

PhD értekezés tézisei

**Stressz-aktivált jelátviteli utak szerepe és szabályozása PC12
patkány phaeochromocytoma sejtekben**

Törőcsik Beáta

Témavezető: Szeberényi József

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Biológiai Intézet**

Pécs, 2000

Tudományos háttér

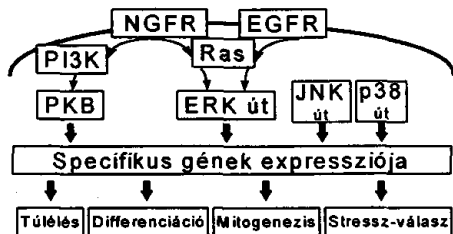
Az eukarióta sejtek normális fejlődésük és túlélésük érdekében számos külső ingerre válaszolnak. Egyes ingerek kiválthatnak sejtosztódást, növekedést, mások differenciációt vagy apoptózist. A válaszok háttérében gyakran génexpressziós változások állnak, a jel eljutása a membrántól a sejtmagig és a sejtmagban történő folyamatok vizsgálata az elmúlt negyed század sejtbiológiájának egyik legfontosabb eseménye volt, bár a részletek ma sem teljesen tisztázottak. A normális sejt jelátvitelének felderítése nem csak azt segít megérteni, hogyan válaszolnak a sejtek extracelluláris jelekre, de információt nyújthat arról is, milyen molekuláris biológiai elváltozások állnak bizonyos betegségek háttérében. A leggyakrabban alkalmazott leírás a jelátviteli utakat biokémiai események kaszkádjainak mutatja be, amelyek hasonló szerkezetűek de eltérő funkciójúak, egymással párhuzamosan futnak, kapcsolódnak, konvergálnak és divergálnak. Az utakat gyakran egyik központi enzimükről, a mitogén-aktiválta protein kináz (MAPK) család egyik tagjáról nevezik el. A sejtet érő stresszválasz által aktivált jelátviteli utak közé tartozik a stressz-aktiválta protein kináz (SAPK)/c-Jun N terminális kináz (JNK) út és a p38 MAPK út. Munkánk során ezeknek a stressz-aktiválta utaknak a szerepét vizsgáltuk, kísérleteinket PC12 sejtvonalon és ezen sejtvonal szubklónjain végeztük.

A PC12 sejtek jelátvitel

A neurotrof hormonok, mint például az idegsejt növekedési faktor (NGF), számos hatást fejtenek célsejtjeiken, mint proliferáció, differenciáció, neurit növekedés, plaszticitás, repair, túlélés. A legtöbb NGF-re válaszoló sejtvonal NGF hiányában nem marad életben, így nem alkalmas a faktor adása előtti és az adás utáni jelátviteli mechanizmusok összehasonlítására. A patkány phaeochromocytomából nyert PC12 sejtvonal NGF hiányában is osztódik, széles körben használt a neuronális differenciáció, proliferáció és apoptózis molekuláris mechanizmusának vizsgálatára. A naiv, kezelésben nem részesült PC12 sejtek kromaffin jellegűek: kis méretű, kerek vagy poligonális, nyúlvány nélküli sejtek. NGF kezelést követően néhány óra múlva neuritokat kezdenek növeszteni és pár nap alatt teljesen differenciált, szimpatikus jellegű neuronokká alakulnak át.

Míg a PC12 sejtek életben maradásukhoz nem igényelnek neurotrofinokat, a széruméheztetés hatására bekövetkező apoptózis kivédhető NGF-el. A PC12 sejtvonal tehát kitűnő modell rendszert szolgáltat mind a differenciációs, mind a túlélési szignál transzdukció tanulmányozására.

Az NGF hatását két sejt felszíni receptoron keresztül fejti ki, ezek a nagy affinitású (NGFR/TrkA) és a kis affinitású NGF receptor (p75^{NGFR}). Az NGF nagy affinitású receptora az NGF kötődését követően autofoszforilálódik és a foszforilált tirozinok adapter molekulákat vonzanak magukhoz. Rajtuk keresztül számos párhuzamos, de egymással és más faktorok által aktivált jelátviteli utakkal több helyen kapcsolódó szignalizációs kaszkád indul el a sejt belseje felé. Az aktivált fehérjék közé tartozik az NGF antiapoptotikus útjában szerepet játszó foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K), és a neuronális differenciációban központi szerepet játszó Ras (1. ábra).



1. ábra: Növekedési faktor- és stressz-jelátvitel PC12 sejtekben

Mitogén-aktivált protein kináz kaszkádok

Az elsőként leírt és jellemzett Ras/Raf/MEK/ERK út mellett az utóbbi időben több, hasonló felépítésű jelátviteli kaszkádot találtak. Ilyenek a MEKK/SEK/JNK és az MKK/p38 utak, melyek elsősorban a sejtet érő stressz hatásokra adott válaszáért felelősek. Az ERK, JNK és p38 egy jelátvitelben központi szerepet játszó kináz család, a mitogén aktiválta protein kinázok (MAPK) tagjai (2. ábra).

Stimulus	Növekedési faktorok	Sejtet érő stressz, gyulladású citokinek	???	Szérum, stressz
↓ MAPKKK	↓ Mos Raf TPL2	↓ TPL2 MEKK MLK/DLK ASK	↓ TAK	↓ ???
↓ MAPKK	↓ MEK1/2	↓ MKK 4/7	↓ MKK 3/6	↓ ???
↓ MAPK	↓ ERK 1/2	↓ JNK	↓ p38 MAPK	↓ ERK 3
↓	↓	↓	↓	↓ ERK 5
Válasz	Proliferáció Differenciáció Fejlődés	Gyulladás Apoptózis Fejlődés	???	

2. ábra: MAPK-kaszádok és biológiai jelentőségük

A JNK- és p38 út szerepe a PC12 sejtek szabályozásában még nem pontosan ismert. Bár az NGF aktiválja ezeket az enzimeket, az NGF visszavonása szintén elnyújtott aktivációjukhoz vezet. Ezek alapján mind a differenciációban, mind az apoptózisban valószínűsíthetjük a stressz aktiválta utak szerepét.

A stressz-aktivált jelátviteli utak PC12 sejtekben történő vizsgálatára a fehérjeszintézis gátló anizomicint alkalmaztuk.

Anizomicin

Az anizomicin az eukarióta transzlációt gátló szer, de fehérjeszintézist még nem gátló, nem toxikus koncentrációjában is képes jelátviteli folyamatok serkentésére: aktiválja mind a JNK, mind a p38 utat. A szer szignáltranszdukciós hatásainak elemzése tehát alkalmasnak látszik a stressz-utak biológiai jelentőségének tanulmányozására.



Célkitűzések

Mind a neuronális differenciáció, mind az apoptózis alapvető celluláris jelenségek az idegrendszer fejlődésében. A háttérükben álló molekuláris jelenségek megértése közelebb visz bennünket a hibás mechanizmusok felismeréséhez, új diagnosztikus és terápiás lehetőségeket nyújthat az idegrendszert érintő betegségekben, mint a Parkinson kór vagy az Alzheimer betegség. Kísérleteink célja az volt, hogy feltérképezzük a PC12 sejtekben stresszhelyzetben fellépő jelátviteli folyamatokat.

1. Kísérleteink segítségével megpróbáltuk azonosítani az alacsony koncentrációjú, fehérjeszintézist nem gátló anizomicin-kezelés által aktivált jelátviteli utakat PC12 sejtekben. Részletesen vizsgáltuk az anizomicin MAPK kaszkádokra és a kináz kaszkádokon keresztüli korai és késői génindukcióra kifejtett hatását.
2. Anizomicin segítségével tanulmányoztuk a stressz aktiválta kinázok biológiai szerepét a neuronális differenciációban.
3. A stressz aktiválta kinázok számos, PC12 sejtben apoptózist okozó ágens hatására aktiválódnak, az aktiváció gátlása antiapoptotikus hatású. Kísérleteinkben vizsgáltuk a fehérjeszintézist nem gátló, de stressz utakat aktiváló anizomicin hatását az apoptózisra.
4. A fehérjeszintézis gátlók apoptózisban játszott szerepe ellentmondásos. Célul tűztük ki az anizomicinen keresztül a PC12 sejtek apoptózisa és a fehérjeszintézis gátlása közti kapcsolat tisztázását, azon jelátviteli fehérjék azonosítását, melyek expressziójának vagy működésének csökkenése felelős lehet az apoptózis kiváltásáért.

Alkalmazott anyagok és módszerek

Sejtkultúrák

Munkánk során a jelátviteli folyamatok egyik, már klasszikusnak számító sejtvonalát, a PC12 sejtvonalat használtuk. Az M-M17-26 sejtvonal olyan PC12 szubklón, ami domináns negatív mutáns Ras fehérjét expresszál. Ezekben a

sejtekben a normális Ras fehérje működése gátolt. A PC12 *nnr5* sejtvonal az NGF receptorok közül csak a kis affinitásút expresszálja.

A neuronális differenciáció vizsgálata

A neuronális differenciáció kritériumának azt tekintettük, ha a kiültetésekor differenciálatlan, kerekded PC12 sejtek a sejtátmérőjüket meghaladó hosszúságú neuritokat növesztettek.

A fehérjeszintézis vizsgálata [³H]leucin beépülés mérésével

A sejteket 16 órán keresztül kezeltük alacsony (10 ng/ml) illetve magas (1000 ng/ml) koncentrációjú anizomicinnel. Ezt követte a 3 órás [³H]leucin jelölés, amely szérummentes médiumhoz adott radioaktívan jelzett leucinnal történt. A [³H]leucin beépülést triklórecetsavas filter precipitációval igazoltuk.

DNS fragmentáció vizsgálata

Apoptózis tesztként az internukleoszomális DNS darabolódás kimutatását alkalmaztuk. A fragmentumok szétválasztását 1.8%-os agaróz gélelektroforézissel végeztük. A láthatóvá tétel kétféle módon történt: vagy etidium bromiddal festettük a gél, vagy átblotoltuk, és a membránon kötődött DNS fragmentumokat radioaktívan jelölt *EcoRI*-el emésztett teljes DNS-el hibridizáltuk. A hibridizációt Cyclone Phosphor Imagerrel detektáltuk.

Northern blot analízis

A teljes citoplazmatikus RNS izolálása, az elektroforézis formaldehidet tartalmazó agaróz gélben, és a hibridizáció ³²P-jelölt próbával történt. Az alkalmazott próbák korai válasz génekre a *c-fos*, *c-jun*, *zif268*, késői válasz génre a *tranzin* voltak.

Western blot analízis

A fehérje extraktumok izolálása az antitesteket gyártó cég leírása alapján történt (New England Biolabs, USA). Az SDS poliakrilamid gélelektroforézis követően a fehérjéket ECL membránra blotoltuk át. Ezen a membránon történt

az első és második antitest kötődése. Az immunkomplexeket kemilumineszcenciás detektáló kit és röntgenfilm-expozíció segítségével azonosítottuk.

Elektroforetikus mobility shift analízis

A fehérje-DNS komplexeket nem denaturáló poliakrilamid gélen választottuk el a nem kötődött oligonukleotidoktól. A gélt megszáritottuk és a fehérje-oligonukleotid komplexeket Cyclone Phosphor Imagerrel detektáltuk.

JNK immunkomplex kináz analízis

A sejtizátumokból a JNK-t JNK ellenes antitesttel és ProteinA-Sepharose gyöngyökkel immunprecipitáltuk. A kináz aktivitás mérése GST-c-Jun (1-79) fúziós fehérje szubsztráttal és $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -vel történt. A reakcióelegyetek 10%-os SDS poliakrilamid gélen választottuk szét és Cyclone Phosphor Imagerrel analizáltuk.

Akt kináz analízis

Az Akt fehérje aktivitásának mérését Akt kináz kit (New England Biolabs, USA) segítségével végeztük. A sejtextraktumokból agaróz gyöngyökhöz kötött anti-Akt antitesttel immunprecipitáltuk az Akt kinázt. A kináz aktivitás meghatározására GSK-3 szubsztrátot használtunk. A foszforiláció kimutatására foszforilált GSK-3 fehérje ellenes antitesttel Western blotot végeztünk.

Eredmények

A JNK- és a p38-út szerepe a neuronális differenciációban és génexpresszióban

Kísérleteink első részében fehérjeszintézis gátló koncentráció alatti (szubinhibitoros), a sejtekre nem toxikus koncentrációban (1-10 ng/ml) alkalmaztuk az anizomicint. Anizomicin kezeléssel gátolni tudtuk az NGF által kiváltott neuronális differenciációt és a differenciáció folyamatával közvetlen kapcsolatban álló késői génindukciót. Ez arra utal, hogy a stressz-aktivált kináz kaskád serkentése gátolja a neuronális differenciációt, hatása ellentétes az

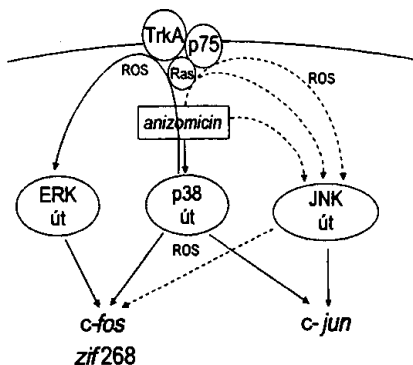
ERK út aktivációjával. Ugyanakkor az anizomicin-kezelés is indukálta az NGF által aktivált korai válasz géneket, sőt, még szinergizmust is mutatott az NGF-fel, ami alátámasztja azt a megfigyelést, hogy a korai gének aktivációja nem elegendő a differenciáció létrehozásához. Megvizsgálva a korai válasz gének indukciójának Ras-függését, azt találtuk, hogy az anizomicin a domináns negatív Ras fehérjét expresszáló M-M17-26 szubklónban változatlanul indukálja a *c-jun*-t, míg a *c-fos* és a *zif268* indukciója részleges gátlást mutatott. Így, szemben az NGF jelátvitelével, melyben a korai válasz gének indukciója Ras-függő, az anizomicin jelátvitelében egy Ras-függő és egy Ras-független komponenst is megkülönböztethetünk. Megvizsgálva ezen korai válasz gének promoterét, a *c-jun* csak AP-1 helyet tartalmaz, míg a *c-fos* és a *zif268* promotere az AP-1 hely mellett más enhancer-elemeket is tartalmaz. Ezek alapján az AP-1 hely tűnik a Ras-független jelátviteli út célpontjának, míg az összetettebb *c-fos* és *zif268* promoterek enhancerei a Ras-függő út célpontjainak.

Kísérleteinkben a szabadgyökök képződését gátló N-acetil-cisztein (NAC) az anizomicin Ras-függő és Ras-független jelátviteli útját is gátolta, tehát a szabadgyököknek szerepe van az anizomicin jelátviteli hatásainak közvetítésében. Az NAC nem befolyásolja a tetradekanoil forbol acetát (TPA) génindukciós hatását, ami igazolja, hogy az NAC okozta gátlás nem esetleges toxikus, nem-specifikus hatásának köszönhető.

A p38 kináz specifikus gátlószere, az SB203580 gátolja az anizomicin okozta korai génindukciót, ami a p38 kináz központi szerepére utal az anizomicin jelátvitelében.

Az anizomicin fehérjekináz kaszkádokra kifejtett hatását a megfelelő MAPK-ok foszforilált formája ellenes antitesttel végzett Western blot vizsgálatokkal igazoltuk. A JNK aktivációját emellett *in vitro* kináz reakcióval is vizsgáltuk. Az anizomicin aktiválja a JNK-t, az ERK-et, és a p38 kinázt PC12 sejtekben. A JNK aktivációja az M-M17-26 és *nnr5* sejtvonalon is bekövetkezik, míg az ERK aktivációja ezekben a sejtekben gátolt, ami a JNK aktivációhoz kapcsolt *c-jun*, és az ERK aktivációhoz kapcsolt *c-fos* és *zif268* indukció feltevését támasztja alá. NAC előkezelés gátolja az anizomicin okozta JNK és ERK aktivációt, a szabadgyököknek tehát az anizomicin kináz kaszkádokra

kifejtett hatásában is szerepe van. A p38 gátló SB203580 gyengíti az anizomicin ERK aktiváló hatását, míg az NGF okozta ERK aktivációt nem befolyásolja. Ezek szerint az anizomicin jelátvitelében a p38 kináz aktivációja megelőzi az ERK stimulációt. Az anizomicin eddig ismertetett jelátviteli célpontjait a 3. ábra foglalja össze.



3. ábra: Az anizomicin jelátviteli célpontjai. (A folytonos nyilak kísérletileg alátámasztott, a szaggatott nyilak pedig hipotetikus kapcsolatokat mutatnak. ROS, reaktív oxigén származékok.)

Szubinhibitoros és a fehérjeszintézist gátló koncentrációjú anizomicin jelátviteli hatásainak összehasonlítása

A stressz-aktivált utak vizsgálatára - a szakirodalom tanúsága szerint - általában nagy, a fehérjeszintézist gátló anizomicin-koncentrációt használnak. A specifikus, szignál transzdukciós, illetve nem-specifikus, toxikus hatások megkülönböztetésére [³H]leucin beépülés vizsgálatával kiválasztottunk egy fehérjeszintézist biztosan nem gátló (10 ng/ml) és egy fehérjeszintézist gátló (1 µg/ml) anizomicin koncentrációt.

A magas koncentrációjú anizomicin gátolja a sejtproliferációt, sejtpusztulást okoz, míg az alacsony koncentrációjú anizomicin biológiai hatása az NGF-okozta neuronális differenciáció gátlása, toxikus mellékhatások nélkül. A magas koncentrációjú anizomicin által kiváltott sejtpusztulás apoptózissal történik. Az eltérő biológiai hatás hátterében az első megközelítés során nem találtunk eltérő jelátviteli utakat: a két különböző koncentráció ugyanazokat a fehérjekinázokat (JNK, ERK, p38) aktiválja, CREB foszforilációt okoz, és korai

válasz géneket (*zif268*, *c-fos*, *c-jun*) indukál, egyforma kinetikával és mértékben. A JNK kivételével ezek a jelátviteli utak p38 függő úton keresztül aktiválódnak. Bár az apoptotikus hatások számos esetben járnak JNK aktivációval, és az aktiváció gátlása antiapoptotikus hatású, az anizomicin esetében ez nem tűnik elegendőnek. Feltételeztük, hogy az apoptotikus hatást nem - vagy nem csak - a MAPK-utak serkentése, hanem a magas koncentrációjú anizomicin fehérjeszintézist gátló hatása okozza.

Mivel az ERK, JNK és p38 utat a kis és nagy anizomicin koncentráció azonos módon befolyásolja, a túlélésben alapvető jelentőségű PI3K út egyes elemeit is megvizsgáltuk. Rövid idejű (5 perc) NGF kezelés hatására PC12 sejtekben megemelkedik a foszfo-Akt szintje. Ez az emelkedés rövid idejű, nagy koncentrációjú anizomicin kezeléssel gátolható. Ugyanakkor a kis koncentrációjú anizomicin Akt foszforilációhoz és aktivációhoz vezet.

Olyan fehérjéket kerestünk, amelyek szintézisének gátlása felelőssé tehető a proapoptotikus hatásért. Hosszú távú (24 órás) kezelés hatására az ERK, JNK, p38, PKB expressziójában nem találtunk változást. A toxikus anizomicin kezelés tehát nem ezeknek az enzimeknek az "eltüntetésével" idéz elő sejthalált. Ezzel szemben az apoptózis kivédéséért felelős Bcl-2 fehérje mennyisége alacsony koncentrációjú anizomicin kezelésre 4 óra után megemelkedik, és még 12 óra után is megtalálható a sejtekben. Ez az emelkedés magas koncentrációjú anizomicin kezelésre teljesen elmarad. Feltételezzük, hogy a Bcl-2 antiapoptotikus hatásának kiesése szerepet játszik az anizomicin apoptózist indukáló hatásában.

Az Akt hatás lehetséges közvetítője az NF κ B is: az Akt aktivációjának hatására az NF κ B a sejtmagba transzlokálódik, DNS-hez kötődik és túlélést elősegítő géneket indukál. Mobility shift analízis segítségével ezért megvizsgáltuk az alacsony, illetve magas koncentrációjú anizomicin kezelés hatását a transzkripció faktorok kötődésére. Az NF κ B kötődés 12 óra után csökken, 24 óra után teljesen eltűnik magas koncentrációjú anizomicin kezelésre, alacsony koncentrációjú anizomicin kezelésre nem mutat lényeges változást. Az NF κ B és a Bcl-2 két egymástól eltérő, az apoptózisban résztvevő

út szereplője, ami valószínűsíti, hogy az anizomicin apoptotikus hatását több támadásponton is kifejti.

Megvizsgáltuk azt is, milyen jelátviteli utak aktiválása védi ki a nagy koncentrációjú anizomicin okozta apoptózist. A növekedési faktorok (NGF, FGF, EGF) hatástalanok, tehát az ERK illetve a PI3K út aktivációja nem elégséges az antiapoptotikus hatáshoz. Ugyanígy nem okoz gátlást a p38 gátló SB203580. Ugyanakkor a cAMP részleges védelmet nyújt, tehát a PKA-n keresztüli jelátviteli út aktivációja részben kivédi a magas koncentrációjú anizomicin apoptotikus hatását. Az anizomicinnel együtt adott cAMP kivédi az NF κ B kötődés csökkenését és a Bad foszforiláció gátlását is.

Következtetések

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

1. A fehérjeszintézist nem gátló koncentrációjú anizomicin kezelés PC12 sejtekben több szignál transzdukciós kaszkádot (JNK út, p38 út, ERK út) aktivál. Az anizomicin alacsony koncentrációja kísérleteinkben önmagában nem okozott morfológiai változást, a sejtek változatlanul proliferáltak. Az ERK út elsődleges szerepe az irodalom szerint a proliferáció, neuronális differenciáció jelátviteli útjainak aktiválásában van. Kísérleteink alapján az anizomicin okoz ERK aktivációt, amelyhez szükséges a TrkA és a Ras fehérje jelenléte. Ez az ERK aktiváció kísérleti körülményeink között nem okozott neuronális differenciációt, de ez az ERK aktiváció nem elnyújtott, és vele párhuzamosan stressz utak is aktiválódnak. Saját kísérleteink ellene szólnak azoknak a korábbi irodalmi eredményeknek, hogy a JNK vagy p38 út jelentős szerepet játszana a neuronális differenciáció jelátvitelében, aktivációjuk éppenséggel gátolhatja az NGF által indukált neuritnövekedést. Az ellentmondó eredmények oka a kísérleti rendszerek különbözőségében lehet: az említett kísérletekben overexpressziós rendszereket használtak, amelyek gyakran váltanak ki a fiziológiától eltérő hatásokat. Feltételezésünk szerint az anizomicin-indukálta stressz-aktivált

kaszkádok (p38 út, JNK út) együttes aktivációja az NGF-indukálta neuronális differenciáció gátlásához vezet.

2. Az anizomicin által aktivált MAPK-ok, a JNK, ERK, és p38 út közül legfontosabb és direkt célpontnak a p38 út tűnik. Ez az út anizomicin hatására Ras-tól függetlenül indukálódik, és nélkülözhetetlen a korai válasz gének indukciójához. A JNK utat az anizomicin szintén direkt módon aktiválja, de serkentése önmagában nem elegendő a korai gének (*c-jun*, *c-fos*, *zif268*) indukciójához. Az ERK aktivációja kísérleteink alapján sokkal proximálisabban kezdődik: az ERK, *c-fos*, *zif268* indukcióhoz szükséges a Ras fehérje normális működése és a TrkA receptor jelenléte. Ugyanakkor, meglepő módon, az anizomicin hatására bekövetkező ERK aktivációt a p38 kináz aktivációja előzi meg, a kaszkádok között "párbeszéd" folyik.

3. Az anizomicin különböző utakat használ a korai gének indukciójára. Az anizomicin a vizsgált korai gének (*c-jun*, *c-fos*, *zif268*, *junB*) kissé elhúzódozó indukcióját váltja ki. NGF-el kombinálva annak korai génindukciós hatását fokozza és tartósabbá teszi. Az NGF-el szemben (ami a domináns negatív Ras fehérjét expresszáló M-M17-26 szubklónban nem okoz korai génindukciót, azaz Ras-függő módon aktiválja ezeket a géneket) az anizomicin génaktivációs hatása differenciáltan érvényesül: a *c-junt* direkt támadásponttal, Ras-független úton aktiválja, míg a *c-fos* és a *zif268* indukciója részben a Ras/ERK-út közvetítésével történik. Ehhez szükséges a nagy affinitású receptor jelenléte, de nem szükséges annak aktivációja. A korai gének nem állnak közvetlen kapcsolatban az NGF okozta biológiai hatással, de mint transzkripció faktorok szerepet játszhatnak késői gének indukálásában. Az anizomicin által stimulált stressz-aktivált kaszkádok (p38 út, JNK út) gátolják a differenciációval közvetlen kapcsolatban álló tranzsin gén indukciót. A gátlás molekuláris mechanizmusát jelenleg nem ismerjük.

4. Az anizomicin minden általunk vizsgált jelátviteli hatása gátolható volt a szabadgyökök képződésének gátlásával. Az anizomicin-stimulálta ERK



foszforiláció, a JNK foszforilációja és aktivációja és a *c-jun*, *c-fos*, *zif268* indukciója mind igénylik a szabadgyökök jelenlétét. Újabban számos kísérleti eredmény számol be a szabadgyökök központi jelátviteli szerepéről. Az anizomicin-indukálta szabadgyökök képződésének mechanizmusa egyelőre ismeretlen, de kísérleteink alapján nélkülözhetetlen közvetítőnek tűnnek PC12 sejtekben.

5. Az anizomicin kis koncentrációban nem befolyásolja a sejtproliferációt és önmagában nem elegendő az apoptotikus sejtpusztulás előidézéséhez. A nagy koncentrációjú anizomicin ezzel szemben sejtpusztulást okoz, ami apoptózissal történik. Bár az irodalmi adatok alapján a JNK út aktivációja apoptózist okoz, a PC12 rendszerben ez nem elegendő magyarázat az apoptózis létrehozására, mivel a kis koncentrációjú, sejtpusztulást nem okozó anizomicin a nagyhoz hasonló mértékben és időkinetikával okoz JNK aktivációt. Hasonlóképpen, összevetve a kis és nagy koncentrációjú anizomicin jelátviteli hatását, mindkettő aktiválja az ERK, és a p38 kinázokat, illetve rajtuk keresztül *c-jun*, *c-fos*, *zif268* indukciót okoznak. Annak ellenére, hogy a p38 kináz központi szerepet játszik az anizomicin jelátviteli útjában, gátlása nem antiapoptotikus hatású. Ebből arra következtethetünk, hogy az anizomicin jelátviteli útjainak apoptózist kiváltó és antiapoptotikus hatása is van. Közülük az apoptózist kiváltó út nem igényel fehérjeszintézist, míg az antiapoptotikus útban újonnan szintetizált fehérjék is szerepet játszanak. Ezeknek a fehérjéknek a szintézisét gátolja meg az anizomicin nagy koncentrációja.

6. Az anizomicin apoptotikus hatását túlélési fehérjék gátlása közvetítheti. A PC12 sejtekben számos fehérje játszik antiapoptotikus szerepet, ilyen a PI3K, az Akt/PKB, az NF κ B, a Bcl-2. Mivel a növekedési faktorok nem védik ki az anizomicin által okozott apoptózist, valószínű, hogy az ERK aktivációja nem játszik szerepet az antiapoptotikus mechanizmusokban. PC12 sejtekben az NGF feltételezett fő antiapoptotikus útvonalát a PI3K közvetíti. A PI3K-on keresztül aktiválódó Akt fehérje szintén fontos antiapoptotikus szerepet játszik. Kísérleteink alapján az NGF okozta Akt foszforilációt a nagy koncentrációjú

)

anizomicin gátolja. Ez több útvonalon okozhat apoptotikus hatást, hiszen az Akt célfehérjéi közé tartoznak a Bad, caspase-9, IKK α fehérjék is. Újabban számos kísérleti eredmény igazolja, hogy az apoptózis szabályozásában szerepet játszó Bcl-2 fehérje szintje mind transzkripcionális, mind posztranszkripcionális szinten szabályozott. A kis koncentrációjú anizomicin Bcl-2 expresszió emelkedést okoz, szemben a nagy koncentrációjú anizomicinnel. Feltételezzük, hogy a Bcl-2 szint emelkedése adaptációs válasz az anizomicin apoptotikus hatásaira. Ez az alkalmazkodási lehetőség a nagy koncentrációjú anizomicin esetében elmarad a fehérjeszintézist gátló hatás miatt, valószínűleg központi szerepet játszva az apoptózis kialakításában.

7. A protein kináz A serkentése részleges védelmet nyújt az anizomicin apoptotikus hatásával szemben. Az anizomicin okozta apoptózisban az általunk tesztelt ágensek közül egyedül a dbcAMP okozott részleges gátlást. Ebben az antiapoptotikus hatásban a dbcAMP számos célfehérjéje részt vehet. A PKA az irodalmi adatok tanúsága szerint aktiválja az Akt fehérjét és foszforilálja a CREB fehérjét. A B-Raf aktivációján keresztül az ERK út antiapoptotikus hatása érvényesülhet. A dbcAMP hatása a vizsgált növekedési faktorok sikertelenségével együtt arra utal, hogy a toxikus anizomicin kezelés valahol, a receptorokhoz közel, viszonylag proximálisan szakítja meg a PC12 sejtek túlélési szignalizációját.

Eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy az anizomicinnel kezelt PC12 sejtek alkalmasnak látszanak a stressz-szignalizáció eseményeinek vizsgálatára, a stressz utak és más jelátviteli mechanizmusok közötti kapcsolatok elemzésére. Világosan látszik azonban az is, hogy az anizomicin szignalizációs és transzlációt gátló hatásai együtt jelentkezhetnek, egymást kiolthatják, megnehezítve a bonyolulttá váló biokémiai és biológiai hatások kiértékelését. A transzlációt gátló anizomicin-koncentrációval kapott jelátviteli hatások jelentőségét ezért mindenkor kritikával kell mértegelni.

A munka alapját képező publikációk

Közlemények

- Törőcsik B.**, Szeberényi J. (2000) Anisomycin uses multiple mechanisms to stimulate mitogen-activated protein kinases and gene expression and to inhibit neuronal differentiation in PC12 pheochromocytoma cells. *European Journal of Neuroscience*, 12, 527-532 (Imp. f.: 4.95)
- Törőcsik B.**, Szeberényi J. Anisomycin affects both pro- and antiapoptotic mechanisms in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, közlésre elfogadva. (imp. f.: 3.400)
- Szeberényi J., **Törőcsik B.** Stressz-aktivált jelátviteli utak emlős sejtekben. In "Stressz - A sejtől a populációig", (közlés alatt).

Absztraktok

- Törőcsik B.**, Szeberényi J. Anisomycin uses multiple mechanisms to inhibit neuronal differentiation in PC12 pheochromocytoma cells. 26th FEBS Meeting, June 19-24, 1999, *Biochimie (supplement)* s318

Előadások/Poszterek

- Törőcsik B.**, Szeberényi J. The effect of anisomycin on gene expression in PC12 cells. 25th Silver Jubilee FEBS Meeting, July 5-10, 1998
- Törőcsik B.**, Szeberényi J. The effect of anisomycin on gene expression in PC12 cells. 14th Annual Meeting on Oncogenes, La Jolla, June 24-27, 1998
- Törőcsik B.**, Szeberényi J.: Az anizomycin génindukcióra kifejtett hatása patkány pheochromocytoma sejtekben. VI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 1998, jan. 18-21
- Törőcsik B.**, Szeberényi J.: Az anizomycin génexpressziós hatása patkány pheochromocytoma sejtekben. Doktoranduszok II. Országos Konferenciája, 1998, aug. 30 - szept. 1
- Törőcsik B.**, Szeberényi J.: Az anizomycin génaktivációs hatása PC12 sejtekben. Jelátvitel Magyarországon, 1998, okt. 9-10

Törőcsik B., Szeberényi J.: Anizomycin hatása PC12 sejtek szignál transzdukciós folyamataira. VII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 1999, jan. 17-20

Törőcsik B., Szeberényi J.: Stressz-aktivált jelátviteli utak PC12 patkány pheochromocytoma sejtekben. VIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2000, jan. 17-19

Egyéb saját publikációk

Csatáry L. K., Moss R. W., Beuth J., **Törőcsik B.**, Szeberényi J. and Bakács T. Beneficial treatment of patients with advanced cancer using a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68-H). *Anticancer Research*, **19**, 635-638, 1999 (Imp. f.: 1.045)

Oszter, A., **Törőcsik, B.**, Vértes, Zs., Kömyei, J.L., Kovács, K.A. and Vértes, M. (2000) Regulation of activator protein-1-DNA binding activity by opioid peptides in estrogen-sensitive cells of rat hypothalamus and uterus. *Eur. J. of Pharmacology* **395**, 103-106 (Imp. f.: 1.9)

Oszter, A., Vértes, Zs., **Törőcsik, B.**, Kömyei, J.L., Kovács, K.A. and Vértes, M. (2000) Antiestrogenic effect of opioid peptides in rat uterus. *J. of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, közlésre elfogadva. (Imp. f.: 1.9)

Fábián, Zs., **Törőcsik, B.**, Kiss, K., Csatáry, L.K., Bodey, B., Tigyi, J., Csatáry, C., and Szeberényi, J. Induction of apoptosis by a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H) in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Anticancer Res.*, közlésre elfogadva (Imp. f.: 1.045)

Egyéb absztraktok

Oszter, A., **Törőcsik, B.**, Paál, B., és Vértes, M. (1999) Effect of opioid peptides on the oestradiol receptors in rat hypothalamus. *Neurobiology*, **7**, 364

Oszter, A., **Törőcsik, B.**, Kömyei, J.L., Vértes, Zs. and Vértes, M. Transcriptional effect of D-Met²-Pro⁵-enkephalinamide in rat oestrogen-sensitive tissues. Joint Meeting with the Hungarian Physiological Society, 27th to 29th May 2000, *J. of Physiology*



Egyéb előadások/poszterek

- Oszter A., **Törőcsik B.**, Paál B.: Az endogén opioid peptidok hatásának vizsgálata az oestradiol receptor rendszer működésére patkány hypothalamusban és uterusban. Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XVII. Kongresszusa, 1998, augusztus 25-27
- Oszter A., **Törőcsik B.**, Kovács K.A., Kömlyei J., Vértes Zs., Vértes M.: Opioid peptidok antioestrogén hatása patkány uterusban. A Magyar Élettani Társaság LXIV. Vándorgyűlése 1999, július 5-8
- A. Oszter, **B. Törőcsik** and M. Vértes: Effect of opioid peptides on the oestradiol receptors in rat hypothalamus. 9th Meeting and Workshops of the European Neuroendocrine Association 1999, september 3-7
- Oszter, A., **Törőcsik, B.**, és Vértes, M. (2000) Opioid peptidok hatása a hypothalamikus AP-1-DNS kötődés aktivitására a szexuális fejlődés hatására patkányban. IBRO-MITT Milleneumi Konferencia, 2000, jan. 19-22
- Fábián, Zs., Kiss K., **Törőcsik B.**, és Szeberényi J.: Newcastle Disease Virus vakcina (MTH-68/H) által indukált apoptózis PC12 patkány pheochromocytoma sejtekben. VIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2000, jan. 17-19