adenilát-cikláz (AC) illetve a foszfolipáz C (PLC) transzmembrán fehérjéket (1. ábra). Az AC aktivációjának hatására cAMP másodlagos messenger molekula képződik a sejtben ATP-ből, amely a cAMP-függő fehérjekináz (proteinkináz A, PKA) legfontosabb aktiválója. Az aktivált PKA katalítikus alegysége a sejtmagba transzlokálódva transzkripciós faktorokat foszforilál. Ezek közül a legfontosabb a CREB (CRE binding) fehérje, amely speciális DNS szekvenciához (CRE, cAMP-reszponzív elem) kötődve fokozza a célgén expresszióját (1. ábra). Az aktív PLC a membránban levő foszfatidilinozitol-biszfoszfátot (PIP_2) diacilglicerinre (DAG) és inozitol-triszfoszfátra (IP_3) hidrolizálja. A DAG a proteinkináz C (PKC) enzimet aktiválja, amely számos fehérjeszubsztrátot, köztük transzkripciós faktorokat is foszforilál. A PKC-jelátvitel génexpressziós hatásának egyik fontos sejtmagon belüli mediátora az AP-1 transzkripciós faktor, amely számos célgén indukcióját idézi elő. Az IP_3 másodlagos messenger molekula az endoplazmatikus retikulum membránjának Ca^{++}-csatornáihoz kötődve a csatornák megnyílását eredményezi. A citoszólba kiáramló Ca^{++} másodlagos messengerként számos célfehérje aktivitását befolyásolja. Ezek egyike a kalmodulin, mely Ca^{++}-t megkötve egy szerin/treonin-specifikus fehérjekinázt, a Ca^{++}/kalmodulin-függő proteinkinázt (CaM-kináz) aktivál. A CaM-kináz egyik szubsztrátja a CREB transzkripciós faktor, melynek foszforilációja specifikus gének expresszióját segíti elő (1. ábra).



1. ábra. Heterotrimer G-proteinek által közvetített jelátviteli utak.

A szignálok nagy része extracelluláris növekedési faktorok által közvetített jelátviteli utakon keresztül fejti ki hatását. A növekedési faktorok, pl. NGF (idegsejt növekedési faktor), EGF (epitélsejt növekedési faktor), PDGF (trombocita eredetű növekedési faktor), inzulin által közvetített jelátviteli utak közös jellemzője, hogy a növekedési faktor receptorok tirozinkináz aktivitással rendelkeznek. A tirozinkináz receptorok egy extracelluláris ligand-kötő doménnel, egy transzmembrán doménnel és a citoplazmatikus részükön katalítikus és regulatorikus doménnel rendelkeznek. A növekedési faktorok a Trk tirozinkináz és a p75 neurotrofin receptoron ($p75^{NTR}$) keresztül fejtik ki hatásukat, amelyek egymás hatását elnyomva vagy erősítve szabályozzák a különböző jelátviteli utakat. A Trk tirozinkináz receptor szabályozza a Ras/Raf/ERK differenciációt közvetítő és a PI 3-K/Akt sejttúlélést közvetítő jelátviteli utat. Az utóbbi évek kutatásának eredményeként derült fény a $p75^{NTR}$ pontosabb szerepére. A $p75^{NTR}$ a JNK-p53-Bax apoptózist közvetítő jelátviteli út aktivitását szabályozza és képes a Trk aktivitását növelni az NFκB aktivációján keresztül (Kaplan és Miller, 2000).



2. ábra. Az NGF által kiváltott sejttúlélés és differenciáció jelátviteli útja.

Az egyik legjobban felderített intracelluláris jelátviteli út a Ras/Raf/ERK út, amelyben a Ras proto-onkogén fehérjék központi szerepet játszanak. A Ras fehérjék kutatásának orvosi jelentőségét az adja, hogy a fehérjéket kódoló gének mutáns formáit, a Ras onkogéneket a humán tumorok 30%-ában mutatták ki. Az NGF által aktivált receptor tirozinkinázok a Ras/Raf/ERK úton keresztül differenciációt és proliferációt közvetítenek különböző sejttípusokban (2. ábra). A disszertáció első felében a Ras proto-onkogén fehérje szerepét foglaljuk össze PC12 patkány pheochromocytoma sejtek NGF indukálta neuronális differenciációjában. Munkánkban az NGF és különböző másodlagos messenger analógok hatását vizsgáltuk a korai és késői gének expressziójára.

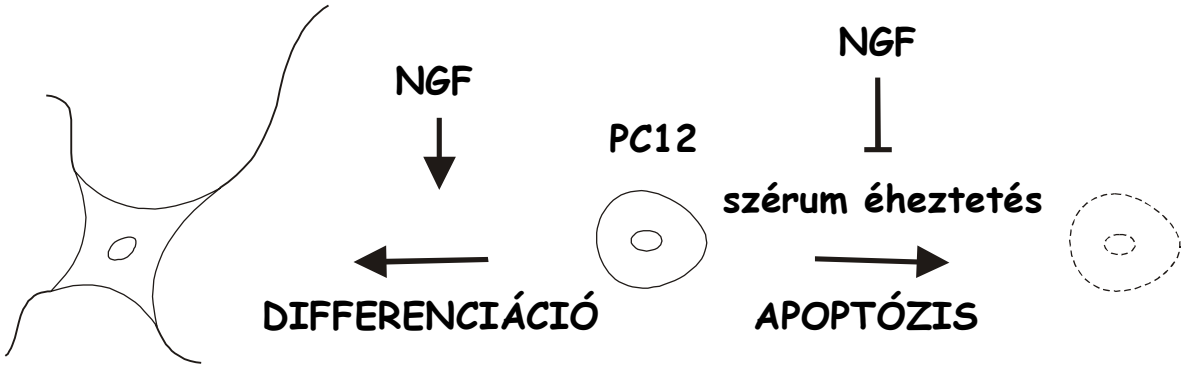
A növekedési faktorok hatására aktiválódó receptor tirozinkinázok által közvetített másik jelentős jelátviteli út a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI 3-K)/Akt sejttúlélést közvetítő szignál transzdukciós út (2. ábra). A disszertáció második részében egy szerin/treonin fehérjekináz, a glikogén szintáz kináz-3 (GSK-3) és szubsztrátjának, az eukariota transzlációs iniciációs faktor 2B-nek a szerepét vizsgáltuk az apoptózis szabályozásában.

3. AZ NGF ÁLTAL KIVÁLTOTT NEURONÁLIS DIFFERENCIÁCIÓ JELÁTVITELE

3.1. PC12 sejtek jellemzése

A neuronális differenciáció tanulmányozására széles körben használt modell rendszer a PC12 patkány pheochromocytoma sejtvonal. Szövettenyészetben a PC12 sejtek kicsi, kerek, kromaffin sejtekre jellemző fenotípust mutatnak. NGF kezelésre gyors, szimpatikus neuronokra jellemző morfológiai és biokémiai változásokon mennek keresztül, neuritokat növesztenek (Greene és Tischler, 1976; Greene, 1984). Ezen változások hátterében lezajló biokémiai események intenzív kutatás tárgyát képezik.

A PC12 sejtek növekedési faktor függő sejtek, melyek túlélése az optimális mennyiségben jelenlevő neurotrofinok függvénye. Ezeket a sejteket szérumot tartalmazó médiumban tenyésztik, amelyben az összes szükséges növekedési faktor jelen van. Szérum hiányában a sejtek apoptotizálnak. Az NGF differenciációt okozó hatásán kívül a PC12 sejtek túlélésében is szerepet játszik, mivel kivédi a szérum megvonás indukálta apoptózist (3. ábra).



3. ábra. Az NGF hatása PC12 sejtek differenciációjára és apoptózisára.

3.2. A Ras/Raf/ERK jelátviteli út PC12 sejtekben

A PC12 sejtek neuronális differenciációját közvetítő jelátviteli útban az NGF két sejtfelszíni receptoron keresztül fejti ki hatását (Szeberényi és Erhardt, 1994; Frade és Barde,

1998; Friedman és Greene, 1999). A kis affinitású NGF receptor ($p75^{NTR}$) egy katalítikus aktivitással nem rendelkező sejtfelszíni glikoprotein. Szerepe az NGF jelátvitelében nem teljesen tisztázott, valószínűleg a nagy affinitású NGF receptor részét képezi (Barbacid, 1993). A proto-onkogén TrkA ($p140^{Trk}$) a nagy affinitású receptor, a receptor fehérje tirozinkinázok családjába tartozik. Az NGF kötés a TrkA fehérje dimerizációját és tirozin aminosavakon történő autofoszforilációját váltja ki, ami kötőhelyeket hoz létre az SH2 (Src homologia 2) és PTB (foszfotirozin kötő) domént tartalmazó adapter fehérjék, az Shc és/vagy a Grb2 (növekedési faktor receptor kötő protein 2) számára. Mivel a Grb2 az SOS guanin nukleotid kicserélő faktorral stabilan kapcsolódik, az Shc/Grb2/SOS komplex a plazma membránhoz transzlokálódik, aminek eredményeképpen a Ras GTP-kötött állapotba kerül (McCormick, 1993; Downward, 1994) (4. ábra).

3.2.1. A Ras fehérjék szerepe

A Ras fehérjék több jelátviteli út kapcsolódási pontjában állnak, mivel sok különböző extracelluláris hatásra aktiválódnak, mint pl. növekedési faktorok, citokinek, hormonok és neurotranszmitterek. A *ras* géncsalád tagjai minden eukariota sejtben expresszálódó proto-onkogének. Ezek kicsi, 21 kDa molekulasúlyú, plazmamembránhoz kötött fehérjéket kódolnak. A 3 emlős *ras* gén fehérje terméke a nagy mértékben konzervált Ha-Ras, Ki-Ras és az N-Ras fehérjék (Hall, 1990). Ezek a fehérjék fiziológiásan guanin nukleotidokat kötnek és GTP-áz aktivitással rendelkeznek. Egy aktív, GTP-kötött és egy inaktív, GDP-kötött állapotban lehetnek jelen. Guanin nukleotid kicserélő faktorok (GEF; SOS1/2) az aktív GTP-kötött forma kialakulását segítik elő, a Ras GTPáz aktiváló fehérjék (GAP; NF1-GAP) pedig az inaktív GDP-kötött állapot kialakításáért felelősek (Barbacid, 1993).

A Ras proliferációban játszott szerepét NIH3T3 sejtekben írták le először (Feig és Cooper, 1988; Cai és mtsai, 1990; Stacey és mtsai, 1991). PC12 sejteket vizsgálva megállapították, hogy a Ras működése nem szükséges PC12 sejtek proliferációjához, azonban az NGF indukálta neurit növekedés abszolút Ras-függő (Szeberényi és mtsai, 1990; Cowley és mtsai, 1994). Konstitutívan aktív Ras fehérjék expressziója PC12 sejtek morfológiai differenciációjához vezet. Az NGF-indukálta neuritogenezis gátolható anti-Ras monoklonális antitest mikroinjekciójával vagy domináns negatív Ras mutáns fehérjével. A mutáns p21 fehérje

(Ha-Ras Asn-17) GDP kötő aktivitása jelentősebb a GTP kötésnél és interferál az endogén Ras fehérjék funkciójával a guanin nukleotid kicserélő faktorért való versengésben. Számos laboratórium megállapította, hogy a Ras/Raf/ERK út aktivációja szükséges és elégséges a neuronális differenciáció indukciójához ebben a modell rendszerben (Cowley és mtsai, 1994; Szeberényi és Erhardt, 1994).

Az aktív, GTP kötött Ras-nak számos célfehérjéje ismert, köztük a PI 3-K, Raf, MEKK és az AF6, amely arra utal, hogy a Ras fehérje több jelátviteli folyamatban is szerepet játszik. A legjobban karakterizált effektor a Raf, amelynek aktivációja a ERK kaszkád utat indítja el.

3.2.2. A fehérjekináz kaszkád aktivációja

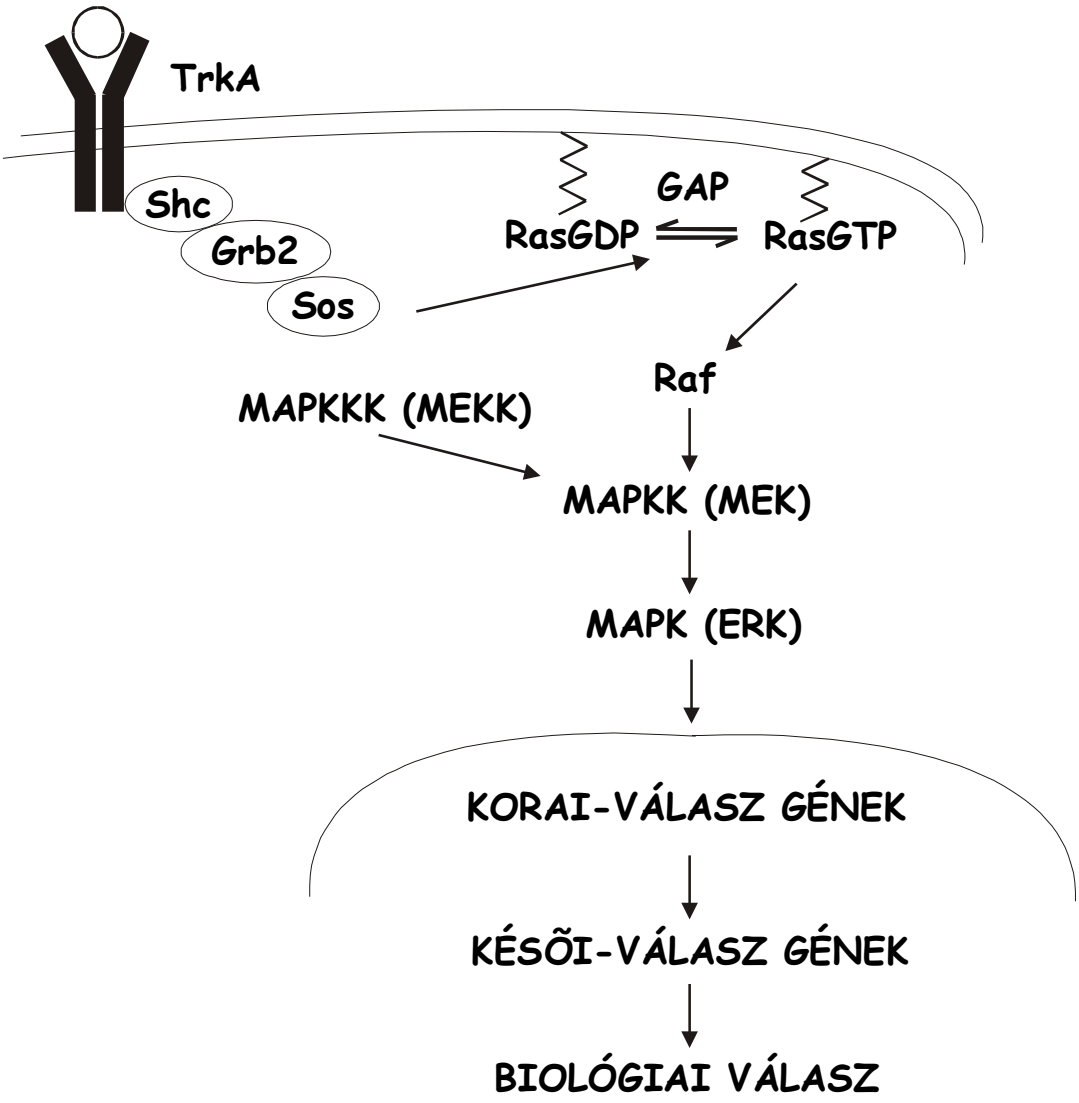
A Raf szerin/treonin kináz a citoplazmából a plazmamembránhoz transzlokálódva komplexet képez az aktivált Ras fehérjével (McCormick, 1994). A Raf aktivációját követően két MAPKK-t (MEK1 és MEK2) foszforilál és aktivál. Az aktivált MEK fehérjék kettős specificitású kinázok és így treonin és tirozin aminosavakat is foszforilálnak két MAPK fehérjén ($p42^{MAPK}$/ERK2 és $p44^{MAPK}$/ERK1), amelyek transzlokálódnak a sejtmagba és transzkripciós faktorok foszforilációjával génexpressziós változásokat indukálnak (Wilson, 1994; Waskiewicz és Cooper, 1995; Seger és Krebs, 1995; Marshall, 1995; Garrington és Johnson, 1999) (4. ábra).

3.2.3. Génexpressziós változások

Növekedési faktorok, másodlagos messengerek, neurotranszmitterek hatására fehérjeszintézistől függetlenül transzkripcionálisan aktiválódnak az u.n. korai válasz gének a legkülönbözőbb szövetekben és sejtvonalakban. Közel 20 ezek közül transzkripciós faktort kódol, amelyek "harmadlagos messengerként" hatva közvetítenek a másodlagos messengerek által szabályozott fehérjekinázok és a fenotípusért felelős célgének között.

PC12 sejtek NGF kezelése különböző gének aktivációját hozza létre, amelyek két csoportba sorolhatók: korai válasz gének és késői válasz gének (Greenberg és mtsai, 1985; Leonard és mtsai, 1987; Velculescu és mtsai, 1995; Szeberényi, 1996; Angelastro és mtsai, 2000). A korai válasz génekre (pl. c-*fos*, *zif*268, c-*jun*, *junB*) jellemző, hogy NGF kezelést követően az aktivációjuk gyors és átmeneti. Aktivációjuk valószínűleg a már meglevő

transzkripciós faktorok foszforilációjával történik. Ezen gének géntermékei is gyakran transzkripciós faktorok, amelyek a később aktiválódó késői válasz gének szintézisét közvetítik fehérjeszintézis függő módon (McMahon és Monroe, 1992; Karin és Hunter, 1995; Hill és Treisman, 1995). A késői válasz gének (pl. tranzin, SCG10) által kódolt fehérjék közvetlenül felelősek a növekedési faktorok által közvetített fenotípus változásokért (Matrisian, 1990).



4. ábra. A Ras/Raf/ERK jelátviteli út.

4. A SEJTTÚLÉLÉS JELÁTVITELE

4.1. A PI 3-K aktivációja

Növekedési faktorok hatására a tirozinkináz transzmembrán receptor tirozin aminosavakon autofoszforilálódik és ez a PI 3-K receptorhoz kötődését idézi elő. A regulatorikus (p85) és katalítikus (p110) alegységből álló PI 3-K ezután membránhoz kötött foszfatidilinozitolokat foszforilál az inozitol gyűrű D3-as pozíciójában. A keletkező foszfatidilinozitol 3,4 biszfoszfát [PI (3,4) P_2] és a foszfatidilinozitol 3,4,5 triszfoszfát [PI (3,4,5) P_3] másodlagos messengerként hatva különböző fehérjéket aktiválva indít el jelátviteli kaszkádokat (Chan és mtsai, 1999).

4.2. A PI 3-K szerepe a sejttúlélésben

A PI 3-K szerepéről az apoptózis jelátvitelében először Yao és Cooper közölt eredményeket (Yao és Cooper, 1995a). Ebben a munkában PC12 sejtek növekedési faktor függő túlélését tanulmányozták és megállapították, hogy a PI 3-K aktivitás gátlása felfüggesztette az NGF sejttúlélést közvetítő hatását. PC12 sejteket PDGF receptor olyan mutánsával transzfektáltak, amelyben a receptor aktiválásához szükséges speciális tirozin aminosavakat nem foszforilálható alanin aminosavra cseréltek és azt találták, hogy a PI 3-K aktiválása szükséges és elégséges a PDGF mediálta túléléshez ezekben a sejtekben. A PI 3-K aktivitásának szükségességét a növekedési faktor függő túlélésben sok más különböző növekedési faktor függő sejtvonalban is kimutatták, köztük: fibroblasztokban, hematopoetikus sejtekben, epiteliális sejtekben és elsődleges neuronokban (Yao és Cooper, 1995b; Erhardt és Cooper, 1996; Datta és mtsai, 1999).

4.3. Az Akt szerepe a sejttúlélésben

Az Akt különböző növekedési faktorok hatására aktiválódik, mint pl. NGF, PDGF, EGF, inzulin. Különböző kutató csoportok eredményei alapján valószínűsíthető, hogy a PI 3-K szerepet játszik az Akt aktivációjában. Az Akt növekedési faktorokkal történő aktivációja

gátolható PI 3-K gátlószerekkel (wortmannin, LY294002) és a PI 3-K domináns negatív formájának expressziójával. Az Akt szerepét a PI 3-K jelátvitelben elsődleges neuronok tranziens transzfekciójával bizonyították. A domináns negatív Akt apoptózist indukált inzulinnal kezelt sejtekben, míg az aktív Akt overexpressziója kivédte a növekedési faktorok megvonása vagy a PI 3-K gátlása következtében előidézett apoptózist (Dudek és mtsai, 1997). Sok más tanulmány is bizonyította, hogy számos sejtvonalban a konstitutívan aktív Akt overexpressziója gátolja a különböző hatásra (pl. UV sugárzás, DNS károsodás, sejtciklus zavarok, anti-Fas antitest kezelés, TGFβ kezelés) kialakuló apoptózist (Datta és mtsai, 1999).

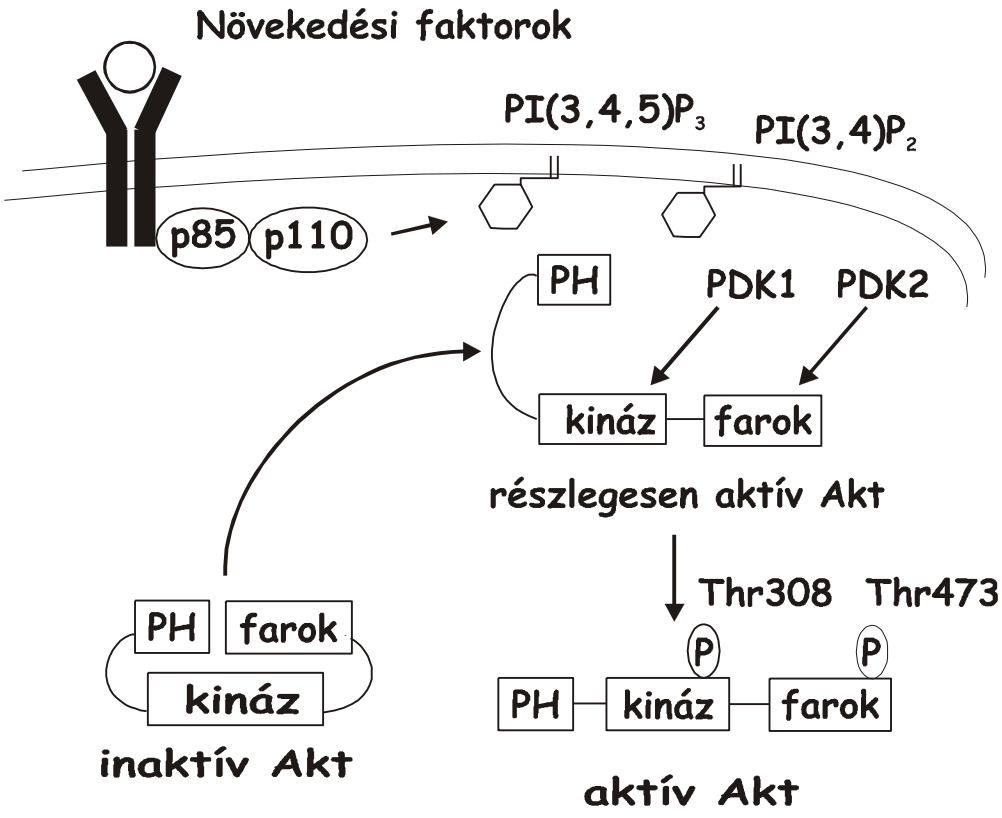
4.3.1. Az Akt szerkezete

Az *akt* gént az AKT8 retrovírus onkogénjeként azonosították először. A virális *akt* onkogén egy fúziós fehérjét kódol, amely vírusból származó Gag és celluláris Akt szekvenciákat tartalmaz. A celluláris *akt* gén egy citoplazmatikus, minden sejtben expresszálódó szerin/treonin fehérjekinázt kódol. Az Akt az irodalomban még Proteinkináz B (PKB) vagy Proteinkináz A-hoz és Proteinkináz C-hez hasonló proteinkináz (RAC-PK) néven is ismert, ez utóbbi elnevezés használata nem terjedt el. Az emlős Akt fehérjecsaládnak 3 ismert tagja van (Akt1, Akt2, Akt3), amelyek különbözőképpen expresszálódnak mind az mRNS, mind fehérje szinten. Az Akt fehérjecsalád tagjai rendelkeznek egy PH (pleckstrin-homologia) doménnel az amino terminális végen, amely lipid-fehérje és/vagy fehérje-fehérje kölcsönhatásokban játszik szerepet. A fehérje középső részén levő kináz domén szerin és treonin aminosavakat foszforilál célfehérjéken. A fehérje karboxi terminális részén egy hidrofób, prolinban gazdag farok domén található (Datta és mtsai, 1999).

4.3.2. Az Akt aktiválódása

Növekedési faktorok PI 3-K stimulációjának hatására az intracelluláris PI (3,4) P_2 és a PI (3,4,5) P_3 szint megnövekszik. Ezeknek a lipideknek az Akt PH doménjéhez való kapcsolódása az Akt transzlokációját eredményezi a citoplazmából a plazmamembránhoz. Az interakció az Akt konformáció változását idézi elő, amely lehetővé teszi, hogy konstitutívan aktív 3-foszfoinozitol-dependens fehérjekinázok (PDK-1 és PDK-2) foszforilálják a molekula középső,

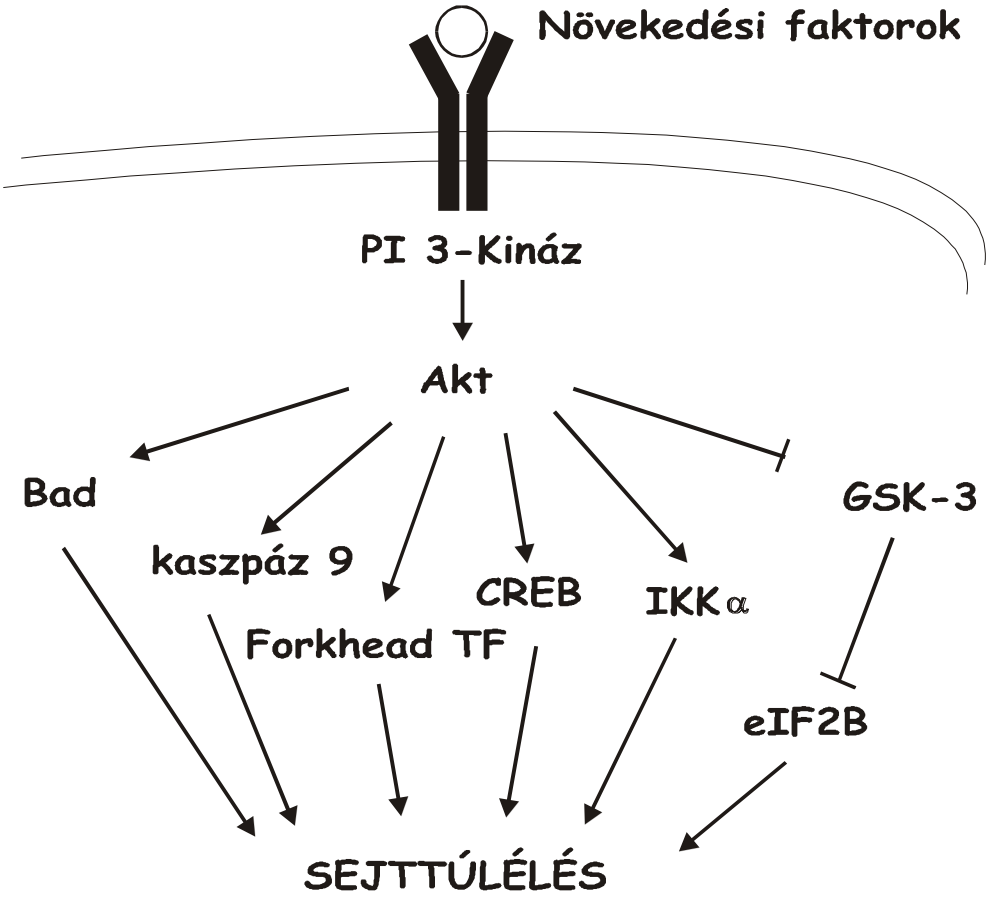
kináz domén részét illetve a karboxi terminális véget (5. ábra). Az aktív, foszforilált Akt különböző szubsztrátok foszforilációján keresztül közvetíti a sejttúlélés jelátvitelét (Datta és mtsai, 1999).



5. ábra. Az Akt PI 3-K dependens aktivációjának mechanizmusa.

4.4. Akt szubsztrátok

Az Akt konszenzus foszforilációs szekvencia nagyon sok emlős fehérjében megtalálható, amelyek közül néhányról bizonyított, hogy a PI 3-K/Akt jelátviteli útban a sejttúlélést szabályozza. Ezek: Bad, kaszpáz 9, Forkhead transzkripciós faktor, CREB, IKKα, és a glikogén szintáz kináz-3 (GSK-3) (6. ábra).

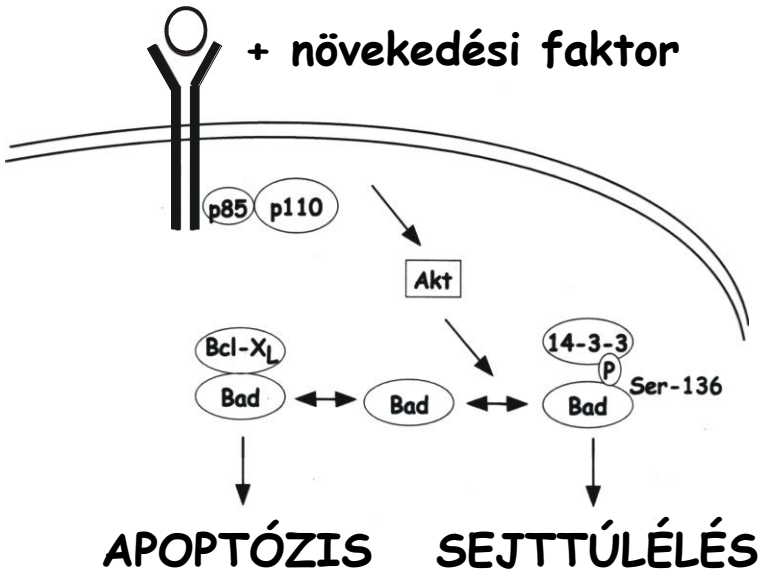


6. ábra. A PI 3-K/Akt sejttúlélést közvetítő jelátviteli út szubsztrátjai.

4.4.1. Bad

A Bcl-2 család proapoptotikus tagjáról, a Bad-ről írták le először, hogy az Akt általi foszforilációja szerepet játszik az apoptózis szabályozásában. Növekedési faktorok hiányában a Bad foszforilálatlan formája közvetlenül kapcsolódik az antiapoptotikus Bcl-2 család tagjaival, mint pl. a Bcl-x_L fehérjével. Növekedési faktorok hatására a Bad két helyen (Ser-112 és Ser-136) foszforilálódik, ami a Bcl-x_L fehérjétől való disszociációját és a citoplazmatikus 14-3-3 fehérjével való összekapcsolódását eredményezi. A foszforilált Bad így nem okoz apoptózist, hanem a sejt túlélését biztosítja (Datta és mtsai, 1997; delPeso és mtsai, 1997) (7. ábra). Az Akt a Ser-136 helyet foszforilálja, annak ellenére, hogy a Ser-112 is Akt foszforilációs hely. Konstitutívan aktív Akt kotranszfekciója Bad-el a Ser-136 foszforilációjának fokozódását eredményezi, míg a domináns negatív Akt gátolja a transzfektált Bad foszforilációját ugyanezen

a helyen. A Ser-112 növekedési faktorok által indukált foszforilációját a MEK-MAPK út szabályozza, a fehérjekináz valószínűleg a pp90 riboszomális S6 kináz. A cAMP-függő proteinkináz A (PKA) a citokin indukálta Ser-112 foszforilációért tehető felelőssé. EGF hatására is leírták a Bad PKA-függő foszforilációját (a Ser-155 aminosavon), ami a PI 3-K/Akt jelátviteli úttól függetlenül anti-apoptotikus hatást közvetít (Zhou és mtsai, 2000). A Bad nem expresszálódik minden sejtvonalban, ezért valószínűsíthető, hogy további Akt szubsztrátok is szerepet játszanak az apoptózis szabályozásában.



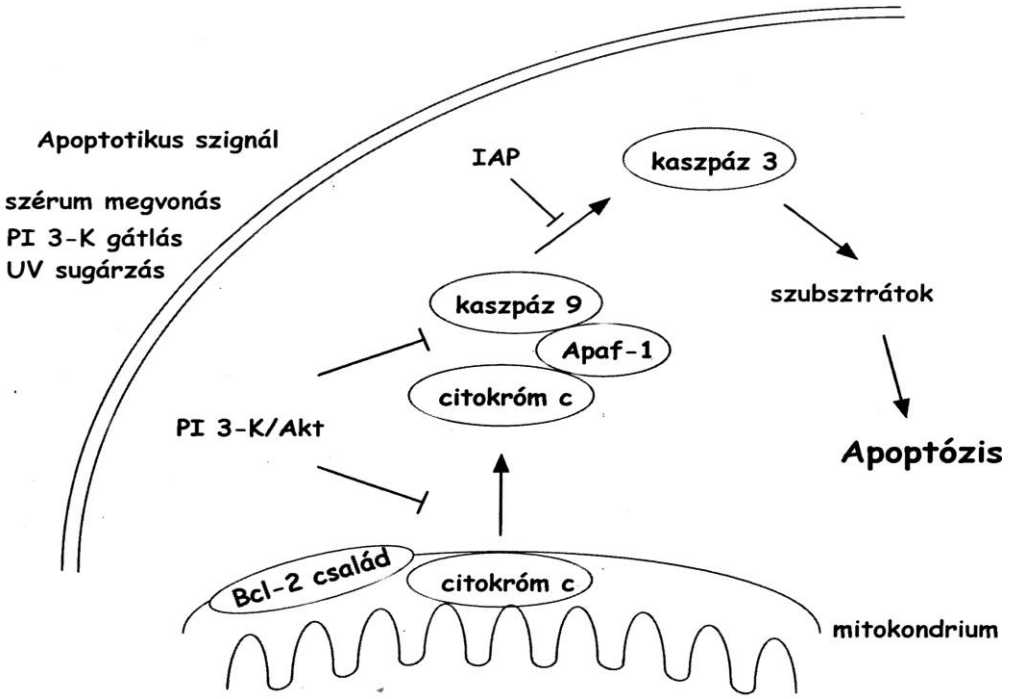
7. ábra. A Bad növekedési faktor indukálta foszforilációja és inaktivációja.

4.4.2. Kaszpáz 9

Sokféle apoptotikus stimulus hatására citokróm *c* kiáramlás történik a mitokondriumból a citoszólba. Itt a citokróm *c* az Apaf-1 (apoptózist aktiváló faktor) fehérjével kapcsolódik és a pro-kaszpáz 9 proteolízisét és aktivációját idézi elő. Az aktív kaszpáz 9 ezek után hasítja és aktiválja a pro-kaszpáz 3 fehérjét, aminek hatására beindul az apoptózishoz vezető kaszpáz kaszkád (Budihardjo és mtsai, 1999) (8. ábra).

Az Akt foszforilálja a kaszpáz 9-et, ami valószínűleg csökkenti a fehérje katalítikus aktivitását. A kaszpáz 9 foszforilációjának funkcionális következménye, hogy az Akt overexpressziója blokkolja a citokróm *c* mediálta kaszpáz 9 aktivációt in vitro. Ez az eredmény

azt sugallja, hogy az Akt képes blokkolni az apoptózist a citokróm *c* kiáramlás után (Cardone és mtsai, 1998). Az Akt foszforilációs szekvenciát azonban csak az emberi kaszpáz 9 tartalmazza, más fajokból származó kaszpáz 9 nem (Fujita és mtsai, 1999), ezért a sejttúlélés szabályozásában a kaszpáz 9 foszforilációja valószínűleg nem központi jelentőségű.

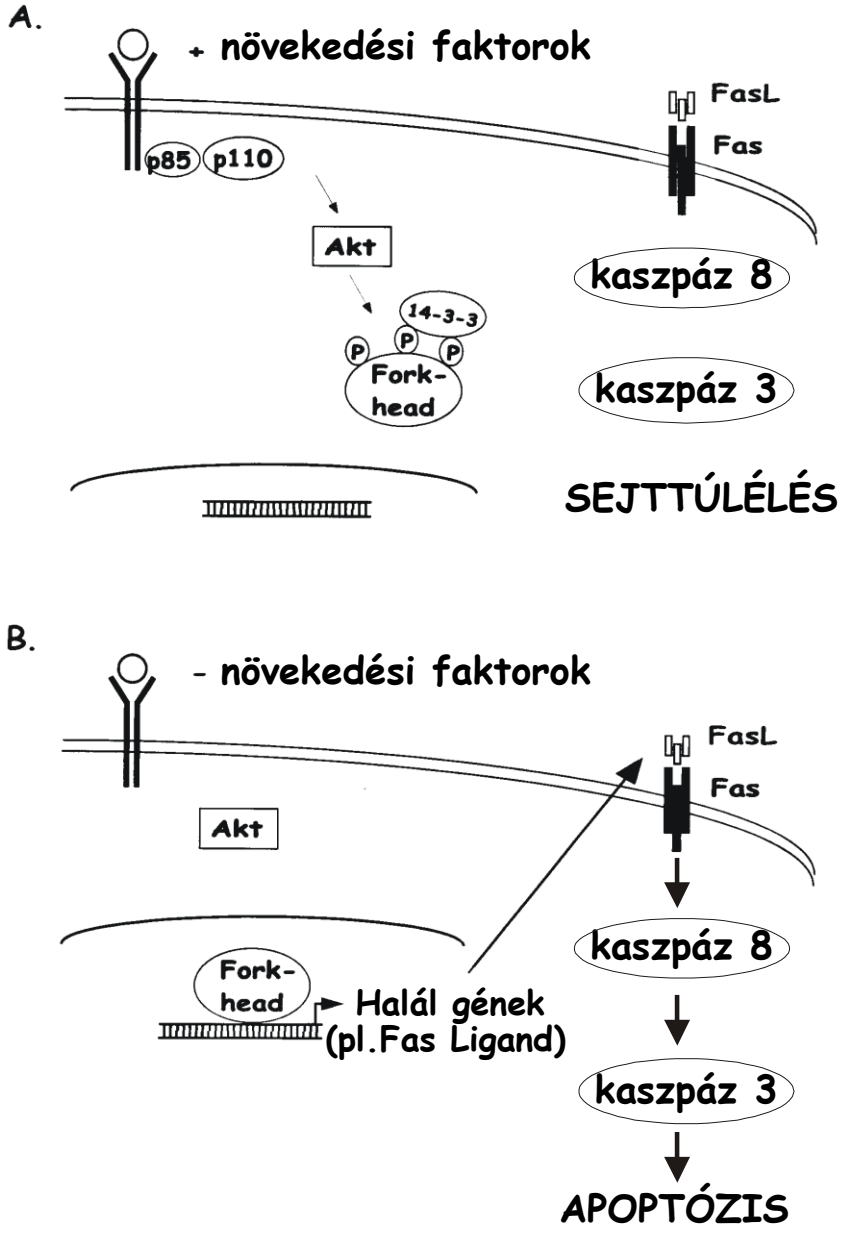


8. ábra. A mitokondriumból kiáramló citokróm *c* hatására aktiválódó kaszpáz kaszkád.

4.4.3. Forkhead transzkripciós faktor

Az apoptózis indukciójához aktív transzkripció szükséges sokféle sejttípusban. Az Akt sejttúlélés szabályozásának egyik lehetséges módja, hogy a sejthalálban szerepet játszó gének aktivációját módosítja. Ezt az a megfigyelés támasztja alá, hogy az Akt növekedési faktorokkal való aktivációja után 30 perccel leválik a plazmamembrán belső felszínéről, ahol kezdeti aktivációja történt és a sejtmagba transzlokálódik. Itt transzkripciós faktorok aktivitását foszforilációval módosítja. Nemrégiben bizonyították, hogy az Akt hatásosan foszforilálja az emberi Forkhead transzkripciós faktor család tagjait. Növekedési faktorok jelenlétében az Akt foszforilálja a Forkhead fehérjéket. A foszforilált fehérjék a 14-3-3 fehérjéhez kötődve a

citoplazmában maradnak és sejttúlélést közvetítenek. Növekedési faktorok hiányában az Akt inaktív és így a Forkhead fehérjék foszforilálatlan formában a sejtmagba transzlokálódnak és specifikus DNS szekvenciákhoz kötődnek. Az így indukált géntermékek pl. a Fas ligand autokrín vagy parakrín módon sejtfelszíni receptorhoz kötődve egy kaszkád folyamatot indít el, ami apoptózishoz vezet (Brunet és mtsai, 1999; Kops és mtsai, 1999) (9. ábra).



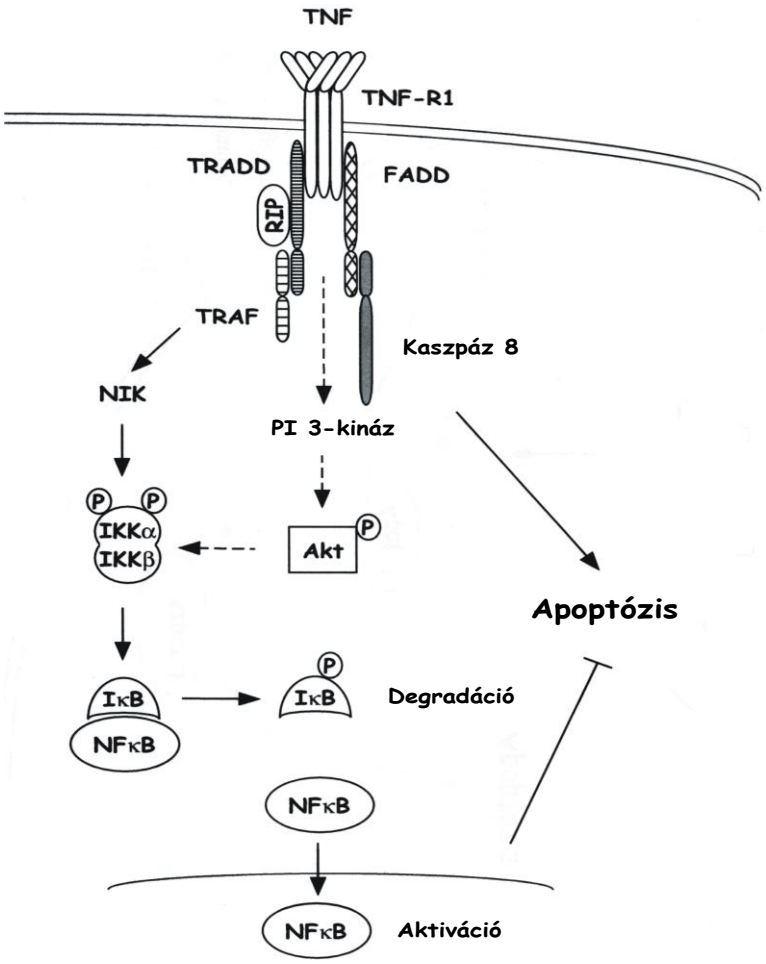
9. ábra. Az Akt a Forkhead transzkripciós faktor család foszforilációjával halál gének expresszióját szabályozza.

4.4.4. CREB

Az Akt a Forkhead család tagjain kívül egyéb transzkripciós faktorok aktivitását is szabályozza. A CREB fehérjét az Akt in vitro és in vivo is foszforilálja a Ser-133-as aminosavon. A foszforiláció a CREB fehérje CBP-hez (CREB kötő fehérje) való kötődését stimulálja és így növeli a CREB-mediálta transzkripciót (Du és Montminy, 1998). Az Akt a CREB foszforilációján keresztül fokozott Bcl-2 promoter aktivitással stimulálja a túlélést (Pugazhenthi és mtsai, 2000).

4.4.5. IKKα

Az NFκB egy ubikviter heterodimer transzkripciós faktor, amely a citoplazmában az IκB fehérje család tagjaival komplexet képez. Az IκB foszforilációja szignált jelent az ubikvitináláshoz és proteoszóma mediálta degradációhoz vezet. Ezáltal az NFκB felszabadul, a sejtmagba transzlokálódik, ahol célgéneket aktivál. Az NFκB által szabályozott gének még nem teljesen ismertek, de közéjük tartoznak az antiapoptotikus Bcl-2 családból a Bfl-1/A1 és a kaszpáz gátló c-IAP1 és c-IAP2. Az IκB foszforilációját egy fehérjekináz kaszkád végzi, amelyben az IKKα és IKKβ játszik szerepet. Kísérleti eredmények bizonyítják, hogy az Akt aktivációja PDGF és TNF (tumor nekrózis faktor) kezelésre szükséges és elégséges az NFκB transzkripciós aktivitásának növeléséhez. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy TNFα kezelésre az Akt foszforilálja és ezáltal inaktiválja az IKKα-t, ami NFκB aktivációhoz vezet (10. ábra). Az Akt IKK komplexet szabályozó mechanizmusa még vitatott az irodalomban (Ozes és mtsai, 1999; Romashkova és Makarov, 1999; Kane és mtsai, 1999; Madrid és mtsai, 2000).



10. ábra. Az Akt az NFκB aktivációjával gátolja az apoptózist.

4.4.6. Glikogén szintáz kináz-3 (GSK-3)

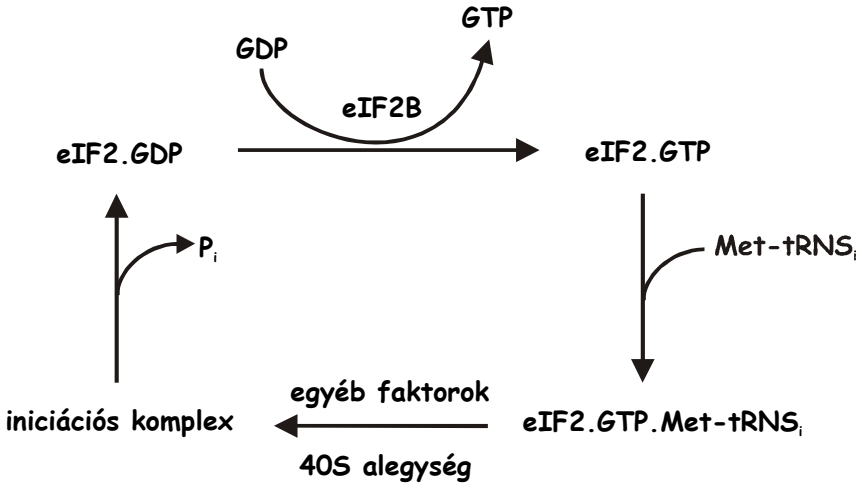
Az Akt elsőként azonosított fiziológiás szubsztrátja a GSK-3 volt (Cross és mtsai, 1995), amelyet inzulin kezelésre a glikogén szintézist szabályozó enzimként fedeztek fel először (Welsh és mtsai, 1996). A GSK-3 minden sejtben expresszálódó szerin/treonin fehérjekináz, amelynek emlős sejtekben két izoformája van: az 51 kDa GSK-3α és a 47 kDa GSK-3β. Növekedési faktorok hatására a GSK-3 foszforilálódik, amely aktivitásának gátlásához vezet. A GSK-3 foszforilációja és inaktiválása inzulin hatására PI 3-K függő, mivel PI 3-K gátlók a folyamatot gátolják. Ezen túlmenően az is bizonyított, hogy a GSK-3 inaktivációja az Akt foszforiláció következménye (Cross és mtsai, 1994; Cross és mtsai, 1995).

A GSK-3-nak szerepe van a sejthalál szabályozásában Dictyosteliumban (Harwood és mtsai, 1995) és a Wnt jelátviteli út komponense, amely jelentős szerepet játszik a Drosophila és Xenopus fejlődésében (Siegfried és mtsai, 1992; Dominguez és mtsai, 1995).

A GSK-3-nak nagyon sok szubsztrátja ismert, köztük metabolikus enzimek (glikogén szintáz, piruvát dehidrogenáz, ATP-citrát liáz), transzkripciós faktorok (c-Myc, L-Myc, c-Jun, JunB, JunD, Myb, CREB), eukariota transzlációs iniciációs faktor 2B (eIF2B), a citoszkeleton fehérje tau, β-katenin és a sejtciklust szabályozó ciklin D1 (Welsh és mtsai, 1996).

4.5. Az eukariota transzlációs iniciációs faktor 2B jellemzői

Az eukariota transzlációs iniciációs faktor 2B (eIF2B) fehérje 5 alegységből áll (α 32 kDa, β 40 kDa, γ 55 kDa, δ 65 kDa, ε 82 kDa). Fiziológiás feladata, hogy a transzláció iniciációja során az eIF2 iniciációs faktor guanin nukleotid kicserélő faktoraként működik. Az eIF2 az iniciáció kezdetén GTP-kötött állapotban alkalmas az első Met-tRNS-el, egyéb iniciációs faktorokkal és a 40S riboszóma alegységgel létrehozni az iniciációs komplexet. Az iniciáció során a GTP hidrolizálódik és az eIF2 GDP kötött formában válik le a komplexről. Minden iniciációs folyamat végén az aktív GTP kötött eIF2-nek regenerálódnia kell az eIF2.GDP kötött formából, amelyhez az eIF2B nukleotid kicserélő aktivitása szükséges. Mivel az eIF2 minden iniciációs folyamathoz szükséges, az eIF2B aktivitásának szabályozása az egész transzláció iniciációját befolyásolja (11. ábra).



11. ábra. Az eIF2B szerepe a transzláció iniciációjában.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy inzulin hatására az eIF2B aktiválódik, egy PI 3-K függő úton keresztül. Az eIF2B ε alegységét több enzim foszforilálja; a kazein kináz-I. és II. foszforilációja aktiváló hatású, míg a GSK-3 foszforiláció hatására az eIF2B inaktiválódik (Welsh és mtsai, 1998).

5. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk a Ras-függő és Ras-független jelátviteli utak közötti összefüggéseket és tanulmányozzuk a különböző szerin/treonin-specifikus fehérjekinázok által közvetített jeláviteli utakat a génexpresszió szintjén PC12 sejtekben.

1. A génexpresszió szerepének vizsgálata a neuronális differenciációban. Vizsgáltuk az NGF és különböző másodlagos messenger analóg (dbcAMP, forbol észter TPA, ionomicin) kombinációk hatására bekövetkező korai és késői gének expresszióját vad típusú PC12 sejtekben és a mutáns Ras fehérjét különböző mértékben expresszáló PC12 szubklónokban.

2. Korai-válasz gén termékek enhancer-kötő aktivitásának stimulációja NGF és másodlagos messengerek hatására.

Növekedési faktor-függő sejtek túlélésének szabályozása a PI 3-K/Akt jelátviteli úton keresztül valósul meg. Az Akt elsőként azonosított fiziológiás szubsztrátja a glikogén szintáz kináz-3 (GSK-3) volt, amelynek aktivitása foszforilációval gátolható. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a GSK-3 milyen szerepet játszik a sejttúlélés szabályozásában. A GSK-3 szubsztrátjai közé tartozik az eIF2B, amely a transzláció iniciációjának fontos szabályozó fehérjéje, ezért vizsgáltuk, hogy a fehérjeszintézis szabályozása szerepet játszik-e a sejttúlélésben. Kísérleteinkhez PC12 és Rat-1 patkány fibroblaszt sejteket használtunk, mivel mindkettőben a sejttúlélés szabályozása PI 3-K függő folyamat.

1. Irodalmi adatok alapján ismert a sejttúlélés szabályozásában az NGF apoptózist kivédő hatása, amely a PI 3-K/Akt jelátviteli úton keresztül valósul meg. Mivel az Akt foszforilációja a GSK-3 aktivitásának gátlását hozza létre, ezért azt vizsgáltuk, hogy NGF kezelés hatására csökken-e a GSK-3 aktivitása.

2. Tranziens transzfekciós vizsgálatokat végeztünk annak igazolására, hogy az aktív GSK-3 overexpressziója okoz-e apoptózist.

3. Kísérleteinkben vizsgáltuk, hogy a GSK-3 által előidézett apoptózis kivédhető-e az apoptózis ismert gátlószereivel (domináns negatív mutáns p53 kotranszfekciója, CPP32 kaszpáz inhibitor, Bcl-2 vagy Bcl-x_L kotranszfekciója).

4. Tanulmányoztuk, hogy a GSK-3 aktivitás szükséges-e a PI 3-K indukálta apoptózishoz.

5. Mivel a fehérjeszintézis létfontos fiziológiás folyamata a sejtnek, megvizsgáltuk, hogy a transzláció szabályozása szerepet játszik-e a sejttúlélés jelátvitelében. Célul tűztük ki, hogy tanulmányozzuk az eIF2B ε alegység GSK-3 általi inaktiváló foszforilációjának hatását a sejttúlélés szabályozásában. Vizsgáltuk a GSK-3 által nem foszforilálható mutáns eIF2B (S535A eIF2B) hatását a GSK-3 indukálta, a PI 3-K gátlása ill. a szérum megvonás okozta apoptózisra.

6. Vizsgáltuk, hogy a mutáns S535A eIF2B kivédi-e a PI 3-K gátlás következtében kialakuló fehérjeszintézis gátlást.

7. Vizsgáltuk, hogy a transzláció gátlása okoz-e apoptózist. Kísérleteinket egy ismert fehérjeszintézis gátlószerrel, a cikloheximiddel végeztük. Kísérleteket végeztünk arra vonatkozóan is, hogy milyen hatása van a mutáns S535A eIF2B-nek a cikloheximid indukálta apoptózisra.

8. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy több apoptotikus szignál (szérum megvonás, PI 3-K gátlás, UV sugárzás) citokróm *c* kiáramlást indukál a mitokondriumból, amely egy kaszpáz fehérjebontó kaszkád aktiválásával indukál apoptózist. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a transzláció gátlása okoz-e citokróm *c* kiáramlást, ill. milyen hatása van a mutáns S535A eIF2B-nek erre a folyamatra.

6. ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

6.1. Sejtkultúrák

PC12 patkány pheochromocytoma sejteket 10% foetális borjú szérumot és 5% lószérumot tartalmazó DMEM médiumban, a Rat-1 patkány fibroblaszt sejteket 10% borjúszérumot tartalmazó DMEM médiumban tenyésztettünk.

Kísérleteinkhez mutáns Ras fehérjét különböző mértékben expresszáló, stabilan transzfektált PC12 szubklónokat is használtunk; a Ha-Ras Asn-17 mutáns fehérjét alacsony koncentrációban expresszáló Z-M17-5 és a Ha-Ras Asn-17 mutáns fehérjét magas koncentrációban expresszáló M-M17-26 sejteket.

A sejteket a következő anyagokkal kezeltük a génexpressziós vizsgálatokhoz: NGF (50 ng/ml), dbcAMP (0.5 mM), tetradekanoil forbol acetát (TPA; 20 nM), ionomicin (0.25 μM), az apoptózis vizsgálatokhoz: NGF (100 ng/ml), LY294002 (50 μM), wortmannin (100 nM), CPP32 gátló (DEVD-CHO, 100 μM), cikloheximid (CHX, 10 μg/ml).

6.2. Northern blot

PC12 szubklónokat a kiültetés utáni napon 24 óráig 0.5% lószérumot tartalmazó médiumban tenyésztettünk. Ezután a sejtek 30 perces ill. 24 órás kombinációs kezelésben részesültek, majd teljes citoplazmatikus RNS-t izoláltunk. Radioaktívan jelölt c-*fos*, *zif*268, *nur*77 ill. tranzin próbákkal Northern blot hibridizációt, majd autoradiográfiát végeztünk.

6.3. Mobility shift analízis

PC12 szubklónokból 1 órás kezelést követően sejtmag extraktumot izoláltunk, amelyet radioaktívan jelölt oligonukleotid próbákkal inkubáltunk. A DNS-fehérje komplexeket elektroforézist követően autoradiográfiával vizsgáltuk.

6.4. GSK-3 kináz aktivitásának meghatározása

PC12 sejteket a kiültetés utáni napon 24 óráig 0.5% ló szérumot tartamazó médiumban tenyésztettünk. Ezután a sejtek 5, 15 vagy 30 perces NGF kezelésben részesültek, LY294002 vagy wortmannin előkezeléssel illetve anélkül. A sejtekből fehérje extraktumot készítettünk, majd GSK-3 antitesttel immunprecipitációt végeztünk. A GSK-3 kináz aktivitást in vitro kináz reakcióban határoztuk meg, ahol szubsztrátként foszfoglikogén szintáz peptidet használtunk. A beépült radioaktivitást folyadék szcintillációs számlálóval határoztuk meg.

6.5. Tranziens transzfekció

PC12 ill. Rat-1 sejteket poli-L-lizinnel kezelt fedőlemezre ültettünk ki 24 órával a transzfekció előtt. A tranziens transzfekciókhoz Lipofectamine reagenst (Life Technologies, Inc.) használtunk, a gyártó cég leírása alapján. A transzfekciókat 1 μg expressziós plazmiddal végeztük el, amellyel kotranszfektáltunk 1 μg zöld fluoreszcens fehérjét expresszáló plazmidot is. A transzfekció után 2 nappal a sejteket fixáltuk és a sejtmagokat DNS-kötő festékkel, a Hoechst-el festettük meg. A transzfektált sejteket a zöld fluoreszcencia alapján fluoreszcens mikroszkóppal azonosítottuk és az apoptotikus sejtmagokat a jellegzetes morfológia alapján számoltuk meg. Kísérletenként minden expressziós vektorral átlagosan 100-150 transzfektált sejtet számoltunk meg.

6.6. Pontmutáció létrehozása irányított mutagenezissel

A patkány eIF2B ε alegységének irányított mutagenezisét a QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit-el (Stratagene) végeztük el, a gyártó cég leírása alapján. Az 535-ös pozicióban levő szerint (amely a GSK-3 foszforilációs hely a patkány eIF2B ε alegységének szekvenciájában) cseréltük alaninra. A pontmutáció ellenőrzése szekvenálással történt.

6.7. Sejtek szortírozása áramlási citométerrel

PC12 sejteket 100 mm-es lemezre ültettünk ki a transzfekciót megelőző napon. A

tranziens transzfekciókat 4 μg kontroll, vad-típusú eIF2B ill. mutáns eIF2B (S535A eIF2B) expressziós plazmidokkal és 4 μg zöld fluoreszcens fehérjét expresszáló plazmiddal (pEGFP-C1) végeztük el. A transzfekció után 1 ill. 2 nappal a sejteket tripszineztük, majd zöld fluoreszcenciájuk alapján áramlási citométerrel szortíroztuk. A legintenzívebben zölden fluoreszkáló sejteket kiültettük és másnap LY294002-vel kezeltük, majd ^{35}S-metionin jelölést követően fehérjeszintézisük aktivitását TCA precipitációval határoztuk meg.

6.8. Fehérjeszintézis vizsgálata

PC12 és Rat-1 sejteket 100 mm-es lemezre ültettünk ki a kezelést megelőző napon. A sejteket cikloheximiddel (CHX) kezeltük, majd ^{35}S-metionin jelölést követően fehérjeszintézisük aktivitását TCA precipitációval határoztuk meg.

6.9. Citokróm *c* immunhisztokémia

PC12 sejteket poli-L-lizinnel kezelt fedőlemezre ültettünk ki, majd másnap LY294002-vel vagy CHX-el kezeltük. A sejtek fixálását és permeabilizálását követően anti-citokróm *c* antitesttel immunhisztokémiát végeztünk. A második antitest CY3-konjugált anti-egér IgG volt. A kontroll sejtekre a lokalizált fonalszerű festődés volt jellemző, míg a mitokondriumból kiáramlott citokróm *c* hatására homogén, diffúz festődést figyeltünk meg.

7. EREDMÉNYEK

Az NGF-indukálta génexpresszió Ras függésének vizsgálatához domináns negatív mutáns Ras fehérjét expresszáló PC12 szubklónokat használtunk. A mutáns fehérje (Ha-Ras Asn-17) a guanin nukleotid kicserélő faktort szekvesztrálja, így hatékonyan gátolja az endogén Ras fehérje NGF receptoron keresztüli aktivációját. A mutáns fehérje magas szintje gátolja az NGF indukálta korai és késői génexpressziót, míg alacsony koncentrációja esetén bizonyos korai gének expressziója normális. A Ha-Ras Asn-17 fehérjét expresszáló PC12 szubklónok (M17 szubklónok) jellemzője, hogy NGF stimuláció hatására nem növesztenek neuritokat (Szeberényi és mtsai, 1990), de a sejtek NGF és dibutiril-cAMP (dbcAMP) vagy NGF és a Ca^{++} ionofor ionomicin kombinációs kezelése részleges differenciációs választ idéz elő (Szeberényi és mtsai, 1992).

1. Korai válasz gének aktivációja NGF és különböző másodlagos messengerek kombinációs kezelésére.

Kísérleteinkben korai válasz gének (c-*fos*, *zif*268 és a *nur*77) expressziójának jelentőségét vizsgáltuk PC12 sejtek morfológiai differenciációjára. A c-*fos* gén egy proto-onkogén leucin cipzár transzkripciós faktort kódol, amely a szintén leucin cipzár c-Jun fehérjével heterodimert alkot. Ez az AP-1 transzkripciós faktor, melynek enhancer eleme számos gén, köztük a c-*fos* és a c-*jun* promoterében is megtalálható (Curran és Franza, 1988). A *zif*268 gén terméke egy cinkujj transzkripciós faktor (Gashler és Sukhatme, 1995), míg a *nur*77 gén egy szteroid receptor családba tartozó fehérjét kódol (Hazel és mtsai, 1988). Ezen korai válasz gének termékei, mivel különböző DNS-kötő helyekkel rendelkező NGF-indukálta transzkripciós faktorok, különböző késői válasz gének indukcióját szabályozzák.

Vad-típusú PC12 sejteket és M17 szubklónokat (a Ha-Ras Asn-17 mutáns fehérjét alacsony koncentrációban expresszáló Z-M17-5 és a Ha-Ras Asn-17 mutáns fehérjét magas koncentrációban expresszáló M-M17-26 sejteket) NGF és három másodlagos messenger analóg (dbcAMP, TPA, ionomicin) egyikének kombinációjával kezeltük, majd Northern blot analízist végeztünk. Korábbi eredményeinkkel megegyezően azt tapasztaltuk, hogy a korai gének NGF aktivációja PC12 és az alacsony expressziójú Z-M17-5 sejtekben egyaránt megtörténik, míg a

magas expressziójú M-M17-26 sejtekben teljesen gátolt (I. melléklet, 1. ábra). A c-*fos* és a *zif*268 hasonló indukciót mutatott az NGF és másodlagos messenger analógok kombinációjára. A proteinkináz A (dbcAMP), a proteinkináz C (TPA), és a Ca^{++}/calmodulin (ionomicin) jelátviteli utak aktivációja csak mérsékelt c-*fos* és *zif*268 indukciót okozott és az indukció mértéke az NGF-el való kombinációs kezelés hatására összegződött. Ennek a két génnek az indukciója hasonló képet mutatott a PC12 és az alacsony expressziójú Z-M17-5 sejtekben és indukciójuk teljesen gátolt volt a magas expressziójú M-M17-26 sejtekben. Ezzel ellentétben, a *nur*77 gén expressziója dbcAMP és TPA hatására jobban indukálódott, mint NGF stimulációra mindhárom sejtvonalban, amelynek hatására az NGF+dbcAMP vagy NGF+TPA kombinációs kezelés a *nur*77 erős indukcióját eredményezte a magas expressziójú M-M17-26 sejtekben is. A kálcium ionofor ionomicin gyenge génindukciós hatással volt mindhárom korai génre.

2. Korai válasz gén termékek enhancer-kötő aktivitásának stimulációja NGF és másodlagos messengerek hatására.

AP-1, Zif268 és Nur77 kötőhelyeket tartalmazó oligonukleotid próbákkal elektroforetikus mobility shift vizsgálatot végeztünk, hogy megvizsgáljuk a korai válasz gének termékeinek DNS-hez való kötődését NGF és különböző másodlagos messengerrel végzett kombinációs kezelések hatására. Az AP-1 és Zif268 kötőhelyek 1 órás NGF stimuláció hatására maximális aktivitást mutattak (I. melléklet, 2. ábra), az AP-1 kötés még legalább 6 óráig magas maradt, míg a Zif268 kötés 4 órás NGF stimuláció után az alap szintre csökkent vissza (Szeberényi, 1998). Az AP-1 és Zif268 kötést is stimulálta az NGF és mindhárom másodlagos messenger analóg, az NGF és másodlagos messenger kombinációs kezelésnek additív hatása volt. A vad-típusú PC12 sejtekből és az alacsony M17-expressziójú Z-M17-5 sejtekből készült extraktumok nagyon hasonló enhancer kötő aktivitást mutattak, míg az M-M17-26 sejtekben a domináns negatív Ras fehérje magas expressziója miatt az NGF hatása erősen gátolt volt. Kísérleteink alapján megállapíthatjuk, hogy az AP-1 és Zif268 specifikus próbákkal végzett elektroforetikus mobility shift vizsgálattal kapott eredményeink a Northern blot vizsgálattal kapott eredményeinkkel összhangban állnak. Ez arra utal, hogy ezen korai géntermékek poszttranszlációs szabályozásában nincs lényeges különbség a vad-típusú és az alacsony M17-expressziójú PC12 sejtek között. Jelen kísérleti körülmények között nem tudtunk sem alap, sem

indukálható Nur77 próbához való kötést kimutatni.

3. A tranzin gén aktivációja NGF és különböző másodlagos messengerek kombinációs kezelésére.

A fenotípus változásért felelős késői válasz gének közül a tranzin gén expresszióját vizsgáltuk különböző PC12 szubklónjainkban. A tranzin egy szekretált metalloproteináz, amely PC12 sejtekben nem expresszálódik, de NGF hatásra fehérjeszintézis-függő módon erősen indukálódik (Machida és mtsai, 1989). A tranzin gén NGF indukciója erősen Ras-függő (I. melléklet, 3. ábra), expressziója teljesen gátolt még a domináns gátló Ras fehérjét alacsony szinten expresszáló PC12 sejtvonalban is. Kísérleteinkben használt másodlagos messengerek hatására a tranzin gén nem indukálódik, de a proteinkináz A (I. melléklet, 3.A. ábra) vagy a proteinkináz C (I. melléklet, 3.C. ábra) jelátviteli út stimulációja szinergizál az NGF-jelátvitellel a tranzin gén expressziójában. A szinergizmus megfigyelhető az alacsony M17-expresszor Z-M17-5 sejtekben, de a magas M17-expresszor M-M17-26 szubklónban nem mutatható ki a tranzin gén expressziója az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között. Az ionomicinnek nem volt hatása a tranzin gén expressziójára egyik sejtvonalban sem.

4. A GSK-3 aktivitásának gátlása a PI 3-K/Akt jelátviteli úton keresztül valósul meg.

Irodalmi adatok alaján ismert, hogy növekedési faktor kezelés és a PI 3-K/Akt jelátviteli út serkentése a GSK-3 inaktivációját hozza létre. Ezért azt vizsgáltuk, hogy az NGF, amelyről ismert, hogy sejttúlélést közvetít a PI 3-K úton keresztül (Yao és Cooper, 1995a), gátolja-e a GSK-3 aktivitását. PC12 sejteket NGF-el kezeltünk PI 3-K gátló LY294002 vagy wortmannin előkezeléssel illetve anélkül. A GSK-3 antitesttel végzett immunprecipitációt követően a kináz aktivitását in vitro kináz reakcióban határoztuk meg. Az NGF a GSK-3 kináz aktivitás 30-40%-os csökkenését idézte elő (II. melléklet, 1. ábra). A GSK-3 aktivitásának gátlása kivédhető volt a PI 3-K gátló LY294002 illetve wortmannin előkezelésével, amely arra utal, hogy az NGF indukálta GSK-3 aktivitás csökkenés PI 3-K jelátviteli út függő folyamat.

5. Apoptózis indukciója GSK-3 overexpresszióval.

Mivel PC12 sejtek NGF kezelésekor a GSK-3 aktivitás csökken a PI 3-K út közvetítésével, megvizsgáltuk, hogy az aktív GSK-3 overexpressziója okoz-e apoptózist. Vizsgálatainkhoz PC12 és Rat-1 (patkány fibroblaszt) sejteket használtunk, amelyekben a PI 3-K központi szerepet játszik a sejttúlélés jelátvitelében (Yao és Cooper, 1995b). A sejteket tranziensen transzfektáltuk egy zöld fluoreszcens fehérjét expresszáló plazmiddal (GFP) és kotranszfektáltunk vad-típusú GSK-3 vagy domináns negatív R85 GSK-3β cDNS-t expresszáló plazmidokkal. A transzfektált sejteket zöld fluoreszcenciájuk alapján fluoreszcens mikroszkópban azonosítottuk, az apoptotikus sejteket pedig a sejtmagok jellegzetes morfológiája alapján számoltuk meg Hoechst festést követően (II. melléklet, 2. ábra). A kontrol sejteknek (amelyeket vagy csak az üres vektor plazmiddal vagy a domináns negatív GSK-3β plamiddal transzfektáltunk) kb. 20%-a volt apoptotikus mind a PC12, mind a Rat-1 sejtekben (II. melléklet, 3. ábra). Ezzel ellentétben, mindkét sejtvonal esetén a sejtek 60-70%-a apoptotizált a vad-típusú GSK-3β transzfekcióját követően. Kontrollként vad-típusú és domináns negatív p53 fehérjét expresszáló plazmidot transzfektáltunk, mivel az irodalomból ismert az, hogy a vad-típusú p53 apoptózist indukál, míg a domináns negatív p53 nem. Így kísérleteinkből megállapítható, hogy az aktív GSK-3β overexpressziója elegendő az apoptózis indukciójához.

Következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a GSK-3β által előidézett apoptózis gátolható-e az apoptózis ismert gátló szereivel. Domináns negatív p53 kotranszfekciójával kivédhető a GSK-3β által előidézett apoptózis (II. melléklet, 4. ábra), amely alátámasztja a p53 szerepét a PI 3-K gátlás következtében indukálódó apoptózisban mind PC12 mind Rat-1 sejtekben (Erhardt és mtsai, 1997). A GSK-3 által indukált apoptózis ugyancsak blokkolható a CPP32 kaszpáz peptid-inhibitorával. A CPP32 (kaszpáz 3) egy effektor kaszpáz (Nicholson és Thornberry, 1997), amely különböző apoptotikus stimulusokra aktiválódik, köztük a PI 3-K gátlás hatására (Erhardt és Cooper, 1996; Erhardt és mtsai, 1997). A GSK-3 indukálta apoptózis ugyancsak gátolható a Bcl-2 vagy Bcl-x_L-t expresszáló plazmidok kotranszfekciójával, amelyekről ismert, hogy különböző hatásra, pl. PI 3-K gátlásra bekövetkező apoptózist kivédik (Erhardt és Cooper, 1996).

6. Domináns negatív GSK-3 gátolja a PI 3-K gátlásával előidézett apoptózist.

A következőkben azt határoztuk meg, hogy a GSK-3 aktivitás szükséges-e az apoptózis kialakulásához, amelyet a PI 3-K gátlása okoz. PC12 és Rat-1 sejteket domináns negatív mutáns GSK-3 (R85 GSK-3) plazmiddal (Dominguez és mtsai, 1995) transzfektáltunk, majd specifikus PI 3-K gátlóval, az LY294002-vel kezeltünk. Az LY294002 kezelés a kontroll sejtek 60%-ában apoptózist okozott. Az R85 GSK-3 mutáns szignifikánsan csökkentette az LY294002 által okozott apoptózis mértékét (II. melléklet, 5. ábra). Hasonló eredményt kaptunk, amikor a sejteket domináns negatív PI 3-K expresszáló plazmiddal transzfektáltuk. A domináns negatív PI 3-K a transzfektált sejtek 60%-ában indukált apoptózist és ez szignifikánsan gátolható volt a domináns negatív mutáns GSK-3 kotranszfekciójával (II. melléklet, 6. ábra). Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy a GSK-3 aktivitása szükséges a PI 3-K gátlás következtében kialakuló apoptózishoz.

7. Az S535A eIF2B hatása a GSK-3 indukálta, a PI 3-K gátlása ill. a szérum megvonás okozta apoptózisra.

Az eIF2B ε alegységének GSK-3 általi foszforilációja a fehérje inaktivációját és ezzel együtt a fehérjeszintézis gátlását okozza (Welsh és mtsai, 1998). Az inaktiváló foszforiláció sejttúlélésben játszott szerepének tisztázására a GSK-3 által foszforilált 535-ös pozicióban levő szerint alaninra cseréltük ki és a továbbiakban ezzel a mutáns eIF2B fehérjét (S535A eIF2B) expresszáló plazmiddal végeztük el a kísérleteket. PC12 és Rat-1 sejteket GSK-3 expressziós plazmiddal, vad-típusú és mutáns eIF2B-t (S535A eIF2B) expresszáló plazmiddal transzfektáltunk. A transzfektált sejtek azonosítása miatt a sejteket zöld fluoreszcens fehérjét expresszáló plazmiddal kotranszfektáltuk. A transzfektált sejtek kb. 60%-a apoptotizált a GSK-3 ill. a vad-típusú eIF2B overexpressziója esetén. Azonban a nem foszforilálható mutáns S535A eIF2B expressziója kivédte a GSK-3 indukálta apoptózist mindkét sejtvonalban (III. melléklet, 1. ábra). Ez a megfigyelés arra utal, hogy az eIF2B foszforilációja a GSK-3 által indukált apoptózisban szerepet játszik.

Hogy tovább tanulmányozzuk az eIF2B szerepét a sejttúlélésben, vizsgáltuk, hogy a mutáns S535A eIF2B kivédi-e a PI 3-K gátlása ill. a növekedési faktorok megvonására

bekövetkező apoptózist. Az S535A eIF2B transzfekciója hatékonyan megakadályozta az apoptózist PC12 és Rat-1 sejtekben, amelyet a PI 3-K gátló LY294002 kezeléssel idéztünk elő (III. melléklet, 2.A. ábra). Ugyanezt az eredményt kaptuk, amikor a PI 3-K gátlását domináns negatív mutáns PI 3-K transzfekciójával végeztük (III. melléklet, 2.B. ábra). Mivel mind a PC12, mind a Rat-1 sejtek növekedési faktor függő sejtek, a növekedési faktorokat tartalmazó szérum megvonásakor apoptotizálnak. Az S535A eIF2B overexpressziója hatékonyan gátolja a szérum megvonás indukálta apoptózist is (III. melléklet, 2.C. ábra). Kísérleteinkből levonható következtetés, hogy az eIF2B fehérje szabályozása a növekedési faktor receptorokon keresztül, PI 3-K-függő úton történik.

8. A mutáns S535A eIF2B hatása a transzlációra PI 3-K gátlást követően.

A PI 3-K gátlása a transzláció csökkenését eredményezi (Welsh és mtsai, 1998). A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a mutáns eIF2B-t overexpresszáló sejtekben a transzláció gátlása kivédhető-e. PC12 sejteket zöld fluoreszcens fehérjét expresszáló plazmiddal és kontroll, vad-típusú ill. mutáns eIF2B-t expresszáló plazmidokkal kotranszfektáltunk. A transzfektált sejtek közül a legintenzívebben zölden fluoreszkáló sejteket áramlási citométerrel válogattuk ki (III. melléklet, 3.A. ábra), majd a PI 3-K gátló LY294002 kezelést követően transzlációs aktivitásukat meghatároztuk. A PI 3-K gátlása a kontroll ill. a vad-típusú eIF2B-vel transzfektált sejtekben a transzláció 70-75%-os csökkenését idézte elő. A mutáns S535A eIF2B overexpressziója szignifikánsan blokkolta a PI 3-K gátlás hatását, ezekben a sejtekben a transzláció aktivitása kb. 60%-os volt (III. melléklet, 3.B. ábra). Tehát, PC12 sejtekben a transzláció szabályozása a PI 3-K/Akt/GSK-3 út közvetítésével történik.

9. A transzláció gátló cikloheximid hatása az apoptózisra.

A mutáns S535A eIF2B képes a fehérjeszintézis fenntartására és az apoptózis kivédésére PI 3-K gátlást követően, ami azt mutatja, hogy a fehérjeszintézis szabályozásának fontos szerepe van a sejttúlélésben. A fehérjeszintézis további vizsgálatához a fehérjeszintézis ismert gátlószerét, a cikloheximidet használtuk és azt vizsgáltuk, hogy a transzláció gátlása okozhat-e apoptózist. A cikloheximid a fehérjeszintézis gátlása mellett PC12 és Rat-1 sejtek apoptózisát

indukálta dózis-függő módon (III. melléklet, 4.A. ábra). A mutáns S535A eIF2B overexpressziója nem véd a cikloheximid indukálta apoptózistól (III. melléklet, 4.B. ábra), ami azt mutatja, hogy a mutáns eIF2B specifikusan csak a PI 3-K gátlás következtében indukálódó apoptózist védi ki.

10. A fehérjeszintézis gátlásának hatása a citokróm *c* kiáramlásra.

Apoptotikus stimulusok hatására citokróm *c* áramlik ki a mitokondriumokból, amely a citoplazmában kaszpáz kaszkád elindításával apoptózist okoz (Green és Reed, 1998; Desagher és Martinou, 2000; Green, 2000). Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy vajon a cikloheximiddel, illetve a PI 3-K gátlással kiváltott transzláció gátlás okoz-e mitokondriális diszfunkciót és citokróm *c* kiáramlást. PC12 sejtek PI 3-K gátló LY294002-vel ill. cikloheximiddel való kezelése után anti-citokróm *c* antitesttel immuncitokémiai festést végeztünk. Azt tapasztaltuk, hogy a PI 3-K gátlása és a cikloheximiddel történt transzláció gátlás egyforma mértékű citokróm *c* kiáramlást indukál, ami azt mutatja, hogy mind a PI 3-K út gátlásával, mind a cikloheximiddel előidézett transzláció gátlása a mitokondrium "előtt" hatva elősegítik a citokróm *c* kiáramlást (III. melléklet, 5.A. ábra).

11. A mutáns S535A eIF2B hatása a citokróm *c* kiáramlásra.

A PI 3-K/Akt jelátviteli út aktiválása gátolja a mitokondriális citokróm *c* kiáramlást (Kennedy és mtsai, 1999). Mivel a mutáns S535-eIF2B fehérjét expresszáló sejtekben a transzláció PI 3-K gátlás esetén sem csökken jelentős mértékben, ezért feltételeztük, hogy ezekben a sejtekben a citokróm *c* kiáramlás is kisebb mértékű, mint a kontroll sejtekben. PC12 sejtek kontroll, vad-típusú és mutáns eIF2B-t expresszáló plazmidokkal való transzfekciója után LY294002 illetve CHX kezelésben részesültek, majd anti-citokróm *c* antitesttel immuncitokémiai festést végeztünk. A mutáns S535A eIF2B overexpressziója hatékonyan gátolja a PI 3-K gátlás következtében kialakuló citokróm *c* kiáramlást, de nincs hatással a cikloheximid indukálta citokróm *c* kiáramlásra (III. melléklet, 5.B. ábra). Kísérleteinkből levonható következtetés, hogy az eIF2B foszforilációja és az ennek következtében kialakuló transzláció gátlása okozza a citokróm *c* kiáramlását a mitokondriumból és apoptózist indukál.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

A fentiekben ismertetett kísérleti megfigyeléseink legfontosabb következtetései az alábbiakban foglalhatók össze.

A korai gének normál indukcióját vad-típusú PC12 és részlegesen Ras gátolt (Z-M17-5) sejtekben nem követi a tranzin késői gén indukciója.

Az általunk vizsgált korai gének korai citoplazmatikus jelátviteli eseményeket kötnek össze a fenotípus változásokért felelős késői gének aktivációjával. Ez a kapcsolat feltételezhetően létrejöhet a c-*fos*, *zif*268 és a tranzin gén között, mivel a tranzin promoter tartalmaz AP-1 és a Zif268 fehérje kötőhelyeket (deSouza és mtsai, 1995). A korai és késői gének indukciója közötti kapcsolat azonban ennél bonyolultabb. Sok esetben a korai gének aktivációját nem követi késői gén aktiváció, annak ellenére, hogy promotere tartalmazza a megfelelő enhancer elemeket. A differenciációt indukáló növekedési faktorokon (NGF, FGF) kívül, a c-*fos*, *zif*268, és *nur*77 expressziója hatékonyan indukálható olyan hatásokkal, amelyek a tranzin gén transzkripcióját nem fokozzák (pl. EGF, TPA) (Machida és mtsai, 1989). Ezeket a megfigyeléseket megerősítettük és kiegészítettük kísérleteinkkel: részlegesen gátolt Ras fehérjét overexpresszáló PC12 sejtekben (Z-M17-5) a kombinációs kezelésre bekövetkező korai válasz gének normál indukcióját nem követte a tranzin gén indukciója. Megfigyelték, hogy a c-*fos* (Johnson és mtsai, 1992), *zif*268 (Lee és mtsai, 1996) és *nur*77 (Crawford és mtsai, 1995) homozigóta null mutációja nincs hatással az idegrendszer fejlődésére. A tranzin promoter AP-1 és Zif268 kötőhelyeinek mutációval történő inaktivációja nem befolyásolja a tranzin gén NGF indukálhatóságát (deSouza és mtsai, 1995). Ezen irodalmi adatok és saját kísérleti eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a c-*fos*, *zif*268, és *nur*77 gének aktivációja nem játszik kritikus szerepet az NGF jelátvitelben.

Nincs szoros korreláció a késői gének aktivációja és a fenotípus változások között.

Domináns negatív Ha-Ras fehérje expressziója gátolja az NGF által kiváltott neuritképződést PC12 sejtekben. Ez a hatás részlegesen kivédhető NGF és dbcAMP illetve NGF és ionomicin kombinációjával még a Ras mutáns fehérjét magas koncentrációban expresszáló M-M17-26 sejtvonalban is, viszont ebben a sejvonalban semmilyen hatással nem lehet a tranzin gént indukálni. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a tranzin gén expressziója nem szükséges a neuritképződéshez. Az NGF indukálta gén expressziós változások és a biológiai hatás közötti összefüggések rendkívül bonyolultak, valószínűleg transzkripciótól független jeláviteli folyamatok szabályozása alatt állnak.

Az NGF túlélési hatását a PI 3-K/Akt/GSK-3 jelpálya közvetíti.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy növekedési faktor kezelés és a PI 3-K/Akt jelátviteli út serkentése GSK-3 inaktivációt hoz létre nagyon sok sejtvonalban (Saito és mtsai, 1994; Cross és mtsai, 1994; Cross és mtsai, 1995; Hurel és mtsai, 1996; Welsh és mtsai, 1996; Welsh és mtsai, 1998). Ezekkel a megfigyelésekkel megegyezően, kísérleti eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy PC12 sejtekben az NGF indukálta GSK-3 aktivitás csökkenés is PI 3-K-függő folyamat. Ezen kívül megállapítottuk, hogy az aktív GSK-3 overexpressziója elégséges az apoptózis indukciójához, míg a domináns negatív GSK-3 expressziójával a PI 3-K gátlással indukált apoptózis effektíven kivédhető. Kísérleti eredményeinkkel megegyezően több kutatócsoport igazolta a GSK-3 apoptózist indukáló hatását. A GSK-3β proapoptotikus hatását neuroblasztoma sejtvonalban is kimutatták (Bijur és mtsai, 2000) és a GSK-3β aktivitása szükséges szimpatikus neuronok apoptózisához, melyet PI 3-K vagy Akt gátlással idéznek elő (Crowder és Freeman, 2000). A GSK-3β-nek szerepe van kortikális neuronok apoptózisában, amelyet növekedési faktorok megvonásával vagy PI 3-K gátlásával idéztek elõ (Hetman és mtsai, 2000). Kimutatták, hogy a neuronokban aktiválódó GSK-3β hozzájárul a HIV-1 Tat fehérjéje által indukált neuronális apoptózishoz (Maggirwar és mtsai, 1999).

Az eIF2B szerepe a túlélésben.

A GSK-3β overexpressziója apoptózist okoz, amelyet a mutáns S535A eIF2B kotranszfekciójával gátolni lehet. Ez arra utal, hogy az eIF2B foszforilációja a GSK-3 által indukált apoptózisban szerepet játszik. A PI 3-K gátlása szintén apoptózishoz vezet, amely a nem foszforilálható mutáns S535A eIF2B-vel kivédhető. Tehát, az eIF2B a PI 3-K sejttúlélést közvetítő útban szerepel. Növekedési faktor-függő sejtek szérum megvonásra apoptotizálnak, amelyet az eIF2B mutáns formájával ki lehet védeni, amely arra utal, hogy az eIF2B szabályozása a növekedési faktor receptorokon keresztül valósul meg.

A mutáns S535A eIF2B-t overexpresszáló sejtekben a PI 3-K gátlásra bekövetkező transzlációs aktivitás csökkenés szignifikánsan blokkolható (kb. 40%) a kontroll ill. a vad-típusú eIF2B-t overexpresszáló sejtekkel (kb. 70-75%) ellentétben. Ezért úgy gondoljuk, hogy az eIF2B foszforiláció következtében kialakuló transzláció gátlás valószínűleg szerepet játszik a GSK-3 indukálta apoptózisban. A fennmaradó fehérjeszintézis gátlás, amelyet a mutáns S535A eIF2B nem blokkol, feltételezhető, hogy a TOR fehérjekináz gátlása miatt jön létre. Az Akt aktiválja a TOR fehérjét, amely stimulálja a transzlációt a riboszómális S6 kináz, $p70^{S6K}$ foszforilációjával és az eIF4E transzlációs iniciációs faktorhoz kötődő fehérjék foszforilációjával (Dennis és mtsai, 1999).

Egyéb sejttípusokhoz hasonlóan [humán promielocitás leukémia HL-60 sejtvonal (Martin és mtsai, 1990), humán T-sejtvonalak (Tang és mtsai, 1999), patkány hepatocita (Blom és mtsai, 1999)] a cikloheximid PC12 és Rat-1 sejtekben is apoptózist indukál, ami a transzláció sejttúlélésben játszott szerepére utal. A mutáns S535A eIF2B nem védi ki a cikloheximid indukálta apoptózist, ami azt mutatja, hogy a mutáns fehérje csak specifikusan a PI 3-K gátlás következtében indukálódó apoptózis kivédésére alkalmas.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy különböző stimulusok hatására kialakuló apoptózis hátterében mitokondriális változások (membránpotenciál változás, citokróm *c* kiáramlás) állnak. A citoplazmába kijutó citokróm *c* a kaszpáz 9-el és az Apaf-1 fehérjével komlexet képezve további kaszpázok aktivációját indítja el, amely különböző szubsztrátok hasításával apoptózishoz vezet (Green, 2000). A PI 3-K/Akt jelátviteli út aktivációja gátolja a citokróm *c* kiáramlását és így a sejt túlélését biztosítja (Kennedy és mtsai, 1999). A PI 3-K gátlás és a cikloheximiddel előidézett transzláció gátlás egyaránt citokróm *c* kiáramlással jár. A

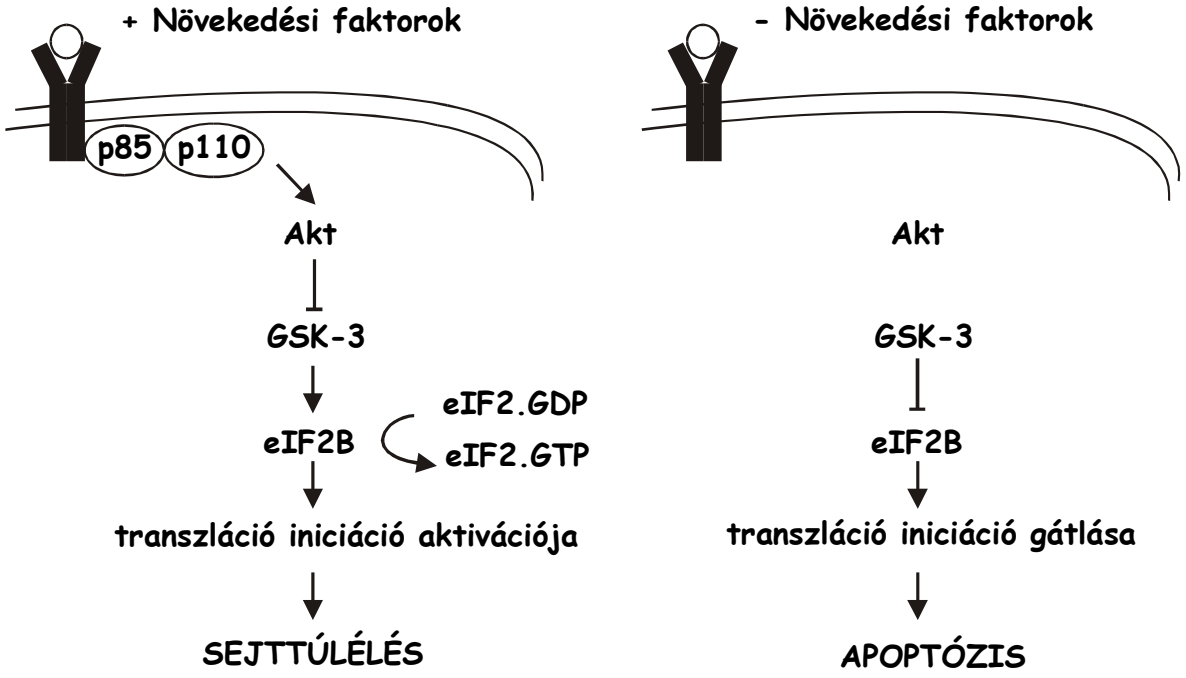
cikloheximid ezen hatása a citokróm *c* kiáramlásra megegyezik azzal a megfigyeléssel, miszerint a cikloheximid csökkenti a mitokondriális transzmembrán potenciált patkány hepatocitákban (Blom és mtsai, 1999).

A transzláció szabályozásának hasonló szerepe az apoptózis patogenezisében már ismert az irodalomból. A kettős láncú RNS által aktiválódó fehérjekináz R (PKR) az eIF2 iniciációs faktor α alegységének foszforilációjával szintén a transzláció gátlásához és apoptózishoz vezet (Gil és mtsai, 1999; Srivastava és mtsai, 1998).

9. ÖSSZEFOGLALÁS

PC12 sejtek neuronális differenciációja Ras-függő folyamat, de NGF és különböző másodlagos messengerek kombinációs kezelésével részleges differenciációs válasz idézhető elő a mutáns Ras fehérjét expresszáló szubklónokban. Ebben a sejtvonalban az általunk vizsgált korai gének normál indukcióját követően semmilyen hatással sem tudtunk tranzin gén indukciót kiváltani. Feltételezhető, hogy a tranzin gén expressziója nem szükséges a neuritképződéshez.

Kísérleteink alapján a PI 3-K/Akt/GSK-3/eIF2B sejttúlélést közvetítő jelátviteli út szabályozása a következőképpen foglalható össze (12. ábra). Növekedési faktorok jelenlétében a PI 3-K/Akt út aktiválódik, az aktív Akt foszforilálja a GSK-3-t, amelynek következtében a fehérje inaktiválódik. Az inaktív GSK-3 nem foszforilálja szubsztrátjait, így az eIF2B fehérje működése megtartott, a transzláció zavartalan. Növekedési faktorok hiányában, ill. a PI 3-K gátlása esetén a GSK-3 aktív, így foszforilálja és inaktiválja az eIF2B fehérjét. A transzláció iniciációja ebben az esetben gátolt. Az általános metabolikus zavar valószínűleg mitokondriális diszfunkciót okoz, ami mitokondriális változásokkal (membránpotenciál változás, citokróm *c* kiáramlás) beindít egy apoptózishoz vezető kaszkád folyamatot.



12. ábra. Az eIF2B szerepe a PI 3-K/Akt/GSK-3 jelátviteli út szabályozásában.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Szeberényi József professzor úrnak, hogy kezdettől fogva nagy szakértelemmel irányította tudományos munkámat, lelkesített, támogatott. Köszönöm, hogy lehetővé tette, hogy kutatásaimat az Amerikai Egyesült Államokban végezhettem. Köszönöm, hogy disszertációmat átnézte és jóindulatú tanácsaival azt értékesebbé tette.

Nagy segítséget kaptam Geoffrey M. Cooper professzortól, aki Bostonban biztosította munkám feltételeit, rendszeres tanácsaival irányította kutatásaimat.

Köszönöm barátnőmnek, Marion Jurknak, hogy szakmailag és lelkileg is támogatott.

Köszönettel tartozom kollégáimnak, köztük Boglári Gábornak, Fábián Zsoltnak, Horváth Gábornak, Kiss Katalinnak, Lakatos Anitának, Nusser Nórának, Salamon Szilviának, Sebők Ágnesnek, ifj, Sétáló Györgynek és Törőcsik Beátának baráti és szakmai támogatásukért.

Köszönöm Schäffer Rudolfnénak, Kiss Györgynének, Deák Árpádnénak és Vecsernyés Mónikának, hogy az intézetbe kerülésem óta kiemelkedő szakmai tanácsokkal segítették munkámat.

Köszönöm családomnak, hogy mindvégig biztattak és mindenben támogattak.

11. A MUNKA ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Közlemények

Pap M., Szeberényi J. Differential Ras-dependence of gene regulation by nerve growth factor and second messenger analogs in PC12 cells. Neurochem. Res. 7, 971-977. 1998. (Imp. f.: 1.755)

Pap M., Cooper G. M. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. J. Biol. Chem. 273, 19929-19932. 1998. (Imp.f.: 7,666)

Pap M., Cooper G. M. The PI 3-K/Akt/GSK-3 pathway regulates cell survival by controlling translation initiation factor eIF2B (közlésre elküdve)

Absztraktok

Pap M., Szeberényi J.: Ras-dependence of gene induction in PC12 cells. Cell Biology Int. 20(3) 242, 1996.

Pap M., Szeberényi J. Idegsejt növekedési faktor és másodlagos messenger analógok által kiváltott génindukció eltérő Ras-függése PC12 sejtekben. (Differential Ras-dependence of gene regulation by nerve growth factor and second messenger analogs in PC12 cells.) Lege Artis Medicinae 1999. 8. szám.

Pap M., G. M. Cooper. Role of translation initiation factor eIF2B in control of cell survival by the PI 3-K/Akt/GSK-3β signaling pathway. Anticancer Res. 21(3A), p1531, 2001.

Előadások

Pap M., Nusser N., Szeberényi J. A Ras fehérjék szerepe az idegsejt növekedési faktor indukálta korai génexpresszióban PC12 sejtekben. Magyar Biológiai Társaság XXI.

Vándorgyűlése, Pécs, 1994. 07. 7-9.

Pap M., Nusser N., Boglári G., Sétáló Gy., Szeberényi J. Korai gének expressziójának és foszforilációjának ras-függő és ras-független szabályozása NGF-stimulált PC12 sejtekben. III. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 1995. 01. 23-25.

Pap M., Szeberényi J. Génindukció Ras függése PC12 sejtekben. IV. Sejt- és fejlődésbiológiai Napok, Visegrád, 1996. 01. 18-20.

Pap M. Intracelluláris jelátviteli rendszerek. Az ezredforduló sejtbiológiája. XXXIX. Országos Biológus Napok, Pécs, 1996. 08. 21-23.

Pap M., Szeberényi J. Génindukció Ras függése PC12 sejtekben. Doktoranduszok I. Országos Konferenciája, Debrecen, 1996. 08. 28-30.

Pap M., Szeberényi J. Génindukció Ras függése PC12 sejtekben. Jelátviteli Konferencia, Kecskemét, 1996. 10. 25-26.

Pap M., Szeberényi J. Korai és késői válasz gének szabályozása NGF és másodlagos messengerek által PC12 pheochromocytoma sejtekben. V. Sejt- és fejlődésbiológiai Napok, Debrecen, 1997. 01. 19-22.

Pap M., G. M. Cooper. Az eIF2B transzlációs iniciációs faktor szerepe a PI 3-K/Akt/GSK-3 jelátviteli út szabályozásában. IX. Sejt- és fejlődésbiológiai Napok, Debrecen, 2001. 01. 21-24.

Pap M., G. M. Cooper. Role of translation initiation factor eIF2B in control of cell survival by the PI 3-K/Akt/GSK-3β signaling pathway. IIAR Conference on Apoptosis, Athens, Greece, 2001. 05. 25-28.

Poszterek

Boglári G., Sétáló Gy., **Pap M.**, Nusser N., Szeberényi J. H-ras fehérje szerepe az NGF indukálta korai génexpresszióban. Magyar Genetikai Társaság Kongresszusa, Debrecen, 1994. 12. 8-10.

Pap M., Nusser N., Szeberényi J. The role of Ras proteins in nerve growth factor induced gene expression in PC12 cells. 23rd Meeting of the Federation European Biochemical Societies, Basel, Switzerland. 1995. 08. 13-18.

Pap M., Szeberényi J.: Ras-dependence of gene induction in PC12 cells. 12th Annual Meeting on Oncogenes, Frederick, Maryland, 1996. 06. 18-22.

Pap M., Szeberényi J.: Ras-dependence of gene induction in PC12 cells. International Summer School on Mechanisms in eukaryotic gene regulation (NATO-FEBS-EMBO). Island of Spetsai, Greece, 1996. 09. 02-12.

Pap M., G. M. Cooper. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. 14th Annual Meeting on Oncogenes, La Jolla, California, 1998. 06. 24-27.

Egyéb publikációk

Szeberényi J., Boglári G., Komáromy L., Nusser N., **Pap M**., Sebők Á., Sétáló Gy., Tigyi A.: The way we teach molecular cell biology at the University Medical School of Pécs, Hungary. Med. Teacher 18(3):215-220,1996.

Szeberényi J., Boglári G., Komáromy L., Nusser N., **Pap M**., Sebők Á., Sétáló Gy., Tigyi A.: Problem-oriented teaching of molecular cell biology. Med. Educ. 30(3):232-4,1996.

12. IRODALOM

Angelastro, J.M., Klimaschewski, L., Tang, S., Vitolo, O.V., Weissman, T.A., Donlin, L.T., Shelanski, M.L., Greene, L.A. (2000) Identification of diverse nerve growth factor-regulated genes by serial analysis of gene expression (SAGE) profiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 10424-10429.

Barbacid, M. (1993) Nerve growth factor: a tale of two receptors. *Oncogene* **8**, 2033-2042.

Bijur, G.N., Sarno, P., Jope, R.S. (2000) Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine- and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J. Biol.Chem.* **275**, 7583-7590.

Blom, W.M., deBont, H.J., Meijerman, I., Mulder, G.J., Nagelkerke, J.F. (1999) Prevention of cycloheximide-induced apoptosis in hepatocytes by adenosine and by caspase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1891-1898.

Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D.D., Green, D.R. (1998) Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* **17**, 37-49.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., Greenberg, M.E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868.

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 269-290.

Cai, H., Szeberényi, J., Cooper, G.M. (1990) Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on mitogenic signal transduction in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* **10**, 5314-5323.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J.C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318-1321.

Chan, T.O., Rittenhouse, S.E., Tsichlis, P.N. (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 965-1014.

Crawford, P.A., Sadovsky, Y., Woodson, K., Lee, S.L. and Milbrandt, J. (1995) Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice.

Mol. Cell. Biol. **15**:4331-4336.

Cross, D.A.E., Alessi, D.R., Vandenheede, J.R., McDowell, H.E., Hundal, H.S., and Cohen, P. (1994) The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem. J.* **303**, 21-26.

Cross, D.A.E., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-789.

Crowder, R.J., Freeman, R.S. (2000) Glycogen synthase kinase-3 beta activity is critical for neuronal death caused by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase or Akt but not for death caused by nerve growth factor withdrawal. *J.Biol. Chem.* **275,** 34266-34271.

Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., Marshall, C.J. (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**, 841-852.

Curran, T., and Franza, B.R. (1988) fos and jun: The AP-1 connection. *Cell* **55**:395-397.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241.

Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E. (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* **13**, 2905-2927.

del Peso, L.D., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**, 687-689.

Dennis, P.B., Fumagalli, S., Thomas, G. (1999) Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **9**, 49-54.

Desagher, S. and Martinou, J.-C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **10**, 369-377.

deSouza, S., Lochner, J., Machida, C.M. Matrision, L.M., and Ciment, G. (1995) A novel nerve growth factor-responsive element in the stromelysin-1 (transin) gene that is necessary and sufficient for gene expression in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 9106-9114.

Dominguez, I., Itoh, K., and Sokol, S.Y. (1995) Role of glycogen synthase kinase 3 beta as a negative regulator of dorsoventral axis formation in Xenopus embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 8498-8502.

Downward, J. (1994) The GRB2/Sem-5 adaptor protein. *FEBS Lett.* **338**, 113-117.

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

Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., and Greenberg, M.E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* **275**, 661-665.

Erhardt, P., and Cooper, G.M. (1996) Activation of the CPP32 apoptotic protease by distinct signaling pathways with differential sensitivity to Bcl-x_L. *J. Biol. Chem.* **271**, 17601-17604.

Erhardt, P., Tomaselli, K.J., and Cooper, G.M. (1997) Identification of the MDM2 oncoprotein as a substrate for CPP32-like apoptotic proteases. *J. Biol. Chem.* **272**, 15049-15052.

Feig, L.A., and Cooper, G.M. (1988) Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3235-3243.

Frade, J.M. and Barde, Y.A. (1998) Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioessays* **20**, 137-145.

Friedman, W.J. and Greene, L.A. (1999) Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp. Cell Res.* **253**, 131-142.

Fujita, E., Jinbo, A., Matuzaki, H., Konishi, H., Kikkawa, U., Momoi, T. (1999) Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**, 550-555.

Garrington, T.P. and Johnson, G.L. (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 211-218.

Gashler, A. and Sukhatme, U.P. (1995) Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* **50,** 191-224.

Gil, J., Alcami, J., Esteban, M. (1999) Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4653-4563.

Green, D.R. and Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1326.

Green, D.R. (2000) Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*. **102**, 1-4.

Greenberg, M.E., Greene, L.A., Ziff, E.B. (1985) Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **260**, 14101-14110.

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,** 2424-2428.

Greene, L.A. (1984) The importance of both early and delayed responses in the biological actions of nerve growth factor. *Trends. Neurosci.* **7,** 91-94.

Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 1899-1911.

Hall, A. (1990) The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* **249**, 635-640.

Harwood, A.J., Plyte, S.E., Woodgett, J., Strutt, H., and Kay, R.R. (1995) Glycogen synthase kinase 3 regulates cell fate in Dictyostelium. *Cell* **80**, 139-148.

Hazel, T.G., Nathans, D., and Lau, L.F. (1988) A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 8444-8448.

Hetman, M., Cavanaugh, J.E., Kimelman, D., Xia, Z. (2000) Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J. Neurosci.* **20**, 2567-2574.

Hill, C.S., and Treisman, R. (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanisms and specificity. *Cell* **80**, 199-211.

Hurel, S.J., Rochford, J.J., Borthwick, A.C., Wells, A.M., Vandenheede, J.R., Turnbull, D.M., and Yeaman, S.J. (1996) Insulin action in cultured human myoblasts: contribution of different signalling pathways to regulation of glycogen synthesis. *Biochem. J.* **320**, 871-877.

Johnson, R.S., Spiegelman, B.M. and Papioannou, U. (1992) Pleiotropic effects of a null mutation in the c-*fos* proto-oncogene. *Cell* **71**, 577-586.

Kane, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D., Weiss, A. (1999) Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr. Biol.* **9**, 601-604.

Kaplan, D.R. and Miller, F.D. (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system.

Curr. Opin. Neurobiol. **3**, 381-391.

Karin, M., and Hunter, T. (1995) Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* **5,** 747-757.

Kennedy, S.G., Kandel, E.S., Cross, T.K., Hay, N. (1999) Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5800-5810.

Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L., Burgering, B.M. (1999) Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* **398**, 630-634.

Lee, S.L., Sadovsky, Y., Swirnoft, A.H., Polish, J.A., Goda, P., Gavrilina, G. and Milbrandt, J. (1996) Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* **273,** 1219-1221.

Leonard, D.G., Ziff, E.B., Greene, L.A. (1987) Identification and characterization of mRNAs regulated by nerve growth factor in PC12 cells. *Mol. Cell Biol.* **9**, 3156-3167.

Machida, C.M., Rodland, K.D., Matrisian, L., Magun, B.E., and Ciment, G. (1989) NGF induction of the gene encoding the protease transin accompanies neuronal differentiation in PC12 cells. *Neuron* **2**, 1587-1596.

Madrid, L.V., Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Schottelius, A.J., Baldwin, A.S., Mayo, M.W. (2000) Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1626-1638.

Maggirwar, S.B., Tong, N., Ramirez, S., Gelbard, H.A., Dewhurst, S. (1999) HIV-1 Tat-mediated activation of glycogen synthase kinase-3beta contributes to Tat-mediated neurotoxicity. *J. Neurochem.* **73**, 578-586.

Marshall, C.J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80,** 179-185.

Martin, S.J., Lennon, S.V., Bonham, A.M., Cotter, T.G. (1990) Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J. Immunol.* **145**, 1859-1867.

Matrisian, L.M. (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends in Genet.* **6**,121-125.

McCormick, F. (1993) Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* **363**, 15-16.

McCormick, F. (1994) Raf: the Holy Grail of ras biology? *Trends Cell Biol.* **4**, 347-350.

McMahon, S.B., and Monroe, J.G. (1992) Role of primary response genes in generating cellular responses to growth factors. *FASEB J.* **6**, 2707-2715.

Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 299-306.

Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M., Donner, D.B. (1999) NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**, 82-85.

Pugazhenthi, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K.A., Boxer, L.M., Heasley, L.E., Reusch, J.E. (2000) Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 10761-10766.

Romashkova, J.A., Makarov, S.S. (1999) NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **401**, 86-90.

Saito, Y., Vandenheede, J.R., and Cohen, P. (1994) The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells. *Biochem. J.* **303**, 27-31.

Seger, R., and Krebs, E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. FASEB J. **9**, 726-735.

Siegfried, E., Chou, T.-B., and Perrimon, N. (1992) wingless signaling acts through zeste-white 3, the Drosophila homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate. *Cell* **71**, 1167-1179.

Srivastava, S.P., Kumar, K.U., Kaufman, R.J. (1998) Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 2416-2423.

Stacey, D.W., Roudebush, M., Day, R., Mosser, S.D., Gibbs, J.B., Feig, L.A. (1991) Dominant inhibitory Ras mutants demonstrate the requirement for Ras activity in the action of tyrosine kinase oncogenes. *Oncogene* **12**, 2297-2304.

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,** 5324-5332.

Szeberényi, J., Erhardt, P., Cai, H., and Cooper, G.M. (1992) Role of Ras in signal transduction from the NGF 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.

Szeberényi, J. (1996) Gene activation pathways of nerve growth factor signaling: a minireview. *Neurobiology* **4**, 1-11.

Szeberényi, J. (1998) Normal stimulation of the synthesis, phosphorylation and DNA binding activity of c-Fos and Zif268 proteins by nerve growth factor is not sufficient to mediate neuronal differentiation of PC12 cells. *Mol. Cell Biochem.* **189**, 71-77.

Tang, D., Lahti, J.M., Grenet, J., Kidd, V.J. (1999) Cycloheximide-induced T-cell death is mediated by a Fas-associated death domain-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **274**, 7245-7252.

Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484-487.

Waskiewicz, A.J., and Cooper, J.A. (1995) Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 798-805.

Welsh, G.I., Wilson, C., and Proud, C.G. (1996) GSK3: a SHAGGY frog story. *Trends Cell Biol.* **6**, 274-279.

Welsh, G.I., Miller, C.M., Luoghlin, A.J., Price, N.T., Proud, C.G. (1998) Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Letters* **421**, 125-130.

Wilson, C. (1994) Receptor tyrosine kinase signalling: not so complex after all? *Trends in Cell Biol.* **4**, 409-414.

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

Yao, R., and Cooper, G.M. (1995b) Growth factor-dependent survival of rodent fibroblasts requires phosphatidylinositol 3-kinase but is independent of $pp70^{S6K}$ activity. *Oncogene* **13**, 343-351.

Zhou, X.M., Liu, Y., Payne, G., Lutz, R.J., Chittenden, T. (2000) Growth factors inactivate the cell death promoter BAD by phosphorylation of its BH3 domain on Ser^{155}. *J. Biol. Chem.* **275**, 25046-51.