

PhD értekezés tézisei

**DIFFERENCIÁCIÓS ÉS TÚLÉLÉSI JELÁTVITEL PATKÁNY
PHEOCHROMOCYTOMA SEJTEKBEN**

DR. PAP MARIANNA

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. SZEBERÉNYI JÓZSEF

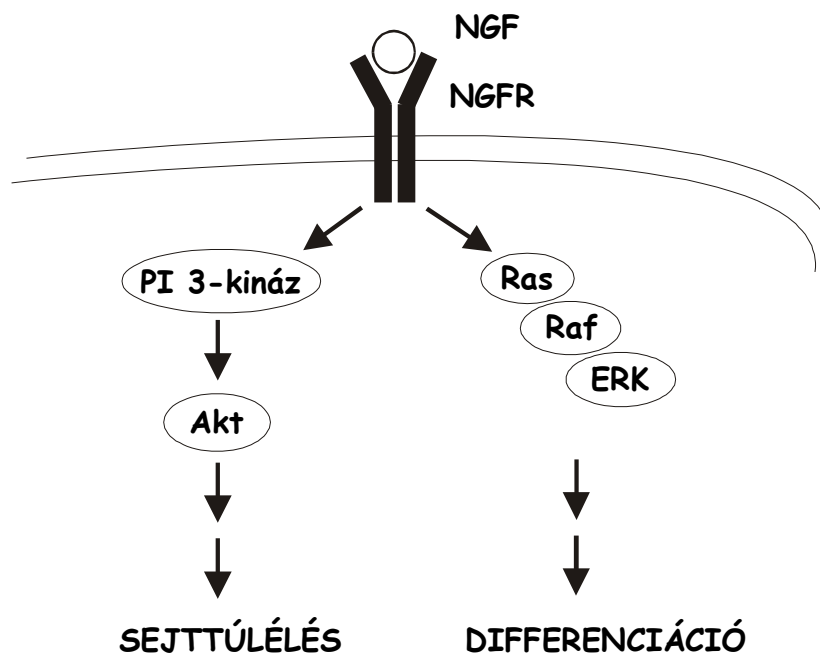
**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ORVOSI BIOLÓGIA INTÉZET**

2001

BEVEZETÉS

A sejtek közötti kommunikáció és a környezeti változásokra bekövetkező válaszadás képessége nélkülözhetetlen a sejt metabolizmus, proliferáció, differenciáció és a sejtűlés szabályozásában. A jelnek a sejtmembrántól a sejtmagig történő továbbításának és a sejtmagban lejátszódó génextpressziós változásoknak a háttérben 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 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 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 sejtűlést közvetítő jelátviteli utat (1. ábra).



1. ábra. Az NGF által kiváltott sejtűlés 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 sejtípusokban (1. ábra). A disszertáció első felében a Ras proto-onkogén fehérje szerepét foglaljuk össze PC12 patkány pheochromocytoma sejtek NGF indukálta neuronális

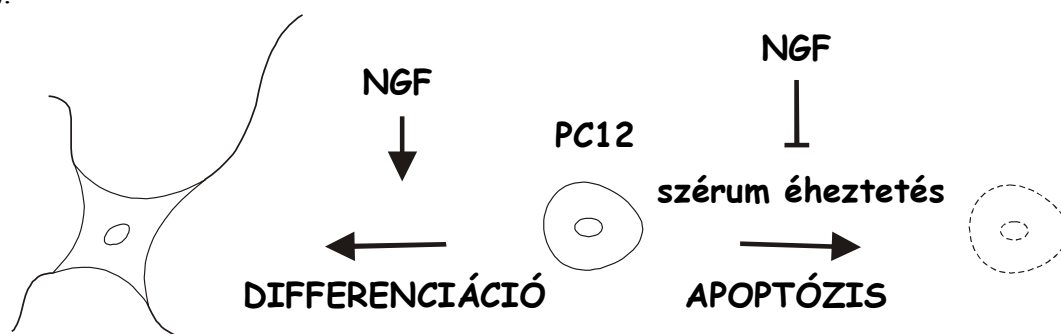
differenciációjában. Munkánkban az NGF és különböző másodlagos messenger analógok hatását vizsgáltuk a korai és késői gének expressziójára.

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 (1. ábra). A disszertáció második részében egy szerin/treonin fehérjekináz, a glikogén szintáz kináz-3 (GSK-3) és szubsztrátjának, az eukariota translációs iniciációs faktor 2B-nek a szerepét vizsgáltuk az apoptózis szabályozásában.

AZ NGF ÁLTAL KIVÁLTOTT NEURONÁLIS DIFFERENCIÁCIÓ JELÁTVITELE

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. Ezen változások háttérében 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 szérumban 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 (2. ábra).



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

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. A kis affinitású NGF receptor (p75^{NTR}) egy katalitikus aktivitással nem rendelkező sejtfelszíni glikoprotein. Szerepe az NGF jelátvitelében nem teljesen tisztázott, valószínűleg a nagy affinitású NGF receptor részét képezi. A proto-onkogén TrkA (p140^{Trk}) a nagy affinitású receptor, a receptor fehérje tirozinkinázok családjába tartozik. Az NGF kötés hatására a TrkA fehérje dimerizálódik majd tirozin aminosavakon autofoszforilálódik, amely kötőhelyeket hoz létre adapter fehérjék (Shc és/vagy a Grb2) számára, melyek a plazma membránhoz transzlokálódva a Ras GTP-kötött

állapotba kerülését idézik elő. A *ras* géncsalád tagjai minden eukarióta sejtben expresszálandó proto-onkogének. Ezek kicsi, 21 kDa molekulásújú, plazmamembránhoz kötött fehérjéket kódolnak. A 3 emlős *ras* gén fehérje terméke a nagy mértékben konzervált Ha-Ras, Ki-Ras és az N-Ras fehérjék. 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. A Raf szerin/treonin kináz a citoplazmából a plazmamembránhoz transzlokálódva komplexet képez az aktivált Ras fehérjével. 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 génextpressziós változásokat indukálnak.

Génextpressziós 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.

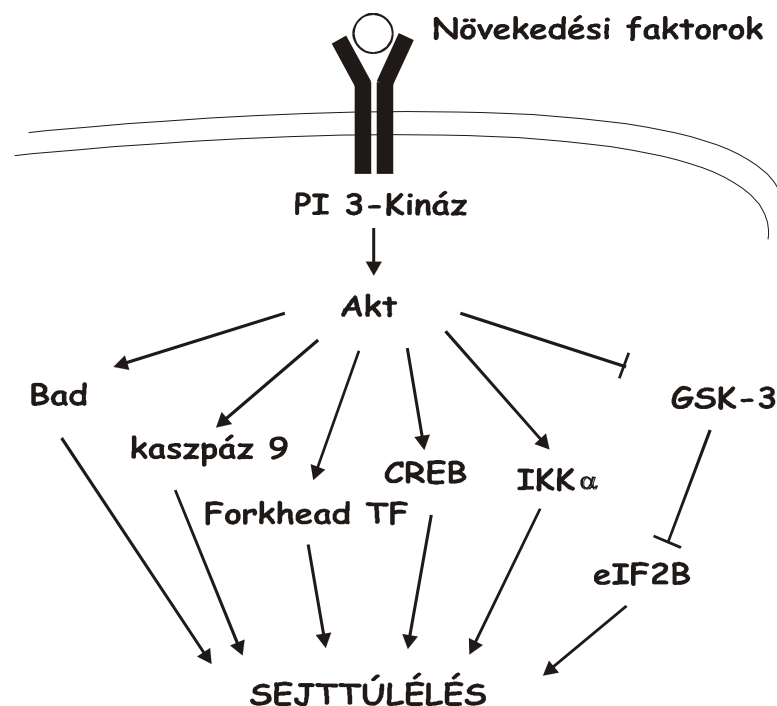
PC12 sejtek NGF kezelése különböző gének aktivációját hozza létre, amelyek két csoportba sorolhatók: korai válasz gének és késői válasz gének. A korai válasz génekre (pl. *c-fos*, *zif268*, *c-jun*, *junB*) jellemző, hogy NGF kezelést követően az aktivációjuk gyors és átmeneti. Aktivációjuk valószínűleg a már meglévő transzkripciós faktorok foszforilációjával történik. Ezen gének géntermékei is gyakran transzkripciós faktorok, amelyek a később aktiválódó késői válasz gének szintézisét közvetítik fehérjeszintézis függő módon. A késői válasz gének (pl. *tranzin*, *SCG10*) által kódolt fehérjék közvetlenül felelősek a növekedési faktorok által közvetített fenotípus változásokért.

A SEJTTÚLÉLÉS JELÁTVITELE

A PI 3-K/Akt jelátviteli út 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 katalitikus (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) P₂] és a foszfatidilinozitol 3,4,5 triszfoszfát [PI (3,4,5) P₃] másodlagos messengerként hatva képesek az Akt PH doménjéhez kapcsolódni, amely 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. Az aktív, foszforilált Akt különböző szubsztrátok foszforilációján keresztül közvetíti a sejt túlélés jelátvitelét. Az Akt

konszenzus foszforilációs szekvencia nagyon sok emlős fehérjében megtalálható, amelyek közül néhányról bizonyított, hogy a PI 3-K/Akt jelátviteli útban a sejt túlélést szabályozza. (3. ábra).



3. ábra. A PI 3-K/Akt sejt túlélést közvetítő jelátviteli út szubsztrátjai.

A glikogén szintáz kináz-3 (GSK-3) szerepe

Az Akt elsőként azonosított fiziológiás szubsztrátja a GSK-3 volt, amelyet inzulin kezelésre a glikogén szintézist szabályozó enzimmént fedeztek fel először. A GSK-3 minden sejtben expresszálódó szerin/treonin fehérjekináz, amelynek emlős sejtekben két izoformája van: az 51 kDa GSK-3 α és a 47 kDa GSK-3 β . 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. A GSK-3-nak szerepe van a sejtthál szabályozásában Dictyosteliumban és a Wnt jelátviteli út komponense, amely jelentős szerepet játszik a *Drosophila* és *Xenopus* fejlődésében. 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.

Az eukariota transzlációs iniciációs faktor 2B (eIF2B) jellemzői

Az eIF2B fehérje 5 alegységből áll. Fiziológiás feladata, hogy a transzláció iniciációja során az eIF2 iniciációs faktor guanin nukleotid kicserélő faktoraként működik. Mivel az eIF2 minden iniciációs folyamathoz szükséges, az eIF2B aktivitásának szabályozása az egész transzláció iniciációját befolyásolja. 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.

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 jelátviteli 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 sejt túlélés szabályozásában. A GSK-3 szubsztrátjai közé tartozik az eIF2B, amely a transláció iniciációjának fontos szabályozó fehérjeje, ezért vizsgáltuk, hogy a fehérjeszintézis szabályozása szerepet játszik-e a sejt túlélésben. Kísérleteinkhez PC12 és Rat-1 patkány fibroblaszt sejteket használtunk, mivel mindkettőben a sejt túlélés szabályozása PI 3-K függő folyamat.

1. Irodalmi adatok alapján ismert a sejt túlélés 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 kaspáz 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 transláció szabályozása szerepet játszik-e a sejt túlélés jelátvitelében. Célul tűztük ki, hogy tanulmányozzuk az eIF2B ϵ alegység GSK-3 általi inaktiváló foszforilációjának hatását a sejt túlélés 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 transláció gátlása okoz-e apoptózist. Kísérleteinket egy ismert fehérjeszintézis gátlószerezrel, 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.

ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtkultúrák

Munkánk során PC12 patkány pheochromocytoma sejteket és Rat-1 patkány fibroblaszt sejteket használtunk. 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.

Northern blot

PC12 szubklónok a kiültetés utáni napon 30 perces ill. 24 órás kombinációs kezelésben részesültek, majd a sejtekből teljes citoplazmatikus RNS-t izoláltunk. Radioaktívan jelölt *c-fos*, *zif268*, *nur77* ill. tranzin próbákkal Northern blot hibridizációt, majd autoradiográfiát végeztünk.

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.

GSK-3 kináz aktivitásának meghatározása

PC12 sejtek a kiültetés utáni napon 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 foszfoglükogén szintáz peptidet használtunk. A beépült radioaktivitást folyadék szcintillációs számlálóval határoztuk meg.

Tranziens transzfekció

PC12 ill. Rat-1 sejteket poli-L-lizinnel kezelt fedőlemezre ültettünk ki 24 órával a transzfekció előtt. A tranziens transzfekciókhoz Lipofectamine reagenst 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.

Pontmutáció létrehozása irányított mutagenezissel

A patkány eIF2Bε alegységének irányított mutagenezisét a QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit-el végeztük el, a gyártó cég leírása alapján. Az 535-ös pozícióban levő szerint (amely a GSK-3 foszforilációs hely a patkány eIF2Bε alegységének szekvenciájában) cseréltük alaninra. A pontmutáció ellenőrzése szekvenálással történt.

Sejtek szortírozása áramlási citométerrel

PC12 sejteket 100 mm-es lemezre ültettünk ki a transzfekeciót megelőző napon. A tranziens transzfekeciókat 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 transzfekeció után 1 ill. 2 nappal a sejteket tripszinezttük, majd zöld fluoreszcenciájuk alapján áramlási citométerrel szortíroztuk. A legintenzívebben zölden fluoreszkáló sejteket kiültettük és másnap LY294002-vel kezeltük, majd ³⁵S-metionin jelölést követően fehérjesszintézisük aktivitását TCA precipitációval határoztuk meg.

Fehérjesszintézis vizsgálata

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

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 anticitokróm c antitesttel immunhisztokémiát végeztünk. A második antitest CY3-konjugált anti-egeér IgG volt. A kontroll sejtekre a lokalizált fonalszerű festődés volt jellemző, míg a mitokondriumból kiáramlott citokróm c hatására homogén, diffúz festődést figyeltünk meg.

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, de a sejtek NGF és dibutiril-cAMP (dbcAMP) vagy NGF és a Ca⁺⁺ ionofor ionomicin kombinációs kezelése részleges differenciációs választ idéz elő.

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

Kísérleteinkben korai válasz gének (*c-fos*, *zif268* és a *nur77*) 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. A *zif268* gén terméke egy cinkujj transzkripciós faktor, míg a *nur77* gén egy szteroid receptor családba tartozó fehérjét kódol. 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. A *c-fos* és a *zif268* 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 *zif268* 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 *nur77* gén expressziója dbcAMP és TPA hatására jobban indukálódott, mint NGF stimulációra mindhárom sejtvonalban, amelynek hatására az NGF+dbcAMP vagy NGF+TPA kombinációs kezelés a *nur77* erős indukcióját eredményezte a magas expressziójú M-M17-26 sejtekben is. A kalcium 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 kezelésekre hatására. Az AP-1 és Zif268 kötőhelyek 1 órás NGF stimuláció hatására maximális aktivitást mutattak, az AP-1 kötés még legalább 6 óráig magas maradt, míg a Zif268 kötés 4 órás NGF stimuláció után az alap szintre csökkent vissza. Az AP-1 és Zif268 kötetést 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 vizsgálatl kapott eredményeink a Northern blot vizsgálatl 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 tudunk 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. A tranzin gén NGF indukciója erősen Ras-függő, 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 vagy a proteinkináz C 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 alapján 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 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. 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. A sejteket tranziensen transzfektáltuk egy zöld fluoreszcens fehérjét expresszáló plazmiddal (GFP) és kotranszfektáltunk vad-típusú GSK-3 vagy domináns negatív R85 GSK-3 β 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. A kontrol sejteknek (amelyeket vagy csak az üres vektor plazmiddal vagy a domináns negatív GSK-3 β plazmiddal transzfektáltunk) kb. 20%-a volt apoptotikus mind a PC12, mind a Rat-1 sejtekben. Ezzel ellentétben, mindkét sejtvonal esetén a sejtek 60-70%-a apoptotizált a vad-típusú GSK-3 β transzfekciója következtében. 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-3 β overexpressziója elegendő az apoptózis indukciójához. Következő kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a GSK-3 β által előidézett apoptózis gátolható-e az apoptózis ismert gátló szereivel. Domináns negatív p53 kotranszfekciójával kivédhető a GSK-3 β által előidézett apoptózis, amely alátámasztja a p53 szerepét a PI 3-K gátlás

következtében indukálódó apoptózisban mind PC12 mind Rat-1 sejtekben. A GSK-3 által indukált apoptózis ugyancsak blokkolható a CPP32 kaszpáz peptid-inhibitorával. A CPP32 (kaspáz 3) egy effektor kaszpáz, amely különböző apoptotikus stimulusokra aktiválódik, köztük a PI 3-K gátlás hatására. 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.

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 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. 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. 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 eIF2Bε alegységének GSK-3 általi foszforilációja a fehérje inaktivációját és ezzel együtt a fehérjeszintézis gátlását okozza. Az inaktív foszforiláció sejt túlélésben játszott szerepének tisztázására a GSK-3 által foszforilált 535-ös pozícióban 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 sejt vonalban. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az eIF2B foszforilációja a GSK-3 által indukált apoptózisban szerepet játszik. Hogy tovább tanulmányozzuk az eIF2B szerepét a sejt túlélésben, 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. Ugyanezt az eredményt kaptuk, amikor a PI 3-K gátlását domináns negatív mutáns PI 3-K transzfekciójával végeztük. 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. 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 translációra PI 3-K gátlást követően.

A PI 3-K gátlása a transláció csökkenését eredményezi. A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a mutáns eIF2B-t overexpresszáló sejtekben a transláció gátlása kivédhető-e. PC12 sejteket zöld fluoreszcens fehérjét expresszáló plazmiddal és kontroll,

vad-típusú ill. mutáns eIF2B-t expresszázó plazmidokkal kotranszfektáltunk. A transzfektált sejtek közül a legintenzívebben zölden fluoreszkáló sejteket áramlási citométerrel válogattuk ki, 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. 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. A mutáns S535A eIF2B overexpressziója nem véd a cikloheximid indukálta apoptózistól, 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. 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.

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

A PI 3-K/Akt jelátviteli út aktiválása gátolja a mitokondriális citokróm *c* kiáramlást. Mivel a mutáns S535-eIF2B fehérjét expresszázó 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 expresszázó plazmidokkal való transzfektációja 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. Kísérleteinkből levonható következtetés, hogy az eIF2B foszforilációja és az ennek következtében kialakuló transzláció gátlása okozza a citokróm *c* kiáramlását a mitokondriumból és apoptózist indukál.

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 létrejöhét a *c-fos*, *zif268* és a tranzin gén között, mivel a tranzin promoter tartalmaz AP-1 és a Zif268 fehérje kötőhelyeket. 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*, *zif268*, és *nur77* expressziója hatékonyan indukálható olyan hatásokkal, amelyek a tranzin gén transzkripcióját nem fokozzák (pl. EGF, TPA). 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*, *zif268* és *nur77* 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. Ezen irodalmi adatok és saját kísérleti eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a *c-fos*, *zif268*, és *nur77* 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 sejt vonal is, viszont ebben a sejt vonalban 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 jelátviteli 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 sejt vonalban. 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 indukációjához, 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-3 β proapoptotikus hatását neuroblasztoma sejt vonalban is kimutatták és a GSK-3 β aktivitása szükséges szimpatikus neuronok apoptózisához, melyet PI 3-K vagy Akt gátlással idéznek elő. A GSK-3 β -nek szerepe van kortikális neuronok apoptózisában, amelyet növekedési faktorok megvonásával

vagy PI 3-K gátlásával idéztek elő. Kimutatták, hogy a neuronokban aktiválódó GSK-3 β hozzájárul a HIV-1 Tat fehérjéje által indukált neuronális apoptózishoz.

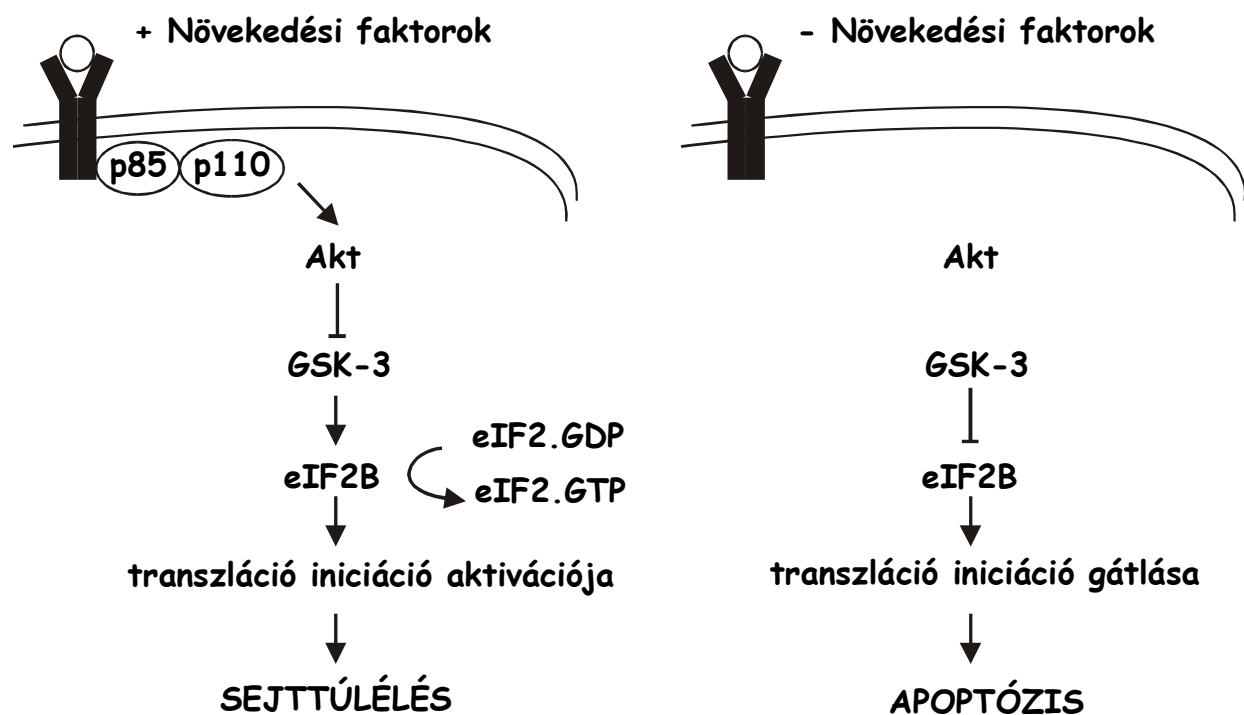
Az eIF2B szerepe a túlélésben.

A GSK-3 β 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 sejt túlélését közvetítő útban szerepel. Növekedési faktor-függő sejtek szérumból 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. Egyéb sejt típusokhoz hasonlóan (humán promielocitás leukémia HL-60 sejt vonal, humán T-sejt vonalak, patkány hepatocita) a cikloheximid PC12 és Rat-1 sejtekben is apoptózist indukál, ami a transzláció sejt túlélésben 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 komplexet képezve további kaszpázok aktivációját indítja el, amely különböző szubsztrátok hasításával apoptózishoz vezet. A PI 3-K/Akt jelátviteli út aktivációja gátolja a citokróm *c* kiáramlását és így a sejt túlélését biztosítja. 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. 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.

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 tudunk tranzin gén indukciót kiváltani. Feltételezhető, hogy a tranzin gén expressziója nem szükséges a neuritképződéshez.

Kísérleteink alapján a PI 3-K/Akt/GSK-3/eIF2B sejt túlélést közvetítő jelátviteli út szabályozása a következőképpen foglalható össze (4. ábra). Növekedési faktorok jelenlétében a PI 3-K/Akt út aktiválódik, az aktív Akt foszforilálja a GSK-3-t, amelynek következtében a fehérje inaktívul. Az inaktív GSK-3 nem foszforilálja szubsztrátjait, így az eIF2B fehérje működése megtartott, a transláció zavartalan. Növekedési faktorok hiányában, ill. a PI 3-K gátlása esetén a GSK-3 aktív, így foszforilálja és inaktíválja az eIF2B fehérjét. A transláció 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 kaskád folyamatot.



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

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 elküldve)

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.

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 translációs iniciációs faktor szerepe a PI 3-K/Akt/GSK-3 jelátviteli út szabályozásában. IX. Sejt- és fejlődésbiológiai Napok, Debrecen, 2001. 01. 21-24.

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.