

**Proteaszóma gátló (MG-132) által indukált neuritnövekedés
és apoptózis jelátvitelének vizsgálata patkány
feokromocitóma (PC12) sejtekben**

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Tarjányi Oktávia

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Gallyas Ferenc
Programvezető és témavezető: Ifj. Dr. Sétáló György



Pécsi Tudományegyetem

OGYDHT Pécs

2023

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4.
Összefoglalás	9.
1. Bevezetés	11.
1. 1. A neuronális differenciáció és apoptózis modellrendszere	11.
1. 2. A mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK)	13.
1. 3. A neuronális differenciáció (neuritogenezis) jelátvittele	14.
1. 4. Az apoptózis jelátvittele	17.
1. 4. 1. Az extrinsic út	19.
1. 4. 2. Az intrinsic út	19.
1. 4. 3. Az ER stressz által kiváltott apoptózis	21.
1. 5. Az ubikvitin-proteaszóma rendszer (UPS)	23.
1. 6. Proteaszóma gátlók	25.
2. Célkitűzések	28.
3. Anyagok és módszerek	30.
3. 1. Reagensek	30.
3. 2. Sejtek	31.
3. 3. Proteaszóma gátló és kináz inhibitor kezelések	31.
3. 4. Antitestek	32.
3. 5. Fáziskontraszt mikroszkópia	33.
3. 6. Magfestés	33.
3. 7. Áramlási citometria	33.
3. 8. A sejtek életképességi vizsgálata WST-1 méréssel	34.
3. 9. Western blot	34.
3. 10. Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia	35.
3. 11. Statisztikai analízis	35.
4. Eredmények	36.
4. 1. A PC12 sejtek tartós MG-132 kezelés során tapasztalt morfológiai változásai	36.
A. NEURITOGENEZIS	
4. 2. Az MG-132 kezelés hatására bekövetkező ERK- és Src-aktiváció kinetikája	37.

4. 3. Az ERK MG-132 által kiváltott foszforilációja MEK- és Ras függő folyamat	38.
4. 4. A Src-gátlás hatása a Src- és ERK foszforilációjára.....	40.
4. 5. A TrkA MG-132 által kiváltott foszforilációja és annak gátlása Src-inhibítorral	42.
4. 6. A Src-, TrkA- és ERK aktivitás vizsgálata TrkA-gátolt PC12 sejtekben	43.
4. 7. A foszforilált Src és -ERK intracelluláris lokalizációja és a PC12 sejtek fenotípusos változásai	45.
B. APOPTÓZIS	
4. 8. Az MG-132-vel 24 órán át, vagy hosszabb ideig kezelt PC12 sejtek apoptózisa	47.
4. 9. Az MG-132 kezelés hatására bekövetkező Akt-, p38-, JNK-, c-Jun foszforiláció és a kaszpáz-3 aktiváció időkinetikája.....	50.
4. 10. A stressz jelátviteli fehérjék sejten belüli eloszlása MG-132 kezelés során.....	52.
4. 11. Specifikus kináz inhibitorok hatásainak vizsgálata az MG-132 kezelés által kiváltott Akt-, p38-, JNK- és c-Jun aktivációra	53.
4. 12. Az Akt-, p38-, JNK- és c-Jun foszforilációja vad típusú PC12 sejtekben és M-M17-26 mutánsokban 3 órás MG-132 kezelést követően.....	55.
5. Megbeszélés	57.
Köszönetnyilvánítás	69.
Irodalomjegyzék	70.
Saját közlemények	81.
Melléklet	86.

Rövidítések jegyzéke

- Akt = PKB:** AKR egértörzsben spontán kifejlődő thymoma = Protein Kinase B / protein kináz B, a virális akt-gén celluláris homológjának fehérje terméke
- ASK:** Apoptosis Signal-regulating Kinase, egy **MAPKKK**, amely a p38 és a JNK utakat képes aktiválni
- Apaf-1:** apoptotic protease activating factor-1, az apoptózóma kialakításában vesz részt a prokaspáz-9-cel és a citokróm C-vel együtt
- ATF6:** activating transcription factor-6, az ER stressz során aktiválódó transzkripció faktor
- β1:** a proteaszóma kaspáz-szerű aktivitással rendelkező alegysége
- β2:** a proteaszóma tripszin-szerű aktivitással rendelkező alegysége
- β5:** a proteaszóma kimotripszin-szerű aktivitással rendelkező alegysége
- Bad:** Bcl-2 associated agonist of cell death, egy proapoptotikus „BH3-only” fehérje
- Bak:** Bcl-2 homologous antagonist/killer, egy proapoptotikus multi-domén fehérje
- Bax:** Bcl-2-associated X protein, egy proapoptotikus multi-domén fehérje
- Bcl-2:** B-cell lymphoma-2 / B-sejtes limfóma-2, egy antiapoptotikus fehérje
- Bcl-xL:** Bcl-extralarge
- BH-domén:** Bcl-2 homológia domén, 4 különböző BH-domén ismert (BH1-4), a Bcl-2 családba tartozó fehérjék felépítésében vesznek részt
- Bid:** BH3 interacting-domain death agonist, egy proapoptotikus „BH3-only” fehérje
- Bik:** Bcl-2-interacting killer, egy proapoptotikus „BH3-only” fehérje
- Bim:** Bcl-2 interacting mediator of cell death, egy proapoptotikus „BH3-only” fehérje
- BIPN:** Bortezomib-indukálta perifériás neurothia
- c-Jun:** ju-nana, 17 japánul; az első onkogén transzkripció faktor, melyet az avian sarcoma virus 17-ben azonosítottak; az AP-1 transzkripció faktor egyik alegysége, melyet a JNK enzim képes foszforilálni
- Csk:** Carboxy-terminal Src Kinase / C-terminális Src kináz, az enzim C-terminális végén található, 527-es tirozin aminosaván foszforilálva inaktiválja a Src kinázt
- Cy3:** cyanin 3, fluoreszcens festék
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium, egy gyakran használt sejtenyésztő oldat

DR4 és **DR5**: Death receptor-4 és 5, halálreceptorok, amik a TRAIL halálligandot képesek megkötni

DUB: deubiquitinating enzyme / deubikvitináló enzimek

E1: ubiquitin-activating enzyme / ubikvitin-aktiváló enzim, a UPS által lebontandó fehérjék poli-ubikvitinációjában vesz részt

E2: ubiquitin-conjugating enzyme / ubikvitin-konjugáló enzim, a UPS által lebontandó fehérjék poli-ubikvitinációjában vesz részt

E3: ubiquitin-ligase enzyme / ubikvitin-ligáz enzim, a UPS által lebontandó fehérjék poli-ubikvitinációjában vesz részt

EGF: Epidermal Growth Factor / epidermális növekedési faktor

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase / extracelluláris szignál-regulált kináz, egy **MAPK**, a MAPK-kaszád egyik effektora, két legismertebb izoformája az ERK 1 és ERK 2 (**ERK1/2**)

FADD: Fas-associated death domain / Fas- hoz asszociált haláldomén, egy adapter fehérje

Fas: egy halálreceptor

FasL: Fas-ligand, egy halálligand

FDA: Food and Drug Admistration

FGF: Fibroblast Growth Factor / fibroblaszt növekedési faktor

GAP: GTP-ase Activating Protein / GTPáz aktiváló fehérje, a G-proteinek (pl.: Ras) GTP bontó aktivitását serkenti

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase / gliceraldehyd 3-foszfát dehidrogenáz, egy viszonylag stabil expressziójú, úgynevezett housekeeping fehérje

GDP és **GTP**: guanozin di- és trifoszfát

GEF: Guanine-nucleotide Exchange Factor / guanin-nukleotid kicserélő faktor, ami pl. a Ras-t is aktiválja

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2, egy adapter protein, mely jelátviteli fehérjék között lát el kapcsoló feladatot

Hsp90: Heat Shock Protein 90 / 90 kDa molekulatömegű hősokkfehérje

IκB: Inhibitor of κB, egy fehérje, ami a Nukleáris Faktor-κB-t gátolja

IRE1: inositol-requiring protein-1, az ER stressz során aktiválódó kombinált nukleáz és kináz

JNK: c-Jun N-terminal Kinase / c-Jun N-terminális kináz, egy MAPK fehérje, ami a stresszválasz közvetítésében játszik szerepet

K252a: TrkA-inhibitor vegyület

LY294002: PI3K-inhibitor vegyület, gátolja az Akt PI3K-függő aktiválódását

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase / mitogén-aktivált protein kináz, egy enzimsalád névadója (MAPK családtagok pl. az **ERK**, a **JNK**, a **p38**)

MAPKK: MAPK-kináz, pl. a **MEK**, az **MKK3/6** és az **MKK4/7**

MAPKKK: MAPKK-kináz, pl. a **Raf**, az **ASK** és az **MLK**

MEK: MAPK/ERK Kinase / MAPK/ERK kináz, egy **MAPKK**, a MAPK-kaszád tagjaként az ERK-et foszforiláló, kettős specifitású protein kináz

Mdm2: mouse double minute 2, egy ubikvitin-ligáz enzim, mely a p53 poli-ubikvitinációjában játszik szerepet

MG-132: proteaszóma gátló vegyület

MKK: Mitogen-activated protein kinase kinase / mitogén-aktivált protein kináz kináz, a stressz kinázokat aktiváló **MAPKK** (a p38-at az **MKK3/6**, a JNK-t az **MKK4/7** aktiválja)

MLK: Mixed-Lineage Kinase, egy **MAPKKK**, amely a p38 és a JNK utakat képes aktiválni

M-M17-26: domináns gátló Ras mutáns fehérjét nagy fokban expresszáló PC12 sejtvonal

MOMP: mitochondrial outer membrane permeabilization / mitokondriális külső membrán permeabilizáció

NF-κB: Nuclear Factor-κB / nukleáris faktor-κB, egy transzkripció faktor, melynek működését az IκB kötődése gátolja

NGF: Nerve Growth Factor / idegi növekedési faktor, túlélési és differenciációs jelátviteli utakat indít be PC12 sejtekben

NK-sejtek: Natural Killer cells / természetes ölősejtek

Noxa: egy proapoptotikus „BH3-only” fehérje

OD: optikai denzitás

P2Y2: G-proteinhez kapcsolt receptor, valószínűleg a Src-on keresztül serkenti a TrkA által közvetített neuronális differenciációt

p38: a stressz jelátvitelt közvetítő egyik mitogén-aktivált protein kináz (**MAPK**)

PACAP: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

PERK: protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase

PDK: 3-Phosphoinositide-DePendent Kinase / 3-foszfoinozítid-függő kináz, a PI3K-út tagja, az Akt/PKB foszforilálását végzi

PD98059: MEK-inhibitor vegyület

PERK: PKR (protein kinase RNA)-like ER kinase, az ER stressz során aktiválódó protein kináz

PI: propidium-jodid

PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase / foszfatidilinozitol 3-kináz, egy enzimfehérje, mely a sejttúlélés szabályozásában vesz részt

PLC- γ : Phospholipase-C- γ / foszfolipáz-C-gamma, NGF-receptor szignalizációban részt vevő, SH2-doménnel rendelkező jelátviteli fehérje

PP2: Src-inhibitor vegyület

PP2A: protein phosphatase 2A

p-Tyr: foszfortirozin

Puma: p53 upregulated modulator of apoptosis, egy proapoptotikus „BH3-only” fehérje

Raf: rapidly accelerated fibrosarcoma, egy szerin/treonin specifikus **MAPKKK**, mely a MEK jelátviteli fehérjét foszforilálja

Ras: rat sarcoma, egy membránhoz kötött monomer G-protein, mely a Raf-ot aktiválja

SB203580: p38-inhibitor vegyület

SH2-domén: Src-homológia 2-domén, különböző fehérjékben jelenlévő, foszfortirozint felismerő, és ahhoz kötődni képes fehérjemoitívum

SH3-domén: Src-homológia 3-domén, egy poliprolin-kötő fehérjerégió

Shc: Src homologous and collagen-like, egy adapter fehérje, mely jelátviteli fehérjék között lát el kapcsoló feladatot

Sos: Son of sevenless, egy guanin-nukleotid kicserélő faktor (**GEF**), mely a G-fehérjék által kötött GDP-nek GTP-re történő lecserélését segíti

SP600125: JNK-inhibitor vegyület

Src: sarcoma, egy non-receptor tirozin protein kináz

TNF- α : Tumor necrosis factor- α / tumor nekrozis faktor- α , az immunsejtek által termelt egyik citokin, egyben az egyik ismert halálligand

TNFR1/2: TNF-receptor 1 és 2

TRADD: TNFR-associated death domain / TNFR-hoz asszociált haláldomén, egy adapter fehérje

TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand / TNF-el rokon apoptózist indukáló ligand, az egyik halálligand

TrkA: Tropomyosin receptor kinase A, nagy affinitású NGF-receptor

UPR: unfolded protein response

UPS: ubiquitin-proteasome system / ubikvitin-proteaszóma rendszer

v-src: virális src gén

WST-1: egy tetrazólium só, melyet a mitokondriális dehidrogenázok formazánná alakítanak, aminek képződött mennyisége az élő sejtek arányának meghatározására alkalmas

Összefoglalás

Az neuronális differenciáció, túlélés és apoptózis tanulmányozásának kedvelt modellrendszere a PC12 (patkány feokromocitóma) sejtvonala. Ezek a kerek sejtek idegi növekedési faktor (NGF) kezelés hatására jelentős morfológiai változásokon mennek keresztül, és szimpatikus idegsejtekhez hasonló alakokká differenciálódnak, aminek a háttérében összetett jelátviteli történések állnak.

Az NGF-nek a nagy affinitású receptorához, a TrkA (tropomiozin receptor kináz A)-hoz való kötődését a receptor dimerizációja, auto-/transzfoszforilációja, valamint egy monomer G-protein, a Ras (nevének eredete: rat sarcoma) aktivációja követi. Az aktivált Ras egy citoplazmatikus mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkádot indít be, melynek tagjai a Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma, egy MAPKKK), a MEK (MAPK/ERK kináz, egy MAPKK) és az ERK1/2 (továbbiakban ERK = extracelluláris szignál-regulált kináz, egy MAPK) (Segal és Greenberg, 1996; Szeberényi és Erhardt, 1994; Vaudry és mtsai., 2002). Az ERK időben elhúzódó foszforilációja és nukleáris transzlokációja előfeltétele a PC12 sejtek neuronális differenciációjának (Boglári és mtsai, 1998; Marshall, 1995; Traverse és mtsai, 1992). E folyamat során a Src (nevének eredete: sarcoma) tirozin kináz aktivációja is megfigyelhető (Alemà és mtsai, 1985).

Proteaszóma gátló kezelés szintén előidézhethet neuritnövekedést PC12 sejtekben (Hashimoto és mtsai, 2000; Song és mtsai, 2009, 2011), ugyanakkor a Src inaktivációjában fontos szerep jut az aktív fehérje proteaszómális degradációjának is (Hakak és Martin., 1999), melyet a kísérleteinkben használt peptidil-aldehid típusú proteaszóma gátló vegyület (MG-132) befolyásolni képes.

Saját megfigyeléseink alapján az MG-132 2,5 μM -os koncentrációban alkalmazva kétfázisú választ vált ki PC12 sejtekben. Kezdetben gyorsan beindítja a neuritnövekedés folyamatát, azonban 24 óra elteltével a sejtek morfológiai változásai egyre inkább a programozott sejthalál jeleit mutatják. Ennek megfelelően kísérleteink során előbb a proteaszóma gátló kezelés hatására bekövetkező neuritogenezis, majd az idegsejtek pusztulása (apoptózis) során végbemenő jelátviteli változások feltérképezését tűztük ki célként. Ennek érdekében a PC12 sejtek neuronális differenciációjában szerepet játszó TrkA-Ras-ERK útvonalat és a Src tirozin kináz lehetséges szerepét, valamint a sejtek túlélésében és apoptózisában szerepet játszó néhány jelátviteli fehérje aktiválódását vizsgáltuk a proteaszóma gátlóval történő kezelések során.

Eredményeink alapján az MG-132 a kezelés első fázisában (annak korai szakaszában) kiváltja a TrkA foszforilációját, melyet a neuronális differenciáció előfeltételének tartott, időben elhúzódó ERK aktiváció követ a Ras, Raf, MEK útvonalon keresztül. Ezekben a folyamatokban fontos szerepe van az aktív Src stabilizálásának, melyet proteaszómális lebontásának gátlásával értünk el. Src-inhibítorral (PP2) történő előkezelés hatására ugyanis a proteaszóma gátló által előidézett TrkA foszforiláció elmaradt, az ERK aktiváció kisebb mértékűnek bizonyult és előbb lecsengett, az aktív ERK nukleáris transzlokációja mérséklődött, és a következményes neuritnövekedés sem volt megfigyelhető.

Molekuláris szinten az ERK aktivációján és a differenciációt kiváltó egyéb változásokon kívül az Akt-nak, valamint a sejtek stresszválaszát közvetítő MAPK-oknak, a p38MAPK-nak (továbbiakban p38) és a c-Jun N-terminális kináznak (JNK), valamint az utóbbi szubsztrátjának, a c-Jun-nak (ju-nana, 17 japánul) a lassú és elhúzódó aktivációja is megfigyelhető.

24 óra elteltével (az MG-132 kezelés késői szakaszában) a túlélést közvetítő Akt és ERK foszforilációja lecsökkent, míg a p38 és JNK által közvetített stressz jelátviteli utak kifejezetten aktívak maradtak. Ezen kívül a kaszpáz-3 aktiváló hasítása is kimutatható volt már ebben az időpontban, ami a sejtek apoptózisának egyértelmű jele.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az MG-132-vel végzett proteaszóma gátló kezelés kétfázisú választ vált ki PC12 sejtekben. Kezdetben a TrkA-Ras-ERK útvonal aktiválódik, mely a sejtek neuritogenezisét indukálja. Ehhez a folyamathoz nélkülözhetetlen a Src aktiváció fokozódása. 24 óra elteltével a jelátviteli események eltolódnak a túlélési útvonalak (Akt és ERK) inaktiválódása, valamint a stressz utak (p38 és JNK) aktiválódása felé, mely változások – a következményes kaszpáz-3 hasítással együtt – a PC12 sejtek apoptózisát mozdítják elő.

1. Bevezetés

1. 1. A neuronális differenciáció és apoptózis modellrendszere

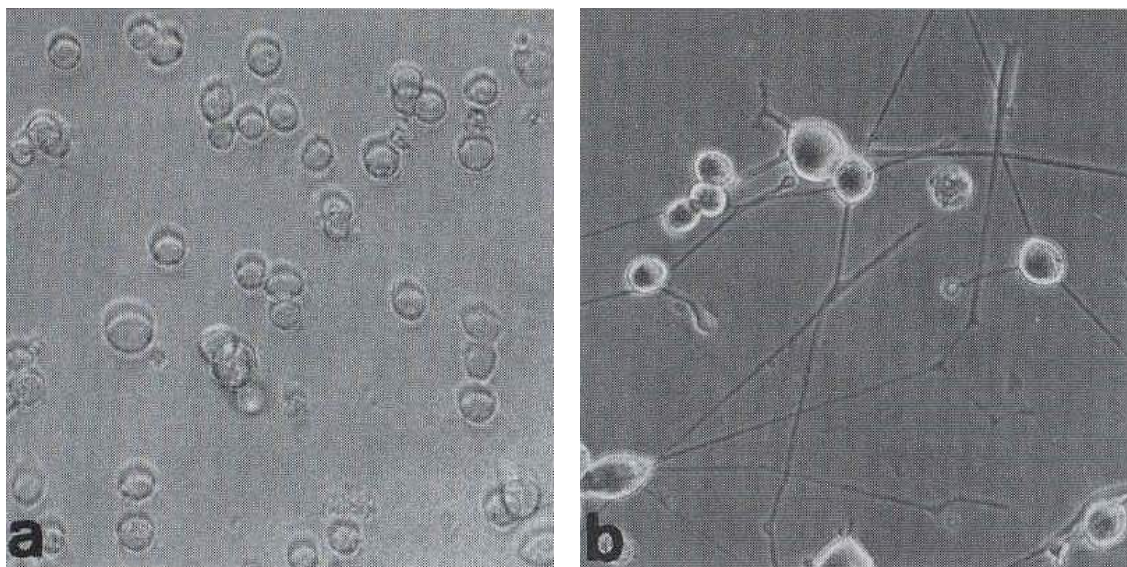
Az utóbbi években-évtizedekben egyre intenzívebben folynak a neurodegeneratív betegségek, illetve más idegsejtpusztulással járó kórállapotok megértéséhez, vagy akár terápiás javaslatok kidolgozásához hozzájáruló, a neuronális apoptózis, -túlélés és -differenciáció folyamatait vizsgáló kutatások.

A proteaszómák, mint a sejten belüli, szabályozott fehérjelebontás komplexeinek szerepe is felmerült ezekben a folyamatokban. Különböző neurodegeneratív betegségek hátterében leírták a proteaszómák csökkent működését (Ciechanover és Brundin, 2003; Layfield és mtsai, 2003; Cao és mtsai, 2020), ami a nem-, vagy nem jól hajtogatott fehérjék sejten belüli felhalmozódásával járulhat hozzá az idegsejtek pusztulásához.

A proteaszóma gátlókkal végzett preklinikai vizsgálatok során kiderült, hogy a magas translációs aktivitást mutató plazmasejtek a legérzékenyebbek a proteaszómális aktivitás csökkenésére, így elsőként a myeloma multiplex terápiájában kezdték alkalmazni ezeket a szereket (Teicher és Tomaszewski, 2015). Az első proteaszóma gátlók sikeres terápiás alkalmazásával fény derült arra is, hogy ezeknek a szerekeknek az egyik súlyos mellékhatása a perifériás neuropátia (Velasco és mtsai, 2019). Ugyanakkor régóta ismert az a tény is, hogy egyes proteaszóma gátlók neuritnövekedést képesek indukálni bizonyos sejtvonalakban (Hashimoto és mtsai, 2000). Egy microarray elemzésen alapuló tanulmány nyilvánvalóvá tette, hogy a laktaciszttal végzett proteaszóma gátlás neuroprotektív és pro-apoptotikus útvonalakat egyaránt képes aktiválni (Yew és mtsai, 2005).

Ezek a megfigyelések nagy mértékben korrelálnak a PC12 sejtek MG-132-vel való kezelése során általunk tapasztalt kétfázisú morfológiai változásokkal, melynek során kezdetben a neuritogenezis, a későbbiekben pedig az apoptózis jelenségei domináltak. Munkánk során az ezeknek a folyamatoknak a hátterében zajló molekuláris mechanizmusokat vizsgáltuk. Kísérleteinkhez PC12 sejtek tenyésztéseit használtuk, amely sejtvonal neuroendokrin eredetének köszönhetően az idegsejt differenciáció, túlélés és apoptózis sejtenyészeten történő tanulmányozásának széles körben elterjedt modellrendszere. A PC12 sejtvonal a Parkinson-kór, vagy a stroke modellezésére, illetve a neuroszekréció és neurotoxicitás *in vitro* tanulmányozására is kiválóan alkalmas.

Ezeknek a patkány mellékvesevelőből származó daganatsejteknek a felszínén jól kimutathatóan expresszálódik a TrkA receptor, ami a polipeptid típusú NGF nagy affinitású sejt felszíni kötőhelye (Esposito, 2001). Ennek a 140 kDa molekulatömegű fehérjének köszönhetően a PC12 sejtvonalon kiválóan tanulmányozható az NGF jelátvitel és a neuronális differenciáció folyamata (Pap és Szeberényi, 1998; Boglári és Szeberényi, 2001; Vaudry és mtsai, 2002; Kiss és mtsai, 2006). Tartós, több napos NGF kezelés hatására a kis kerek sejtek (**1/a. ábra**) osztódása leáll, méretük megnő, és hosszú nyúlványokat növesztve mind megjelenésük, mind biológiai viselkedésük szimpatikus idegsejtekéhez válik hasonlónak (**1/b. ábra**) (Greene és Tischler, 1976).



1. ábra PC12 sejtek **a)** kezeletlen és **b)** NGF-fel kezelt, differenciált sejtalakjai (Boglári és Szeberényi, 2001)

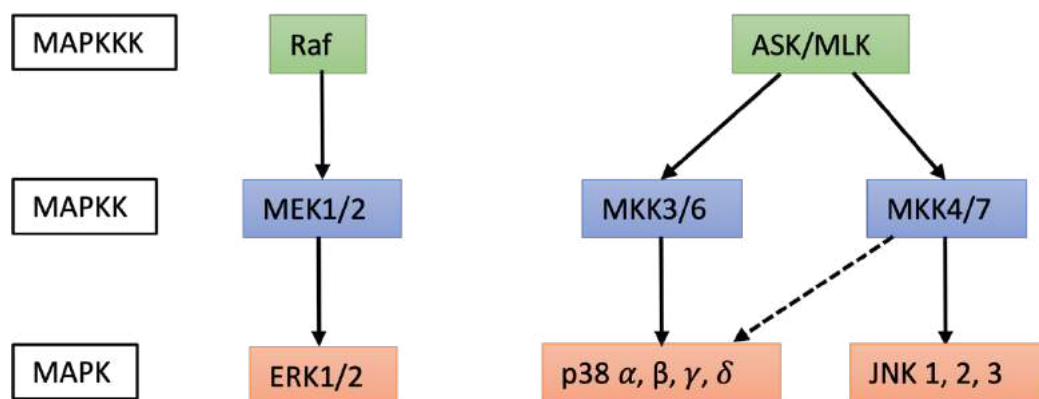
Az NGF mellett más polipeptid típusú növekedési faktorok, és akár egyéb hatások (pl. MG-132 kezelés) is kiválthatják a PC12 sejtek neuronális irányú differenciációját.

Ezen kívül PC12 sejteket használnak például az embrionális fejlődés során végbemenő, illetve neurotoxinok, vagy egyéb ágensek által kiváltott neuronális apoptózis *in vitro* modellezésére is (Walkinshaw és Waters, 1994; Yi és mtsai, 2021).

1. 2. A mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK)

A MAPK kaszkádok az intra- és extracelluláris jelek (pl. mitogén- vagy stresszhatások) integrálásával és feldolgozásával szabályozzák a sejtek alapvető folyamatait, ami kiválthat proliferációt, differenciációt, sejtülélést vagy akár apoptózist is. A jelekre adott válasz függ az adott sejt típusától, a jel fajtájától és -intenzitásától, a részt vevő jelpályák összetételétől és aktivációjuk dinamikájától, valamint a köztük zajló párbeszédétől is (Fey és mtsai, 2012).

A MAP-Kinázok közé tartoznak az extracelluláris szignál-regulált kinázok (ERK1/2), a p38MAPK-ok (p38 α - δ), valamint a c-Jun N-terminális kinázok (JNK1-3) (Shiizaki és mtsai, 2013; Munshi és Ramesh, 2013; Darling és Cook, 2014). Aktivációjuk mindhárom esetben egy kinázokból álló kaszkád tagjainak egymást követő foszforilációja révén valósul meg (**2. ábra**). A kaszkád legproximálisabb tagja a MAPKKK, ami az ERK esetében a Raf, a p38 és a JNK esetében pedig az ASK (apoptosis signal-regulating kinase) vagy az MLK (mixed-lineage kinase). A kaszkád következő tagja a MAPKK, ami a kaszkád utolsó tagjait, a MAPK-okat foszforilálja. Az ERK-et a MEK, a p38-at a MAPK kináz 3 és 6 (MKK3 és MKK6), a JNK-t pedig a MAPK kináz 4 és 7 (MKK4 és MKK7) képes foszforilálni és ez által aktiválni (**2. ábra**). (Hayakawa és mtsai, 2012; Munshi és Ramesh, 2013; Shiizaki és mtsai, 2013; Darling és Cook, 2014; Manieri és Sabio, 2015). Az irodalomban található adatok a p38 MKK4 általi aktiválására is (Deacon és Blank, 1997).



2. ábra A MAPK jelátviteli kaszkádok (magyarázat a szövegben)

A PC12 sejtekben például, ahogy már említettük, az NGF elhúzó ERK aktivációt idéz elő, ami a sejtek differenciációjához vezet, viszont ugyanebben a sejtvonalba az EGF (epidermális növekedési faktor) kezelés rövidebb ideig tartó, átmeneti ERK aktivációt okoz, ami a sejtek proliferációját váltja ki (Santos és mtsai, 2007; von Kriegsheim és mtsai, 2009). Hasonlóképpen a stressz kinázok eltérő aktivációja is különböző válaszokat közvetít különböző sejtvonalakban. Például a tumor nekrosis faktor (TNF) által indukált, átmeneti JNK aktiváció a primer egér embrionális fibroblasztsejtek túlélését és proliferációját idézi elő, míg az elhúzó JNK aktiváció apoptózist indukál (Ventura és mtsai, 2006). Egy másik tanulmányban eritroid sejteket vizsgálva arra az eredményre jutottak, hogy a p38 és a JNK átmeneti aktivációja a sejtek differenciációját segítette elő, míg ugyanezen jelátviteli fehérjék tartós aktivációja -az ERK aktiváció csökkenésével együtt- a sejtek apoptózisához vezetett (Nagata és Todokoro, 1999). A tartós JNK- és p38 aktiváció az idegsejtek apoptózisát váltja ki különböző neurodegeneratív megbetegedésekben is (Kim és Choi, 2010).

1. 3. A neuronális differenciáció (neuritogenezis) jelátvitel

A neuronális differenciáció jelátviteli változásai jól vizsgálhatók a PC12 sejtek tartós NGF kezelése során. Az idegi növekedési faktor polipeptid természetéből adódóan nem képes átjutni a sejtmembránra, hatását sejt felszíni receptorához (TrkA) kötődve fejti ki. Ez először receptor dimerizációt eredményez, melyet receptor auto-/transzfoszforiláció követ (Segal és Greenberg, 1996). A receptor felszínén így létrejövő foszfo-tirozin oldalláncokhoz SH2 (Src homológia 2)-doménnel rendelkező citoplazmatikus fehérjék kötődnek (Karlsson és mtsai, 1998; Rui és mtsai, 1999), melyeket aztán a receptor szintén foszforilálni képes tirozin aminosav oldalláncaikon. Ilyen SH2-domént tartalmazó fehérjék például a Src (Alonso és mtsai, 1995), a foszfolipáz C- γ (PLC- γ), a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K), a GTPáz aktivátor protein (GAP), valamint különböző adapter molekulák (pl. Src homologous and collagen-like = Shc és growth factor receptor-bound protein 2 = Grb2) (**3. ábra**) (van der Geer és mtsai, 1994; Dikic és mtsai, 1995; Ganju és mtsai, 1998), mely utóbbiak SH3 (Src homológia 3), effektor doménjükön keresztül további, prolin aminosavban gazdag fehérjéket képesek megkötni (van der Geer és mtsai, 1994). Ilyen például a guanin-nukleotid kicserélő faktor (GEF, pl.: Son of sevenless = Sos). A GEF egy a plazmamembránhoz

kapcsolt monomer G-proteint, a Ras-t képes aktiválni, azáltal, hogy elősegíti annak GDP-kötött formából GTP-kötő alakká történő átalakulását. A Ras megfelelő időben történő inaktiválásához egy GTP-áz aktiváló proteinre (GAP) van szükség, melynek hatására a Ras saját GTP-áz aktivitása fokozódik, és a kötött GTP-t GDP-vé hidrolizálja. Inaktiválódása előtt a Ras még egy protein kinázokból álló, MAPK kaszkádot indít be, melynek tagjai egymást foszforilálva viszik tovább a jelet. A Ras a Raf-ot, az pedig a MEK-et hozza működésbe. A MEK kettős specificitású protein kináz aktivitással rendelkezik, melynek révén treonin és tirozin oldalláncokon képes célmolekuláit (szubsztrátjait) foszforilálni. Ennek következtében a kaszkád egyik utolsó citoplazmatikus tagjaként az ERK is foszforilálódik. A megfelelően aktivált ERK bejut a sejtmagba, és ott transzkripciós faktorokat foszforilálva szabályozza a génátírás folyamatát (**3. ábra**). Ennek eredményeként PC12 sejtekben a sejtciklus leállása, majd neuronális differenciációja figyelhető meg (Szeberényi és Erhardt, 1994; Segal és Greenberg, 1996; Ye és mtsai, 1999).

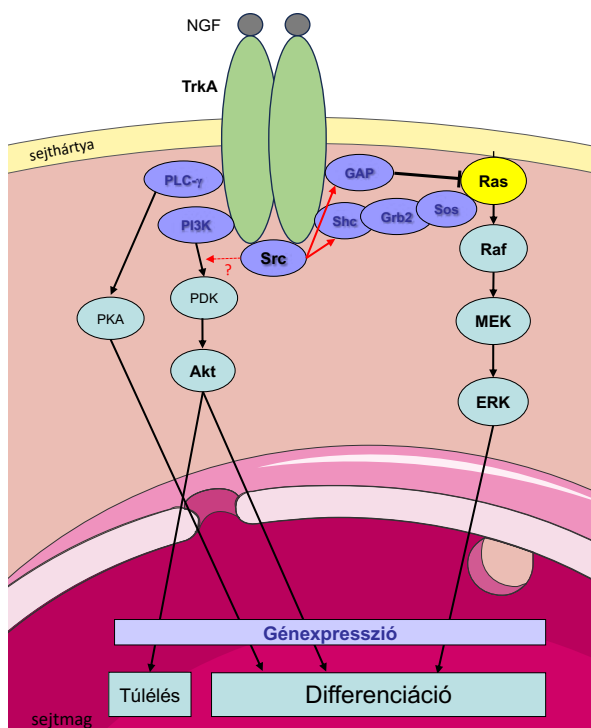
A nagy affinitású NGF-receptorról az ERK-út aktiválásán kívül számos egyéb jelátviteli folyamat is elindulhat (van der Geer és mtsai, 1994, Huang és Reichardt, 2003) (**3. ábra**). Az ERK kaszkád mellett ugyancsak a differenciációban vesz részt a PLC- γ enzim (Vetter és mtsai, 1991), ami két másodlagos messenger létrehozásával két párhuzamos jelátviteli utat is elindít. A PLC- γ differenciációban játszott konkrét szerepe ugyan még nem teljesen tisztázott, viszont az bizonyított, hogy a Ras-tól függetlenül működik (Kiss és mtsai, 2006).

Az NGF-indukálta neuronális differenciációban a Src-nak is fontos szerep jut (Tucker és mtsai, 2008). A Src tirozin kináz potenciális jelentőségét az NGF jelátvitelben a virális *src* onkogén (*v-src*) azon képessége miatt már korábban feltételezték, hogy az az NGF-hez hasonló neuritnövekedést volt képes indukálni (Alemà és mtsai, 1985). A Src és a Ras fehérje kapcsolatára utal NIH 3T3 sejtekben, hogy a növekedési faktorok, vagy a *v-src* által stimulált mitogenezist gátolja az anti-Ras antitest mikroinjekciója (Mulcahy, 1985), vagy egy domináns gátló *ras*-mutáns (Cai és mtsai, 1991) expressziója. Egy másik munkában Src- vagy Ras fehérjék elleni neutralizáló antitesteket mikroinjektáltak fuzionált PC12 sejtekbe, ami mindkét esetben megakadályozta és visszafordította az NGF- vagy FGF (fibroblaszt növekedési faktor) -indukálta neuritnövekedést (Kremer és mtsai, 1991). A receptor tirozin kinázok Src-függő és Src-független utakon is képesek

aktiválni a Ras-t (Kremer és mtsai, 1991). A Ras központi szerepét támasztja még alá az NGF által indukált neuronális differenciációban az a tény is, hogy a Ras elleni neutralizáló ellenanyagok mikroinjekciója fuzionált PC12 sejtekbe gátolja és visszafordítja az NGF kezelés következtében kialakuló neuritnövekedést (Hagag, 1986). Ebbe az irányba mutat továbbá még az is, hogy egy domináns gátló *ras*-mutáns expressziója az NGF és FGF számos hatását kivédi PC12 sejtekben (Szeberényi és mtsai, 1990). Az anti-Src antitest ugyan nem képes teljes mértékben meggátolni a *ras* onkogén által kiváltott neuritnövekedést, viszont a Ras funkció gátlása kivédi a *v-src* által indukált neuritogenezist (Kremer és mtsai, 1991). Az Src-Ras kaszkád stimulálása korai esemény az NGF és FGF jelátviteli utak mentén, ezért felmerül a közvetlen kölcsönhatás lehetősége magukkal a növekedési faktor receptorokkal is (Kremer és mtsai, 1991). A Ras inaktiválásához fontos GAP a Src és a tirozin kináz növekedési faktor receptorok szubsztrátja is lehet (Ellis és mtsai, 1990), de leírták a Src szerepét a Ras aktiválásában részt vevő GEF fehérje működésének fokozásában is, melynek során valójában az Shc foszforilációjában vesz részt, amihez ezt követően a Grb2/Sos komplex képes kötődni, és ennek következtében a Ras-t aktiválni (Yamaguchi és mtsai, 1997) **(3. ábra)**. Az NGF-fel kezelt, differenciálódó PC12 sejtekben a Src a membránhoz asszociáltnak, a nyúlványok növekedési kúpjaiban van jelen, különösen a tenyésztő felülethez való kapcsolódási helyeken (Sobue and Kanda, 1988), ami szükséges az NGF által indukált neuronális fenotípus kialakításához (Hagag, 1986). Egyes feltételezések, szerint a Src egy G-proteinhez kapcsolt receptor (P2Y2) és a TrkA receptor tirozin kináz közötti kommunikációban vesz részt, ezzel erősítve a differenciációs szignált (Arthur és mtsai, 2006). A teljes Src aktivációhoz szükséges a fehérje katalitikus doménjében (Tyr 416) bekövetkező aktiváló foszforiláció (Piwnica-Worms és mtsai, 1987), valamint egyidejűleg a fehérje C-terminális végén (Tyr 527) lévő inaktíváló foszfátcsoport eltávolítása (Cooper és mtsai, 1986; Martin, 2001). A Src inaktíválódása több úton keresztül is megvalósulhat. A Src C-terminális végén található tirozin oldalláncon történő gátló foszforilációt (Cheng és mtsai, 1996; 2001) egy specifikus kináz, a Csk (C-terminális Src kináz) katalizálja. Az inaktívációhoz a Src fehérje ép SH2- és SH3-doménnel kell, hogy rendelkezzen (Superti-Furga és mtsai, 1993). Az aktív Src azonban az ubikvitin-proteaszóma úton keresztül is degradálódhat (Hakak és Martin,

1999). Munkánk során ezt az inaktivációs utat gátolva vizsgáltuk a Src jelátviteli molekula szerepét a PC12 sejtek szignalizációs folyamataiban.

A PI3K-út az Akt aktiválása révén elsősorban a sejtek túlélését (Ashcroft és mtsai, 1999) közvetíti. A PI3K többszörösen foszforilált lipidszármazékok képződését serkenti. Ezek a PDK-n (3-foszfoinozítid-függő kináz) keresztül az Akt foszforilációjának és működésének fokozódásához vezetve mozdítják elő a sejt túlélést (Wang és mtsai, 2004). Feltételezik, hogy a Src szerepet játszhat az NGF-indukált, PI3K-függő neuritnövekedésben is (Kremer és mtsai, 1991) (**3. ábra**).



3. ábra Az NGF által előidézett neuronális differenciáció jelátvitel. Az NGF sejtfelszíni receptorához kötődve receptor dimerizációt, majd auto-/transzfoszforilációt eredményez. Az így létrejövő p-Tyr oldalláncokhoz SH2-doménnel rendelkező fehérjék kapcsolódnak. Ilyen pl. a GAP, ami a Ras inaktivációjában játszik fontos szerepet, különböző adapter fehérjék (Shc, Grb2), melyek a GEF-et (Sos) működésbe hozva aktiválják a Ras-t. Az aktivált Ras egy MAPK-kaszkádot indít be, melynek tagjai a Raf, MEK és az ERK. Az aktivált ERK a sejtmagba is bejut, hogy ott transzkripciós faktorokat foszforilálva szabályozza a gének expresszióját. Ennek következtében a sejtek fenotípusos változásai a neuronális

differenciáció irányába tolódnak. Egyéb SH2-doménnel rendelkező fehérjék még a PLC- γ és a PI3K. Utóbbi az Akt utat aktiválja a PDK-n keresztül és elsősorban a sejtek túlélését serkenti, de a differenciációban is szerepet játszhat. Ebbe az útvonalba valószínűleg a Src is bekapcsolódik, ami szintén egy SH2-domént tartalmazó fehérje, és ami a Ras-ERK út aktiválásában is részt vesz. Az ábrán feltüntetett sejtalkotók a Servier Medical Art felhasználásával készültek, melyet a Servier biztosít egy „Creative Commons Attribution 3.0 unported license” alatt.

1. 4. Az apoptózis jelátvitel

Az apoptózis, ami lényegében a sejtek „öngyilkosságát” jelenti, a programozott sejthalál egyik legalaposabban tanulmányozott formája. Ez a folyamat fiziológiásan is

előfordul az emberi szervezetben a sejtek, szövetek homeosztázisának fenntartása, az embrionális fejlődés, az immunválasz szabályozása, vagy az öregedés során. Ha az apoptózis nem megfelelő mértékű, akkor az betegségek kialakulásához járulhat hozzá (Ola és mtsai, 2011). Túzott apoptózis figyelhető meg neurodegeneratív betegségek, ischaemiás kórképek, toxin-indukálta megbetegedések, vagy pl. az AIDS kialakulása során, míg az apoptózis nem elégséges szintje daganatok, autoimmun kórképek vagy vírusfertőzések kialakulásához vezethet.

Apoptózis során a sejtmembrán végig intakt marad, és a sejt az őt körülvevő szövetek károsodása, gyulladással járó folyamatok előidézése nélkül pusztul el. A programozott sejthalál folyamata közben a sejtek számos morfológiai és funkcionális változáson mennek keresztül. Ilyen például az apoptotikus testek lefűződése, a kromatin kondenzációja, valamint a DNS internukleoszómális hasítása endonukleázok által, amit a sejtmag fragmentációja követ. Fontos változás ezeknek a sejteknek a membránjában a foszfatidil-szerin externalizáció, mely ezt követően, úgynevezett „eat me signal”-ként szolgál a környező fagocita sejtek számára, illetve Annexin V jelöléssel laboratóriumi körülmények között egyszerűen ki is mutatható.

Ezen kívül fontos jelátviteli változások is bekövetkeznek az apoptózis során, mint pl. a stressz jelátviteli utak elnyújtott aktivációja, vagy a kaszpáz-3 proteolitikus hasítása, ami az enzim aktivációjához vezet (Goldar és mtsai, 2015). A kaszpáz-3 az apoptózis fontos, effektor proteázaként ismert, mivel az általa katalizált proteolitikus hasítások vezetnek az apoptózisra jellemző, az előzőekben ismertetett változásokhoz. Az enzim aktiválása több útvonalon keresztül is megvalósulhat: (1) az extrinsic apoptotikus úton, ami sejtfelszíni halálreceptorokról indul, (2) az intrinsic, vagy mitokondriális úton, (3) az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz által indukált apoptotikus útvonalon keresztül, (4) az apoptózis-indukáló proteáz, granzim B által aktivált úton, ami az immunrendszer citotoxikus T limfocitáira és természetes ölüsejtjeire (NK-sejtek) jellemző, valamint (5) a nukleáris útvonalon keresztül, amihez specifikus nukleáris organellumok szükségesek, de ebben az útvonalban a kaszpáz aktiváció mechanizmusa még nem tisztázott (Mohamed és mtsai, 2017). A felsorolt mechanizmusok közül az első háromnak van jelentősége az általunk is végzett vizsgálatok szempontjából, ezért a továbbiakban csak ezeket részletezzük.

1. 4. 1. Az extrinsic út

Az extrinsic út (**4. ábra 1. rész**) aktiválódása során a többnyire immunsejtek által szekretált halálligandok (pl. TNF- α = Tumor necrosis factor α , Fas-ligand, TRAIL = TNF-related apoptosis-inducing ligand) a halálreceptorokhoz kapcsolódnak. A TNF-receptor 1-hez és 2-höz (TNFR1/2) a TNF- α , a Fas-hoz a Fas-ligand (FasL), a death receptor-4-hez és 5-höz (DR4, DR5) pedig a TRAIL képes kapcsolódni (Bertheloot, 2021). Ezt követően a halálreceptorok oligomerizációja történik, melyet adapter fehérjék (TRADD = TNFR-associated death domain protein vagy FADD = Fas-associated death domain protein) és az iniciátor prokaspázok (prokaspáz-8 és -10) megkötése kíséri, létrehozva egy jelátviteli komplexet (DISC = death-inducing signaling complex), melyben megtörténik a prokaspázok proteolitikus aktivációja, és ennek következtében többek között az effektor prokaspáz-3 aktivációja is közvetlen, vagy közvetett úton, ami az apoptózis már említett változásaihoz vezet.

1. 4. 2. Az intrinsic út

Az apoptózis intrinsic útjának (**4. ábra 2. rész**) aktiválódása a mitokondriumok külső membránjának permeabilizációjához (MOMP = mitochondrial outer membrane permeabilization) vezet (Chipuk és mtsai, 2006), ezért nevezik ezt az útvonalat mitokondriális útnak is. Ebben az esetben a kiváltó ok a sejten belül található, mint például a DNS károsodás, ami a p53 tumorsuppresszor fehérjét aktiválja. A p53 transzkripciós faktorként működve befolyásolja különböző, az intrinsic út szabályozásában fontos szerepet játszó, a Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) családba tartozó fehérjéket kódoló gének expresszióját. A Bcl-2 család magában foglal pro- és anti-apoptotikus fehérjéket is (**1.táblázat**) (Lopez és Tait, 2015; Ghosh Roy és mtsai, 2014). A sejtek élettartama ezeknek a pro-apoptotikus és anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjéknek az egyensúlyán múlik. Ennek a felborulása betegségek (pl. daganatok, autoimmun betegségek, neurodegeneratív kórképek) kialakulásához vezethet (Ghosh Roy és mtsai, 2014). A Bcl-2 család tagjai egy vagy több Bcl-2 homológia (BH) domént tartalmaznak. Az anti-apoptotikus Bcl-2 családtagok 4 BH-doménnel rendelkeznek (BH1-4) és általa blokkolják az apoptózist, hogy a pro-apoptotikus társaikhoz kötődve gátolják azok

aktivitását (Chipuk és mtsai, 2004; Czabotar és mtsai, 2014). Legismertebb képviselőik a Bcl-2, amiről maga a család is a nevét kapta, valamint a Bcl-xL (Bcl-extralarge). A pro-apoptotikus Bcl-2 családtagok két csoportra oszthatók BH-doménjeik alapján. Egyrészt ismerünk pro-apoptotikus multi-domén fehérjéket (Bax = Bcl-2-associated X protein, Bak = Bcl-2 homologous antagonist/killer), amik BH1, 2 és 3 doménnel rendelkeznek és a MOMP előidézésében közvetlenül részt vesznek, másrészt léteznek pro-apoptotikus „BH3-only” fehérjék, melyek csak BH3 domént tartalmaznak és a multi-domén fehérjék működéséhez járulnak hozzá (Mohamed és mtsai, 2017). A „BH3-only” fehérjéket tovább oszthatjuk aktivátorokra (Bim = Bcl-2 interacting mediator of cell death, Bid = BH3 interacting-domain death agonist, Puma = p53 upregulated modulator of apoptosis) és érzékenyítőkre (Bad = Bcl-2 associated agonist of cell death, Bik = Bcl-2-interacting killer, Noxa) (**1.táblázat**). Az aktivátorok közvetlenül képesek az effektor Bax-hoz és a Bak-hoz kötődni, ami azok konformáció változását és oligomerizációját idézi elő. Ezek a fehérje komplexek aztán pórusokat hoznak létre a mitokondriumok külső membránjában. Az érzékenyítők pedig úgy járulnak hozzá az apoptózis folyamatához, hogy a Bax és Bak szekvesztrációjában szerepet játszó anti-apoptotikus családtagokat gátolják (Bertheloot és mtsai, 2021; Correia és mtsai, 2015; Lopez és Tait, 2015; Yip és Reed, 2008).

Bcl-2 család			
anti-apoptotikus	pro-apoptotikus		
Bcl-2 Bcl-xL	multi-domén	BH3-only	
	Bax Bak	aktivátorok	érezékenyítők
		Bid	Bad
		Bim	Bik
	Puma	Noxa	

1. táblázat A Bcl-2 családba tartozó fehérjék, és azok csoportosítása.

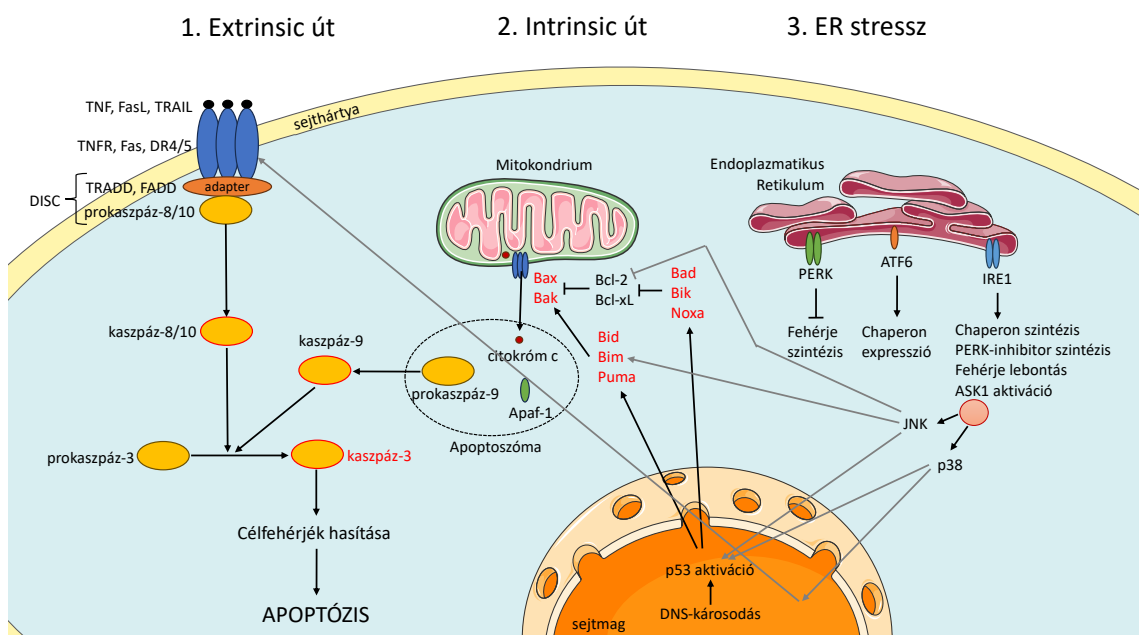
A mitokondriumok külső membránjának permeabilizálása -más molekulák mellett- citokrómmal felszabaduláshoz vezet, ami pedig az Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) -gyel és prokaspáz-9 -cel együtt az apoptoszómák felépítésében vesz részt. A komplexben aktiválódó kaszpáz-9 az effektor kaszpáz-3-at, -6-ot és -7-et hasítja, és ezzel aktiválja, ami pár percen belül apoptózishoz vezet (Mohamed és mtsai, 2017; Koff JL és mtsai, 2015; Lopez és Tait, 2015; Ghosh Roy és mtsai, 2014).

1. 4. 3. Az ER stressz által kiváltott apoptózis

Az ER stressz az endoplazmatikus retikulum működési zavara miatt alakul ki, és elsősorban a nem-, vagy rosszul hajtogatott fehérjék felhalmozódásával jellemezhető. Ez az állapot egy úgynevezett „unfolded protein response” (UPR)-t vált ki a sejten belül, hogy elhárítsa a kialakult problémát. Ugyanakkor a krónikus, vagy megoldatlan ER stressz a sejtek apoptózisát idézi elő (**4. ábra 3. rész**). Az ER stressz által kiváltott UPR -amit az „unfolded” fehérjék és a chaperonok közti egyensúly felborulása aktivál- három ismert jelátviteli úton keresztül valósul meg (Tabas és Ron, 2011). Először a PERK (protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase) kináz által közvetített útvonal aktiválódik, ami mindenekelőtt a további fehérjeszintézist gátolja. Ezt követi az ATF6 (activating transcription factor-6) transzkripciós faktor proteáz hasítás általi aktivációja, ami elsősorban az ER chaperon fehérjéinek expresszióját fokozza, majd a kombinált nukleáz és kináz IRE1 (inositol-requiring protein-1) által közvetített útvonalnak köszönhetően további chaperonok, valamint a PERK-inhibitor szintézisének kívül beindul a fehérjelebontás is. Ezeknek a folyamatoknak a célja a fiziológias ER funkció visszaállítása a további fehérjék szintézisének megakadályozásával, a már elkészült fehérjék hajtogatásának elősegítése, valamint a képződött fehérjeaggregátumok degradációja (Szegezdi és mtsai, 2006), amiknek nagy jelentőséget tulajdonítanak pl. a neurodegeneratív betegségek kialakulásában is, és amely folyamatban a proteaszómák működése elengedhetetlen.

Ha a károsodás olyan mértékű, hogy mégsem sikerül visszaállítani a megfelelő ER funkciót, akkor beindul az apoptózis folyamata. Az ER stressz az anti-apoptotikus Bcl-2 gátló leszabályozását (ún. down-regulációját), ugyanakkor a pro-apoptotikus Bim és Puma serkentését (ún. up-regulációját), valamint a Bax és Bim aktivációját idézi elő (Tabas és Ron, 2011; Puthalakath és mtsai, 2007). Ezek a változások mind az apoptózis folyamatához járulnak hozzá. Az ERK, ami a sejttúlélés szabályozásában is részt vesz, képes foszforilálni a Bim-et, ami annak ubiquitinációjához és proteaszómális degradációjához vezet. ER stressz hatására a PP2A (protein phosphatase 2A) eltávolítja a Bim-ről ezt a gátló foszfátcsoportot, így megakadályozva annak proteaszómális lebontását (Puthalakath és mtsai, 2007). ER stressz következtében a JNK tartós aktivációja is megfigyelhető (Tabas és Ron, 2011; Li és mtsai, 2010). Az IRE1 az ASK1-

et is képes aktiválni, ami a JNK és a p38 utakat is beindítja. Az aktivált JNK a Bcl-2 gátló, valamint a Bim aktiváló foszforilációjával járul hozzá az apoptózis folyamatához (Szegezdi és mtsai, 2006). Ugyanakkor a p38 egy pro-apoptotikus transzkripciós faktort aktivál, ami olyan gének expresszióját fokozza (pl. DR5), amelyek hozzájárulnak a sejthalálhoz (Sano és Reed, 2013). Ezekon a hatásokon kívül mindkét stressz kináz képes a p53-at aktiválni, aminek következtében beindul az apoptózis intrinsic útja is (Mielke és Herdegen, 2000; Ghosh és mtsai, 2011).



4. ábra Az apoptózis jelátvittele

(1) Az extrinsic apoptotikus út aktiválódása során a sejten kívülről érkező halálligandok (TNF, FasL, TRAIL) a halálreceptorokhoz (TNFR, Fas, DR4/5) kötődve receptor oligomerizációt váltanak ki, melyet adapterfehérjék (TRADD, FADD) és iniciátor prokaspázok (prokaspáz-8/10) megkötése követ, így kialakítva az úgynevezett DISC komplexet, melyben megtörténik ezen kaspázok proteolitikus aktivációja (kaspáz-8/10). (2) Az intrinsic utat a sejten belüli változások indítják be. A DNS-károsodás például p53 aktivációt vált ki, ami végső soron a Bax és Bak pro-apoptotikus Bcl-2 fehérjék aktivációja révén, azok oligomerizációjához, a mitokondriális külső membrán permeabilizációjának fokozódásához, és következményes citokróom c felszabaduláshoz vezet. A citokróom c molekulák Apaf-1-gyel és prokaspáz-9-cel kapcsolódva létrehozzák az apoptoszómát, melyben megtörténik az iniciátor prokaspáz-9 aktivációja (kaspáz-9). Az eddig tárgyalt két út közös végpontja az effektor prokaspáz-3 iniciátor kaspázok általi proteolitikus hasítása és aktiválása (kaspáz-3), ami célfehérjéinek hasítása révén beindítja az apoptózis jellegzetes

változásait a sejtben. (3) Az ER stressz lényegében az unfolded fehérjék és a chaperonok közti imbalance következtében alakul ki, melynek megoldására a PERK aktiváció a fehérjeszintézis gátlását, az ATF6 út a chaperon expresszió fokozódását, míg az IRE1 aktiváció a chaperon- és PERK-inhibitor szintézisét, a fehérjelebonthatóság fokozódását, valamint ASK1 aktivációt vált ki. A krónikus ER stressz pl. az ASK1 általi p38 és JNK aktiválása révén képes apoptózist indukálni többek között a p53 aktiválása, az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjék gátlása és a pro-apoptotikus Bcl-2 családtagok aktivitásának fokozása, valamint egyéb transzkripciós faktorok aktiválásának következtében pl. a DR5 halálreceptor expressziójának fokozása révén. Az ábrán feltüntetett sejtalkotók a Servier Medical Art felhasználásával készültek, melyet a Servier biztosít egy „Creative Commons Attribution 3.0 unported license” alatt.

1. 5. Az ubikvitin-proteaszóma rendszer (UPS)

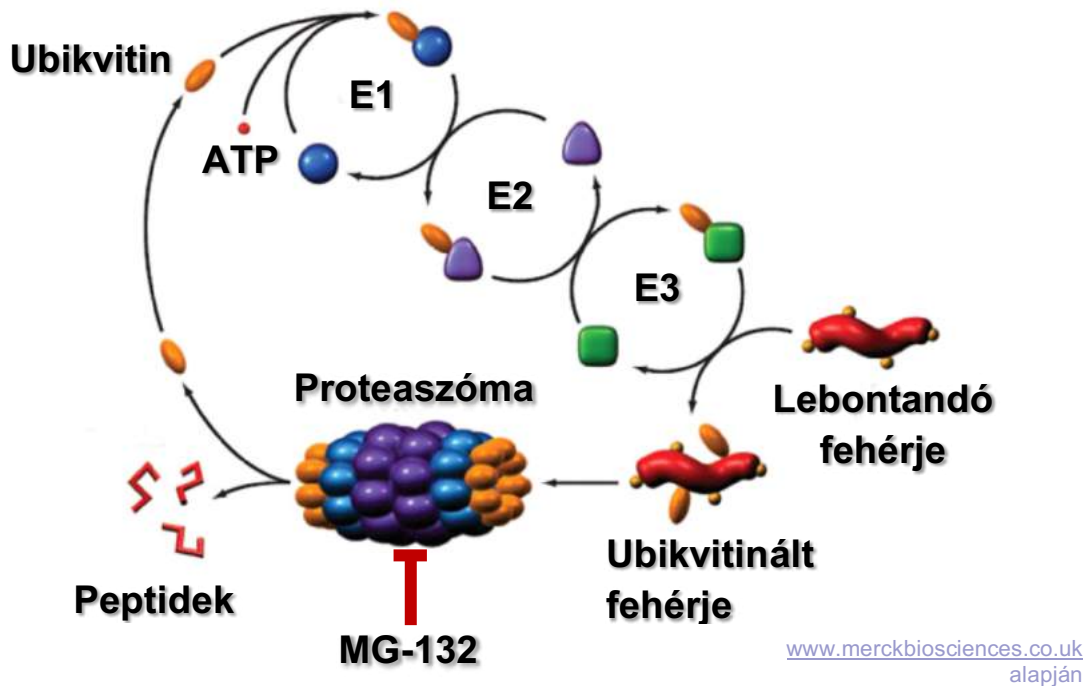
A már szükségtelemmé vált, rosszul hajtogatott, vagy valamilyen módon károsodott fehérjék precízen szabályozott lebontására az ubikvitin-proteaszóma rendszer nyújt megoldást a sejtekben (Ciechanover, 1998). A rendszer jelentőségét mutatja, hogy az intracelluláris fehérjék kb. 80 %-a ezen az útvonalon keresztül bomlik le (Kubiczkova és mtsai, 2014). A poli-ubikvitinált fehérjéket a 26S proteaszóma komplex ismeri fel, majd ezt követően proteolitikus aktivitásánál fogva alkotóelemeire bontja őket (Glickman és Ciechanover, 2002). Az UPS működése (5. ábra) során első lépésként a célfehérjékhez kovalens kötésekkel ubikvitin molekulák kapcsolódnak (Seufert és Jentsch, 1992; Rechsteiner, 2004). Az ubikvitin egy erősen konzervált, 76 aminosavat tartalmazó protein, amit egy 3 enzimből álló enzimszisztéma kapcsol a lebontandó fehérje lizin oldalláncjaihoz (Hershko és Ciechanover, 1998). A poli-ubikvitinációt végző enzimszisztéma tagjai az ubikvitin-aktiváló (E1), az ubikvitin-konjugáló (E2) és az ubikvitin-ligáz (E3) enzimek (Hershko és Ciechanover, 1992; Ciechanover, 1994). Az E1 enzim az ubikvitin monomert ATP jelenlétében aktiválja a C-terminális glicin és az E1 enzim katalitikus ciszteinje között létrejövő magas energiájú tioészter kötés kialakításával (Haas és mtsai, 1982). Az aktivált ubikvitin ezután átvándorlik az E2 reaktív cisztein oldalláncára (Liu és mtsai, 2020). Végül az E3 enzim az ubikvitint az E2-ről áthelyezi a szubsztrát fehérje reaktív lizin oldalláncának amino csoportjára (Buetow és Huang, 2016). Az előző lépések ismétlődésével és az ubikvitin molekulák izopeptid kötéssel történő egymáshoz kapcsolódásával alakulnak ki a poli-ubikvitin láncok, ami aztán a proteaszómához irányítja a lebontandó fehérjét. A rendszer specificitását mutatja, hogy az E1 enzimekből 2 félével, az E2-ből 60, míg az E3 ubikvitin-ligázokból több, mint 600

különböző, a szubsztrátfehérjére specifikus enzimet ismerünk (Buetow és Huang, 2016). Ez nagyon fontos a sejtekben végbemenő jelátviteli folyamatok szabályozásában, mivel egy bizonyos jelátviteli fehérjét csak a neki megfelelő E3 ubikvitinálhat, ily módon biztosítva annak a megfelelő időben történő, precízen szabályozott lebontását a 26S proteaszóma komplexen keresztül (Toma-Fukai és Shimizu T, 2021). Egyik legjobban ismert E3 ubikvitin-ligáz az Mdm2 (mouse double minute 2), amely a p53 tumor szuppresszor fehérjét képes poli-ubikvitinálni, amit a p53 proteaszómális lebontása követ (Yang és Yu, 2003). Az Mdm2 túlzott működése ennek megfelelően különféle tumorok kialakulásának kedvez (Wade és mtsai, 2013). Bízató eredményekkel használnak ubikvitin-ligáz gátlókat (pl. Nutlin) p53 pozitív tumorok terápiájában (Yee-Lin és mtsai, 2018).

A proteaszómák nagyméretű multienzim komplexek, melyek a sejtek magjában és a citoplazmában helyezkednek el. A komplex proteolitikus magja a 20S proteaszómaként ismert, többszörös peptidáz aktivitással rendelkező katalitikus rész (Coux és mtsai, 1996), amely 4 heptamer gyűrűbe ($\alpha 7$, $\beta 7$, $\beta 7$, $\alpha 7$) rendeződött henger alakú struktúrát hoz létre (da Fonseca és mtsai, 2012). Az α -alegységek a két külső, a β -alegységek pedig a két belső gyűrűt alkotják. A szubsztrát eljutását a komplex aktív részéhez az α -alegységek segítik, melyek csak az ubikvitinált, térszerkezetüket elvesztett polipeptideket engedik át (Goldberg, 2007). A proteolitikus aktivitás a β -alegységekhez kötött. A $\beta 1$ kaszpáz-szerű, a $\beta 2$ tripszin-szerű, a $\beta 5$ alegység pedig kimotripszin-szerű aktivitással rendelkezik (Heinemeyer és mtsai, 1997). A 20S központi katalitikus rész egyik, vagy mindkét oldalához úgynevezett 19S fedő struktúra kapcsolódik, ami felismeri a poli-ubikvitin szignált és a fehérjét kihajtogatja, mielőtt a katalitikus rész felé továbbítaná (Goldberg, 2007). Az ubikvitin molekulákat deubikvitináló (DUB) enzimek vágják le a lebontandó fehérjéről, majd az így felszabaduló ubikvitin más proteinekhez kötődve újrahasznosul (Reyes-Turcu, 2009) **(5. ábra)**.

Az ubikvitin-proteaszóma rendszer fontos szerepet tölt be a sejtciklust, sejtproliferációt, differenciációt, apoptózist és a gyulladást szabályozó fehérjék lebontásában (Hattori és mtsai, 1999), ezzel befolyásolva különböző jelátviteli utak aktivációs állapotát. Emellett például oxidatív stressz, vagy mutáció által létrejött abnormális fehérjéket is megsemmisít, így megelőzve, hogy azok felborítsák a sejt homeosztázisát. Az UPS nem megfelelő működése bizonyítható különböző betegségek

hátterében, mint például tumorokban (Petroski, 2008), neurodegeneratív kórképekben (Ciechanover és Brundin, 2003), vagy autoimmun/gyulladásos megbetegedésekben (Mohty és mtsai, 2013).



5. ábra Az ubiquitin-proteaszóma rendszer működése

Egy 3 enzimből álló enzimrendszer (E1, E2 és E3) ATP felhasználásával ubiquitin molekulákat kapcsol a lebontandó fehérjéhez. A poli-ubikvitinált fehérjéket a proteaszóma bontja alkotórészeire, míg a felszabaduló ubiquitin molekulákat újra felhasználhatja a rendszer. Az MG-132 a proteaszóma proteolitikus funkcióját gátolva képes megakadályozni bizonyos fehérjék specifikus lebontását.

1. 6. Proteaszóma gátlók

Különböző típusú proteaszóma gátlókat ismerünk, melyeket kémiai szerkezetük alapján csoportosíthatunk. A legismertebbek közé tartoznak a peptidil-aldehid, peptid-boronát, epoxiketon és β -lakton típusú vegyületek (2.táblázat).

Az első azonosított proteaszóma gátló a laktacisztin volt, amely a természetben is előforduló, egyes *Streptomyces* baktériumok által termelt β -lakton típusú vegyület, melyre neuritogenezist indukáló hatása miatt figyeltek fel (Omura és mtsai, 1991). Proteaszóma gátló aktivitására csak később, 1995-ben derült fény (Fenteany és mtsai,

1995). Biológiaiilag aktív formája a *clasto*-lactacystin- β -lactone, más néven omuralid spontán átalakulással jön létre vizes közegben, neutrális pH-n a tenyésztő médiumban (Dick és mtsai, 1996; Corey és Li, 1999; Kisselev és Goldberg, 2001). Ez a származék aztán pszeudoszubsztrátként irreverzibilisen gátolja a proteaszóma működését úgy, hogy kovalens kötéssel kapcsolódik a β -alegységek aktív centrumában lévő treoninok hidroxil-csoportjaihoz (Fenteany és mtsai, 1995; Dick és mtsai, 1996; Lee és Goldberg, 1996).

A jelen munkában használt MG-132 (más néven carbobenzoxyl-leucinyll-leucinyll-leucinal, Z-Leu-Leu-Leu-al, Cbz-LLL vagy z-LLL) a szintetikus, peptidil-aldehid típusú proteaszóma gátló vegyületek közé tartozik (Moore és mtsai, 2008). A sejthártyán könnyedén átjutva, reverzibilis módon képes gátolni elsősorban a proteaszóma kimotripszin szerű aktivitását (Lee és Goldberg, 1998), ezzel befolyásolva többek között számos jelátviteli fehérje lebontását (Ma és mtsai, 2018). A peptidil-aldehid típusú proteaszóma gátlók peptidomimetikumként, reverzibilisen kötődnek a proteaszóma aktív centrumában lévő treonin aminosavakhoz (Moore és mtsai, 2008). Ezen kívül más proteázokat (kalpainokat és bizonyos lizoszómális cisztein proteázokat) is képesek gátolni, bár ezeket csak magasabb koncentrációban (Lee és Goldberg, 1998).

Az epoxiketonok csoportjába tartozó epoxomicin kovalensen képes kötődni a proteaszóma katalitikus β -alegységeinek aktív centrumában lévő treoninjaihoz (Meng és mtsai, 1999; Kisselev, 2021), és ily módon irreverzibilisen képes gátolni a proteaszómák működését. Elsősorban a β 5 alegység kimotripszin-szerű aktivitását gátolja, ami a legmeghatározóbb proteaszómális funkció. A másik két proteáz aktivitás blokkolásához 100-1000-szeres koncentráció szükséges (Meng és mtsai, 1999). Más proteázok aktivitását, mint például a kalpainét vagy a katepszinét, egészen 50 μ M-os koncentrációig nem befolyásolja (Meng és mtsai, 1999; Kisselev és Goldberg, 2001).

A legismertebb proteaszóma gátlók közé tartozik a peptid-boronátok legtöbbet vizsgált képviselője, a Bortezomib (BTZ, PS-341, Velcade[®]), amelyet 2003-ban az amerikai FDA (Food and Drug Administration) myeloma multiplex (plazmocitoma) kezelésére hagyott jóvá (Kane és mtsai, 2003), és azóta egyre szélesebb körben alkalmazzák, elsősorban hematológiai tumorok terápiájában. A boronát típusú vegyületek a peptidil-aldehidekhez hasonlóan peptidomimetikumként, reverzibilis módon gátolják a proteaszóma aktivitását (Adams és Kauffman, 2004). A myeloma multiplex tumorsejtjei jóval érzékenyebbek a proteaszóma gátló kezelésre, mint az egészséges sejtek (Meister

és mtsai, 2007), mivel bennük nagymértékű fehérjeszintézis folyik, valamint fokozott NF- κ B (nuclear factor- κ B) aktivitásukat is megfigyelték az egészséges hematopoetikus sejtekhez viszonyítva (Kubiczkova és mtsai, 2014). A gyors fehérjeszintézis több rosszul hajtogatott fehérjemolekulát eredményezhet, melyek sejtől való eliminációjához a proteaszómák megfelelő működése elengedhetetlen. Ugyanakkor az NF- κ B aktiválásához is szükség van a proteaszómák működésére, mivel amellet, hogy azok az NF- κ B transzkripciós faktort inaktiváló inhibitor- κ B (I κ B) lebontásáért felelősek (McConkey és Zhu, 2008), az aktív NF- κ B alegységek kialakulásához is szükség van azok proteaszómális hasítására (Palombella és mtsai, 1994, McConkey és Zhu, 2008). Ennek megfelelően, ha a proteaszóma aktivitás gátolt, a rosszul hajtogatott fehérjék felhalmozódása ER-stresszhez és UPR-hoz vezet, valamint az NF- κ B aktivitás is csökken. A proteaszóma aktivitás kb. 80%-os csökkenése nem befolyásolja az egészséges sejtek működését, ugyanakkor egy ilyen mértékű gátlás már a myeloma multiplex sejtek apoptózisához vezet (Kubiczkova és mtsai, 2014).

Sokféle új generációs proteaszóma gátló kipróbálását és számos klinikai vizsgálatot követően 2012-ben egy, az epoxiketonok közé tartozó szert, a Carfilzomibot (PR-171, Kyprolis[®]) (Steele, 2013), 2015-ben pedig egy újabb boronát típusú vegyületet, az Ixazomibot (MLN 9708, Ninlaro[®]) (Shirley, 2016) is jóváhagyta az FDA, szintén a myeloma multiplex kezelésére. Ez utóbbinak nagy előnye, hogy szájon át szedhető, míg az előzőek esetében intravénás (esetleg szubkután) adagolás szükséges (Teicher és Tomaszewski, 2015).

Proteaszóma gátló csoport	Példa vegyület
β -lakton	laktaciszтин (<i>clasto</i> -lactacystin- β -lactone)
peptidil-aldehyd	MG-132
peptid-boronát	Bortezomib, Ixazomib
epoxiketon	Epoxomicin, Carfilzomib

2. táblázat Proteaszóma gátló csoportok és ismertebb példa vegyületeik

Az FDA által jóváhagyott vegyületeket pirossal jelöltük.

2. Célkitűzések

Munkánkat Hashimoto és munkatársai 2000-ben publikált tanulmánya inspirálta, amelyben a peptidil-aldehid, N-acetil-Leu-Leu-norleucinál és a laktacisztin proteaszóma gátlókkal végzett kezelések a PC12 sejtek neuronális differenciációját indukálták. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy vajon egy másik peptidil-aldehid típusú proteaszóma gátlót, az MG-132 alkalmazva is kiváltható-e a PC12 sejtek neuronális differenciációja és ennek háttérében milyen jelátviteli változásokat találunk? Kísérleteink során azonban azt tapasztaltuk, hogy az MG-132 kétfázisú választ vált ki ebben a sejtvonalba. A kezdeti neuritogenezist követően a hosszan tartó (24 óránál hosszabb) kezelések során inkább már az apoptózis jelei domináltak, ezért úgy döntöttünk, hogy a kétféle folyamatot külön is megvizsgáljuk.

Munkacsoportunk előző munkáiból már kiderült, hogy az MG-132 kezelés tartós ERK aktivációt és az aktív ERK nukleáris transzlokációját indukálja PC12 sejtekben (lásd Dr. Berta Gergely PhD dolgozata, PTE ÁOK, 2013/14), ami ebben a sejtvonalba a neuronális differenciáció szükséges előfeltétele.

Jelen munkánk első felében vizsgálni kívántuk a PC12 sejtek MG-132 által indukált neuritogenezise során

- a Src tirozin kináz szerepét,
- a már ismert ERK aktiváció mechanizmusát (a MEK és Ras fehérjék ERK aktivációban betöltött szerepét),
- a Src és ERK jelátviteli fehérjék aktivációja közti kapcsolatot,
- a nagy affinitású NGF-receptor, TrkA szerepét ebben a folyamatban,
- az aktív, megfelelően foszforilált p-Src és p-ERK intracelluláris elhelyezkedését (különös tekintettel a p-ERK Src-gátlást követő eloszlására),
- a sejtek morfológiáját Src-gátló hiányában és annak jelenlétében és
- ezek alapján fel szeretnénk volna térképezni azokat a jelátviteli utakat, melyeknek kitüntetett szerepük van a neuritnövekedés folyamatában.

Munkánk második felében vizsgálni kívántuk a PC12 sejtek tartós MG-132 kezelése következtében megfigyelhető apoptózisa során

- a sejtek apoptózisának mértékét különböző módszerekkel,

- a sejtek túlélésében (Akt) és apoptózisában (p38, JNK, c-Jun és kaszpáz-3) szerepet játszó néhány jelátviteli molekula aktivációjának kinetikáját,
- a p-p38, p-JNK és p-c-Jun intracelluláris elhelyezkedését,
- az Akt, p38, JNK és c-Jun aktiváció alakulását különböző kináz gátlók (LY294002, SB203580, SP600125) jelenlétében, illetve a Ras gátlása esetén (M-M 17-26 sejtvonala), valamint
- ezek alapján megpróbáltunk felvázolni egy jelátviteli hálózatot a vizsgált molekulák között.

A jelátviteli molekulák aktivációs állapotát Western blot analízissel, az aktív fehérjék intracelluláris elhelyezkedését lézer pásztázó konfokális fluoreszcens mikroszkóppal, a sejtek morfológiai változásait az említett mikroszkópot fáziskontraszt módban használva vizsgáltuk, míg az apoptotikus sejtek százalékos arányának meghatározására a magmorfológia vizsgálata mellett, áramlási citometriát és sejtéletképességi vizsgálatokat végeztünk.

3. Anyagok és módszerek

3. 1. Reagensek

Minden használt vegyszert a Sigma-tól (Saint Louis, MO, USA) vásároltunk, hacsak azt a módszertani leírásokban másként nem jeleztük. Az NGF-et és a PP2 Src-inhibítort az Invitrogen-től (Paisley, Scotland, UK) szereztük be. A 2,5 μ M végkoncentrációban alkalmazott MG-132 (Merck, Kenilworth, NJ, USA) egy erős és szelektív, sejtpermeábilis, peptidil-aldehid típusú proteaszóma gátló szer, amely reverzibilisen blokkolja a proteaszóma enzimaktivitását. A Hoechst 33342 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) egy fluoreszcens DNS-festék, melyet a sejtmagok láthatóvá tételére használtunk. Az AnnexinV-FITC-et (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) és a propidium-jodidot (PI) az apoptotikus sejtek azonosítására használtuk. A WST-1 (Roche, Mannheim, Németország) egy tetrazólium só, melyet a mitokondriális dehidrogenázok formazánná alakítanak. A képződött formazán mennyisége az élő sejtek arányának meghatározására alkalmas. A mérés során lényegében a mitokondriális dehidrogenázok aktivitását detektáltuk az élő sejtekben. Az LY294002 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) a foszfatidil-inozitol 3 kináz (PI3K) szelektív inhibitora, melyet 20 μ M koncentrációban alkalmaztunk. Ez a szer gátolja az Akt PI3K-függő serkentését és kináz aktivitását. A 10 μ M koncentrációban használt SB203580 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) egy szelektív p38-inhibitor, amely az enzim ATP-kötő doménjéhez való kötődésével elnyomja a p38 katalitikus aktivitását. Az 50 μ M koncentrációban használt SP600125 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) a JNK-1, -2 és -3 erős és szelektív ATP-kompetitív inhibitora. A Western blot lízispuffer 50 mM Tris bázist (pH 7,4), 150 mM NaCl-ot, 10% glicerint, 1 mM EGTA-t, 1 mM Na-ortovanadátot, 5 μ M ZnCl₂-t, 100 mM NaF-ot, 10 μ g/ml aprotinint, 1 μ g/ml leupeptin-t, 1 mM PMSF-t és 1% Triton X-100-at tartalmazott. A Western blot mintapuffer 7 ml 4x Tris-HCl/SDS-t (pH: 6,8), 3,8 g (~ 3 ml) glicerint, 1 g SDS-t, 0,93 g ditiotreitolt (DTT), 1,2 mg brómfenolkéket tartalmazott 10 ml desztillált vízben oldva. A Western blothoz használt TBS-Tween a következő összetevőkből állt: 10 mM Tris-bázis, 150 mM NaCl, 0,2% Tween-20, (pH 8,0). A Western blothoz használt ellenanyag

eltávolító („stripping”) puffer elkészítésekor 0,2 M glicin-HCl-t (pH 2,5) és 0,05% Tween 20-at oldottunk fel 1 liter desztillált vízben. A 4x koncentrált Tris-HCl/SDS oldat (pH: 6,8) 6,05 g Tris bázist és 0,4 g SDS-t tartalmazott 100 ml desztillált vízben. Az immunfluoreszcens mikroszkópiához használt PBS puffer (pH 7,4) 1,37 mM NaCl-ot, 0,27 mM KCl-t, 0,43 mM Na₂HPO₄·7H₂O-t, 0,14 mM KH₂PO₄-ot tartalmazott. A TBS puffer 50 ml 10x Tris HCl-t és 15 ml 5 M NaCl-t 435 ml desztillált vízben. A TBS-T puffer 0,1% Triton X-100-at tartalmazott TBS-ben oldva. A fixáláshoz 4%-os paraformaldehidet használtunk PBS-ben (pH 7,4) oldva. Az AnnexinV-FITC és PI festést 0,01 M Hepes (pH 7,4), 0,14 M NaCl és 2,5 mM CaCl₂ tartalmú Annexin-kötő pufferben végeztük.

3. 2. Sejtek

Vad típusú PC12 és M-M17-26 (domináns negatív H-Ras fehérjét expresszáló) [12] patkány feokromocitóma sejteket egy napig 5% magzati borjúsérummal (FBS) és 10% hővel inaktivált lószérummal kiegészített Dulbecco's modified Eagle's mediumban (DMEM) (GIBCO, Paisley, Skócia) tenyésztettünk a megfelelő letapadás érdekében. Másnap a tápfolyadékot 0,5% lószérumot tartalmazó DMEM-re cseréltük 24 órára, hogy elcsendesítsük a szérum által stimulált jelátviteli útvonalakat a kezelések előtt és alatt. A tenyészeteket 37 °C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó párasított környezetben tartottuk. Mindkét sejtvonalat G.M. Cooper (Department of Biology, Boston University, MA) biztosította számunkra, Szeberényi József professzor közvetítésével.

3. 3. Proteaszóma gátló és kináz inhibitor kezelések

10⁶ sejtet ültettünk ki egyszerhasználatos Petri-csészékre vagy műanyag fedőlemezekre Thermanox (Nalgene Nunc International, Rochester, NY, USA). Ha ezt követően 1 nappal a sejtek egészséges fenotípust mutattak, és a tenyésztő felülethez tapadtak, akkor megkezdjük a kezelést. Különböző hosszúságú (5, 15, 30 perces, 1, 3, 6, 24,) kezeléseket végeztünk a proteaszóma gátló vegyületet (MG-132) 2,5 μM koncentrációban alkalmazva. A kináz inhibitorokat (LY294002, SB203580, SP600125)

1 órával a proteaszóma gátló hozzáadása előtt adtuk a tenyészetekhez, így mindkét vegyület jelen volt a 3 órás MG-132 kezelés alatt.

3. 4. Antitestek

A következő elsődleges antitesteket használtuk, melyeket -ha azt a szövegben máshogy nem jelöltük- a Cell Signaling Technology-tól (Danvers, MA, USA) rendeltük: foszfo-p44/42 MAP kináz a foszfo-ERK1/2 kimutatására 1:1000 (Western blot) vagy 1:300 (immunfluoreszcencia) hígításban, ERK-1 (C-16), ERK-2 (C-14) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 1:1000 (Western blot), foszfospecifikus (Tyr 418) poliklonális anti-Src (Biosource, Camarillo, CA, USA) 1:1000 (Western blot), monoklonális anti-aktív Src (Invitrogen), amely a Tyr 418-on foszforilált, de a Tyr 529-en nem foszforilált Src-t ismeri fel 1:1000 (Western blot) vagy 1:100 (immunfluoreszcencia) foszfo-TrkA 1:1000 (Western blot), TrkA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 1:1000 (Western blot), β -aktin 1:1000 (Western blot),

foszfo-Akt (Ser473) (D9E) XP nyúl mAb 1:1000 (Western blot), Akt 1:1000 (Western-blot), foszfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) 1:1000 (Western blot) vagy 1:200 (immunfluoreszcencia), p38 MAPK 1:1000 (Western blot), foszfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) 1:1000 (Western blot) vagy 1:200 (immunfluoreszcencia), SAPK/JNK 1:1000 (Western blot), foszfo-c-Jun (Ser73) 1:1000 (Western blot) vagy 1:200 (immunfluoreszcencia), c-Jun (60A8) nyúl mAb 1:1000 (Western blot), hasított kaszpáz-3 (Asp175) 1:1000 (Western blot), GAPDH (D16H11) XP Rabbit mAb 1:5000 (Western blot) hígításban.

Másodlagos antitestként tormagyökér-peroxidázzal (HRP)-konjugált kecske anti-nyúl IgG-t (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) alkalmaztunk 1:10 000 arányú hígításban a Western blothoz és Cy3-konjugált kecske anti-nyúl IgG-t (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cambridgeshire, UK) 1:600 hígításban az immunfluoreszcenciához.

3. 5. Fáziskontraszt mikroszkópia

A fent említett körülmények között tenyésztett PC12 sejtek fenotípusos változásait Olympus FluoView-1000 lézer pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkóppal elemeztük átmenő fényben, vagy fluoreszcenciával kombinált fáziskontraszt módban.

3. 6. Magfestés

4%-os paraformaldehydben történő fixálást és TBS-T-ben történő permeabilizálást követően a sejteket Hoechst 33342-vel inkubáltuk 10 percig szobahőmérsékleten. A magmorfológiát Olympus FluoView-1000 lézer pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkóppal dokumentáltuk. Apoptotikus jelnek tekintettük a kromatin kondenzációt és a nukleáris fragmentációt. Mintánként és látóterenként 100 sejtet vizsgáltunk meg, és ebből számítottuk ki az apoptotikus sejtek százalékos arányát.

3. 7. Áramlási citometria

A letapadó PC12 sejteket tripszin segítségével gyűjtöttük össze. Kétszeri PBS-ben történő mosást követően AnnexinV-FITC és PI festést végeztünk a gyártó utasításai szerint az apoptotikus és élő sejtek elkülönítése céljából. Röviden összefoglalva a módszert: 10^5 sejtet inkubáltunk 5 μ l AnnexinV-FITC-el 15 percig 100 μ l Annexin-kötő pufferben. Ezután a mintákat 400 μ l Annexin-kötő pufferrel hígítottuk, és közvetlenül az áramlási citometriás analízis előtt 1 μ l PI-t adtunk a mintákhoz. A mintákat FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) áramlási citométerrel analizáltuk a Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) szoftver segítségével. Az AnnexinV⁻PI⁻, AnnexinV⁺PI⁻ és AnnexinV⁺PI⁺ sejtpopulációkat FL1/FL2 fluoreszcenciájuk alapján különböztettük meg, és élő-, korai apoptotikus- vagy késői apoptotikus sejtekként azonosítottuk.

3. 8. A sejtek életképességi vizsgálata WST-1 méréssel

A sejtek életképességének meghatározására a WST-1 kolorimetriás esszét a gyártó utasításai szerint alkalmaztuk. Röviden összefoglalva: 2×10^4 sejtet az MG-132 kezelés után tovább inkubáltunk WST-1 jelenlétében 4 órán át 37°C -on. Az élő sejtek mitokondriális enzimeikkel a tetrazólium söt színes formazán terméké alakítják. A termelt formazán mennyisége korrelál a tenyészetben lévő metabolikusan aktív/élő sejtek számával. A minták optikai denzitását (O.D.) 450 nm-en mértük BMG Labtech Fluostar Optima mikrolemez-leolvasóval (BMG Labtech, Offenburg, Németország).

3. 9. Western blot

A Western blothoz a sejteket a tenyésztő médiumba kaparva gyűjtöttük össze. 4°C -on 1000 fordulat/perccel végzett 5 perces centrifugálást követően a médiumot leöntöttük, és a pelletet $100\ \mu\text{l}$ jéghideg lízispufferben szolubilizáltuk 30 percig. A mintákat ez után 13 500 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk 30 percig 4°C -on, hogy eltávolítsuk az oldhatatlan sejtrészeket. Meghatároztuk a felülúszók fehérjekoncentrációját (Detergent Compatible Protein Assay Kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), és SDS-tartalmú mintapuffert adtunk azonos mennyiségű fehérjékhez, majd 5 percig forraltuk azokat a fehérjék denaturációja érdekében. A mintákat SDS-t tartalmazó, 10%-os poliakrilamid gélben fehérjeméret szerint választottuk el, majd PVDF membránra (Hybond-P, GE Healthcare, UK) elektro-blottoltuk. A membránokat TBS-Tweenben oldott 3-5%-os zsírmentes tejjel, vagy 3%-os BSA-val blokkoltuk, majd ezt követően az elsődleges antitesteket a blokkoló oldathoz adva éjszakán át 4°C -on inkubáltuk. Ötszöri mosás után a membránokat 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel, melyeket ismét a megfelelő blokkoló oldatban hígítottunk. Az immunkomplexeket ECL reagenssel (Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP szubsztrát) tettük láthatóvá. A kemilumineszcens jeleket G:Box géldokumentációs rendszer (Syngene, Cambridge, UK) segítségével detektáltuk. A megkötött antitestek eltávolítása érdekében a membránokat forró „stripping” pufferrel mostuk 2x20 percig, majd a jelátviteli molekulák nem foszforilált formái, vagy a β -aktin, illetve a GAPDH elleni primer antitestek felhasználásával újra előhívtuk a minták egyenletes betöltésének

igazolása érdekében. A denzitometriát az ImageJ szoftverrel (National Institutes of Health, MD, USA) végeztük.

3. 10. Immunfluoreszcencia és konfokális mikroszkópia

A sejteket műanyag Thermanox fedőlemezeken (Nalgene Nunc International, Rochester, NY, USA) tenyésztettük. A kezeléseket 37 °C-os PBS-ben történő öblítéssel állítottuk le, majd a mintákat szobahőmérsékleten 1 órán át fixáltuk PBS-ben oldott 4%-os paraformaldehidben. A felesleges fixálószeret háromszori PBS-sel és háromszori TBS-sel történő mosással távolítottuk el a mintákról, majd a sejteket 1 órán át permeabilizáltuk TBS-T-ben. A nem specifikus kötőhelyek blokkolását TBS-T-ben oldott 3%-os BSA-val, vagy 5%-os zsírmentes tejjel végeztük 4 °C-on, 1 órán át, enyhe rázás mellett. A primer antitestekkel való inkubálás (éjszakán át, 4 °C-on) után a mintákat ötször mostuk TBS-T-ben, majd a Cy3-konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk sötétben 1 órán át, 4°C-on. TBS-T-ben történő ötszöri mosással ismét eltávolítottuk a nem kötődött antitesteket. A sejtmagokat Hoechst 33342-vel festettük. Végül a preparátumokat Vectashield-del (Vector Laboratories, Burlingame, CA) fedtük le. A fluoreszcens jeleket lézeres pásztázó konfokális mikroszkóppal detektáltuk, Olympus FluoView-1000 rendszer segítségével, 40-szeres kombinált fluoreszcencia és fázisobjektívvel.

3. 11. Statisztikai analízis

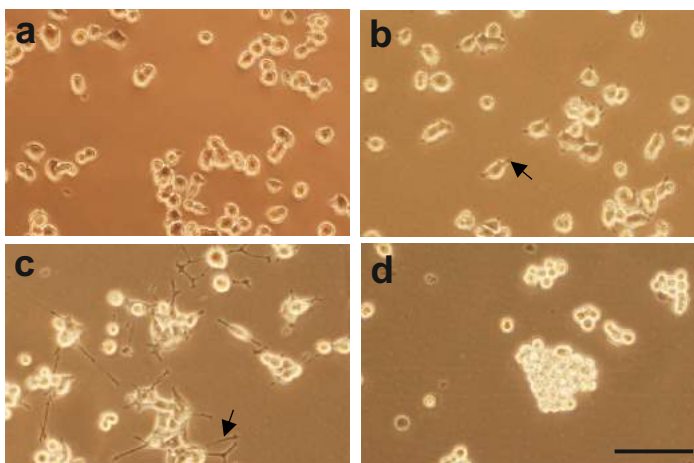
A kezelések hatásai közötti különbségek kimutatására egyutas ANOVA tesztet alkalmaztunk, az elsőfajú hiba kiküszöbölésére minden esetben Bonferroni post hoc tesztet használtunk. Az adatokat átlag és szórás (SD) megadásával ábráztuk. A 0,05-nél kisebb p-értéket szignifikánsnak tekintettük. A statisztikai elemzéseket az IBM SPSS Statistics v 24.0 szoftvercsomaggal (IBM's Corporate, New York, USA) végeztük.

A nukleáris és citoplazmatikus foszfo-ERK1/2 arányokat, ahol alkalmazható volt, úgy határoztuk meg, hogy a megfelelő átlagos pixelintenzitást elosztottuk, és páratlan t-teszt elemzésnek vetettük alá (P-érték <0,0001).

4. Eredmények

4. 1. A PC12 sejtek tartós MG-132 kezelés során tapasztalt morfológiai változásai

Annak eldöntése érdekében, hogy az MG-132 proteaszóma gátló vegyület képes-e kiváltani a PC12 sejtek neuronális differenciációját, fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk a sejtek morfológiai változásait tartós MG-132 kezeléseket során. A kezeletlen PC12 sejtek kerek formájúak (**6. ábra, a**), azonban 6 órás MG-132 kezelést követően már kis membrán nyúlványok voltak megfigyelhetők a felszínükön a kezdődő neuritogenezis jeleként (**6. ábra, b**). A kezelés 24. órájában hosszabb nyúlványok (neuritok) is láthatók voltak a legtöbb sejten (**6. ábra, c**), míg ezt követően a neuronális differenciáció jelei mérséklődni kezdtek (a nyúlványok hossza csökkent), és a sejtek kitapadása a tenyésztő lemezekhez fokozatosan gyengült. 30 óra elteltével a proteaszóma gátló jelenlétében a sejtek már csoportosan lebegtek a tenyésztő médiumban (**6. ábra, d**). Az észlelt megjelenésbeli változásokból kiindulva arra következtettünk, hogy az MG-132 kezelés kétfázisú választ vált ki PC12 sejtekben. Ezeknek a morfológiai változásoknak a molekuláris hátterét szeretnénk volna megvizsgálni, így munkánk során először a kezdeti neuritnövekedés (**6. ábra, c**) (ehhez tartozó eredmények az „A. NEURITOGENEZIS” részben), majd az azt követő sejtpusztulás (**6. ábra, d**) (ehhez tartozó eredmények a „B. APOPTÓZIS” részben) hátterében meghúzódó jelátviteli történéseket külön-külön vizsgáltuk.



6. ábra A PC12 sejtek morfológiai vizsgálata különböző ideig tartó MG-132 kezelés hatására átmenő fényben, fáziskontraszt mikroszkópiával.

A reprezentatív fáziskontraszt mikroszkópos felvételek PC12 sejteket mutatnak 0 (**a**), 6 (**b**), 24 (**c**), és 30 (**d**) órás MG-132 (2,5 μ M) kezeléseket követően. A (**d**) panelen lévő lépték (200 μ m) minden képre vonatkozik (**a-d**).

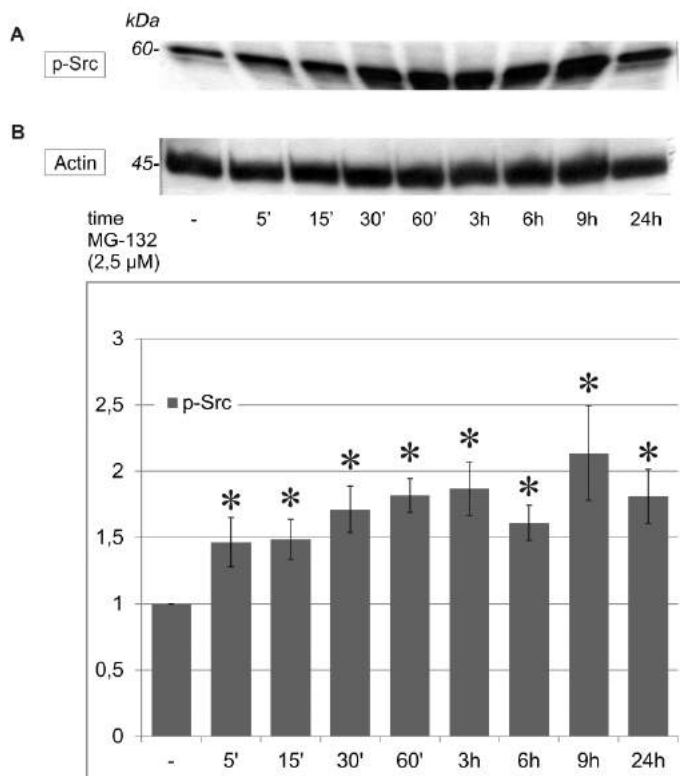
A **b** és **c** ábrán nyilak mutatják a neuritogenezis jellegzetes formáit.

A. NEURITOGENEZIS

4. 2. Az MG-132 kezelés hatására bekövetkező ERK- és Src-aktiváció kinetikája

Mivel a PC12 sejtek NGF által indukált neuronális differenciációja során fontos szerep jut az ERK és a Src kinázok aktivitásának, ezért először arra voltunk kíváncsiak, hogy az MG-132 kezelés hatására bekövetkező neuritnövekedés kapcsán is megfigyelhető-e ezeknek a molekuláknak az aktivációja? Munkacsoportunk már korábban ismertette (lásd Dr. Berta Gergely PhD dolgozata, PTE ÁOK, 2013/14, valamint Tarjányi és mtsai, 2013), viszont az itt tárgyalt jelenségek megértéshez is szükséges megemlíteni, hogy az MG-132 kezelés, kb. 6 óránál tapasztalt maximális jelerősődéssel, időben elhúzódó kinetikájú ERK aktivációt és a foszforilált ERK nukleáris transzlokációját idézi elő PC12 sejtekben. Ezek a jelátviteli események szükségesek a PC12 sejtek neuronális differenciációjához (Traverse és mtsai, 1992; Young és mtsai, 1994; Marshall, 1995).

A Src enzim differenciációban betöltött kulcsszerepe is ismert az irodalomból ebben a sejtvonalba (Alemà és mtsai, 1985), és a proteaszómális lebontás mechanizmusát is leírták ennek a tirozin-kináznak a szabályozásában (Hakak és Martin, 1999). Ezért a következő lépésben a Src fehérje aktivációjának időkinetikáját vizsgáltuk az MG-132 kezelése során. A Src tirozin kináz MG-132 által indukált aktivációját immunoblotokon detektáltuk poliklonális, foszfo-specifikus (Tyr 418) anti-Src antitest alkalmazásával. A kezelése során erős Src aktiváció volt megfigyelhető 30 perc és 9 óra között, és a Src-foszforiláció még 24 óra múltán is az alapaktivitás felett maradt (**7. ábra, A és grafikon**). Tekintettel az elhúzódó MG-132 kezelése során a teljes Src mennyiségében bekövetkezett esetleges változásokra (Hakak and Martin, 1999), a vizsgált minták gélbe töltési egyenletességeit itt anti-aktin antitest használatával ellenőriztük (**7. ábra, B**). Hogy csökkentsük a lehetőségét annak, hogy a Src foszforiláció változásait az MG-132 proteaszómát gátló hatásán kívüli más, esetleges „mellékhatásai” (pl. kalpain inhibitor hatás) okozták, a kezeléseket 10 nM epoxomicinnel, a proteaszóma egy másik specifikus inhibitorával megismételtük, és így is hasonló eredményekhez jutottunk. Ez esetben is kimutatható volt a Src tartós foszforilációja és a PC12 sejtek neuronális differenciációja (még nem közölt, és itt sem mutatott eredményünk).



7. ábra Az MG-132 kezelés által kiváltott Src foszforiláció időkinetikájának vizsgálata Western blot analízissel

A: A PC12 tenyészeteket MG-132-vel (2,5 μM) kezeltük a jelzett ideig, és a Src foszforilációját immunoblotol elemeztük. A membránt poliklonális p-Src elleni antitesttel teszteltük. **B:** Az antitestek eltávolítását követően a membránt újra előhívtuk aktinra specifikus antitest használatával a minták egyenlő fehérjetartalmának igazolása céljából. A grafikon a p-Src relatív intenzitását mutatja a kezeletlen kontrollhoz képest, a betöltési kontrollra normalizálva. A feltüntetett

értékek négy független kísérlet átlag ± S.D. értékeit mutatják. A kezeletlen kontrollhoz képest szignifikánsan (*P<0.05) különböző értékeket jelöltük.

Az MG-132-vel kezelt PC12 sejtekben tehát kimutattuk az Src fokozott aktivitását, mely az ERK-éhez hasonló, elhúzódo kinetikával mutatkozott.

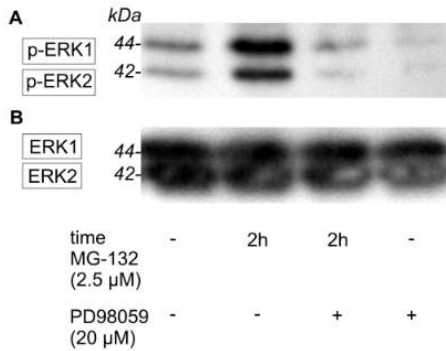
4. 3. Az ERK MG-132 által kiváltott foszforilációja MEK- és Ras függő folyamat

A PC12 sejtek NGF kezelés hatására bekövetkező neuronális differenciációja során az ERK aktivációja a Ras, Raf, MEK útvonalon keresztül valósul meg. Következő lépésként arra kerestük a választ, hogy az általunk tapasztalt, MG-132 által kiváltott ERK aktivációhoz is szükséges-e ennek az útvonalnak a működése?

Ennek eldöntésére a MEK -az ERK-et közvetlenül aktiváló kináz- szerepét kémiai MEK-inhibitor előkezeléssel, a Ras funkcióját pedig az M-M17-26 PC12 klón használatával -amely a H-Ras domináns gátló mutáns verzióját stabilan expresszálja- vizsgáltuk.

A MEK-gátló vegyületet (PD98059) 30 perccel a proteaszóma gátló kezelés megkezdése előtt, 20 μM-os koncentrációban alkalmazva az MG-132 által indukált ERK

aktiváció nem volt megfigyelhető (**8. ábra, A**). A MEK-gátlás erősségét mutatja, hogy mind az MG-132 által kiváltott, mind a proteaszóma gátlóval nem kezelt mintákban a foszfo-ERK jelek az alap aktivitás alá kerültek PD98059 jelenlétében (**8. ábra, A**). Az ERK1/2 minden formáját felismerő antitestekkel újra előhívva a blotot kizárható volt a betöltési egyenetlenség a foszfo-specifikus jelek megfigyelt változásai mögött (**8. ábra, B**).

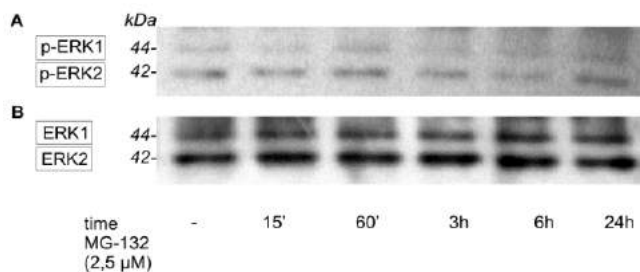


8. ábra Az ERK foszforilációhoz szükséges az intakt MEK funkció.

A: A PC12 tenyészeteket MG-132-vel (2,5 μM) kezeltük 2 órán át MEK-inhibitor vegyület (PD98059, 20 μM) jelenlétében, vagy annak hiányában, majd az ERK1/2 foszforilációját immunoblottal elemeztük. A MEK-inhibítort 30 perccel az MG-132 kezelése megkezdése előtt adtuk a tenyészetekhez. **B:** Ezt követően a membránról eltávolítottuk

a foszfo-specifikus antitesteket, és újra előhívtuk az ERK1-re és ERK2-re specifikus ellenanyagokkal a betöltési egyenetlenség vizsgálata céljából. A kísérletet háromszor ismételtük meg, hasonló eredménnyel.

A Ras funkciójának vizsgálatához időkinetikai kísérleteket végeztünk az M-M17-26 sejtvonalat használva (**9. ábra**). Az ERK foszforiláció alapszintje eleve gyengébb volt ebben a sejtvonalban mint a kontroll PC12-ben, és azt nem is lehetett fokozni egyetlen MG-132 kezelési időpontban sem (**9. ábra, A**). A blotot ezt követően újra előhívtuk az ERK1-re és 2-re specifikus antitestek használatával (**9. ábra, B**).



9. ábra Az ERK foszforiláció függ a normál Ras funkciótól.

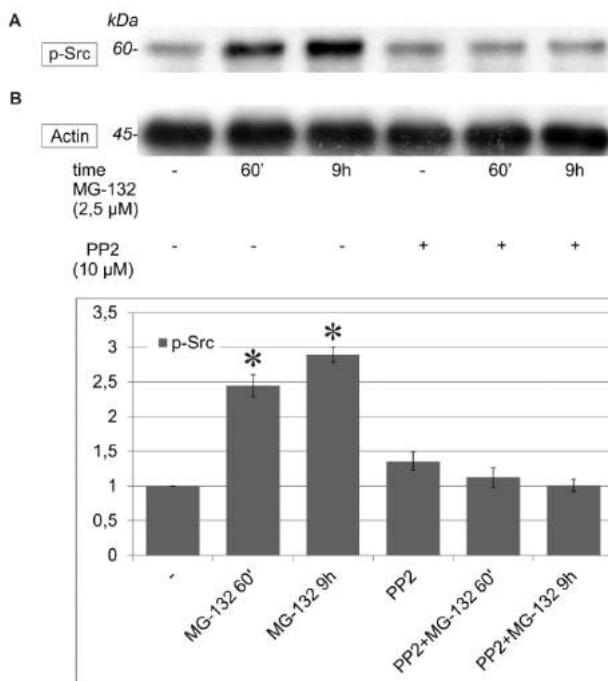
A: A PC12 variáns M-M17-26 tenyészeteket MG-132-vel (2,5 μM) kezeltük a jelzett ideig, és az ERK foszforilációját immunoblottal elemeztük.

B: Ezt követően a foszfo-specifikus antitesteket eltávolítottuk, és a blotot újra előhívtuk az ERK1-re és ERK2-re specifikus antitestek használatával az egyes minták egyenlő fehérjetartalmának igazolása céljából. A kísérletet háromszor ismételtük meg, hasonló eredménnyel.

Ezek az eredmények alátámasztják, hogy az ERK MG-132 által indukált foszforilációja, az NGF kezeléssel kiváltotthoz hasonlóan, MEK- és Ras-függő módon megy végbe a proteaszóma gátlóval kezelt PC12 sejtekben is.

4. 4. A Src-gátlás hatása a Src- és ERK foszforilációjára

A Src szerepének további vizsgálatára 10 μM PP2-t alkalmaztunk, amely a Src tirozin-kinázok erős és szelektív inhibitora (Hanke és mtsai, 1996). Hatásmechanizmusát tekintve ez a vegyület megakadályozza a Src aktiváló autofoszforilációját a 416-os pozícióban lévő Tyr aminosavon. A PP2 előkezelések mindig 30 perccel a proteaszóma gátló kezelések előtt kezdődtek. A kísérletekben a proteaszóma gátló kezelés időtartamait a korábbi kísérletek alapján úgy választottuk meg, hogy azok maximális Src foszforilációt indukáljanak. A Src-inhibitor így is teljes mértékben képes volt blokkolni az MG-132 Src aktiváló hatását (**10. ábra, A és grafikon**). A membrán anti-aktinnal történő újbóli előhívása a minták közel egyenletes betöltését igazolta (**10. ábra, B**).



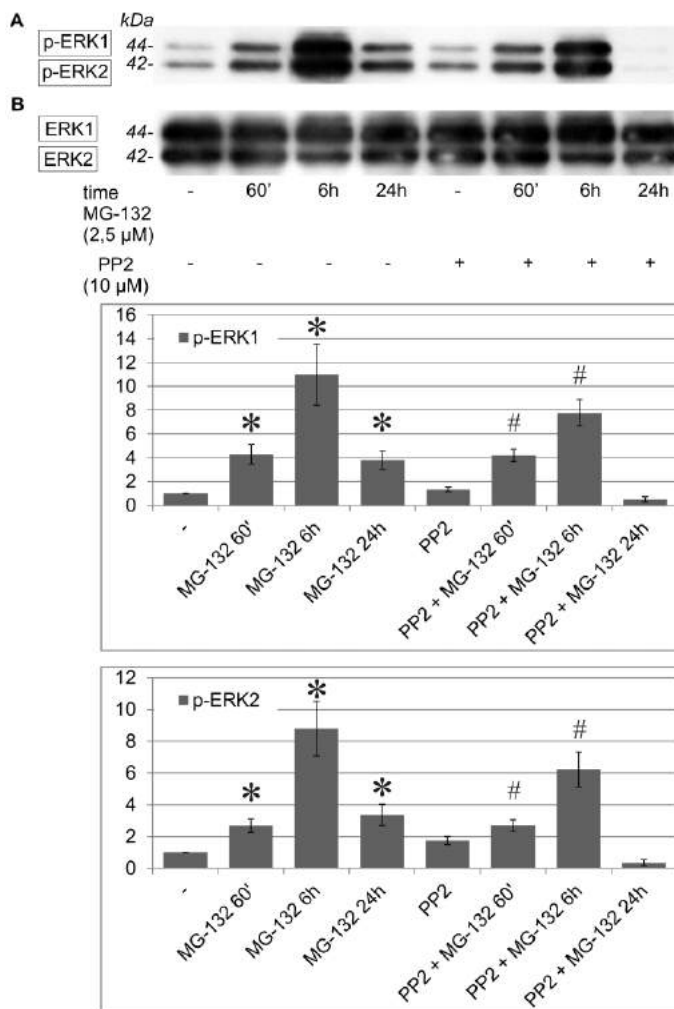
10. ábra Az MG-132 hatása a Src foszforilációjára a Src gátlása nélkül és a Src PP2-vel történő gátlása mellett.

A: A PC12 tenyészeteket MG-132-vel (2,5 μM) kezeltük a jelzett ideig. A PP2-t 30 perccel az MG-132 kezelések megkezdése előtt adtuk a tenyészetekhez. Az aktív p-Src jelenlétét monoklonális antitest használatával vizsgáltuk. **B:** Az antitestek eltávolítását követően a betöltési egyenletesség igazolása céljából a blotot újra előhívtuk anti-aktin antitesttel. A grafikon az aktív-Src relatív intenzitását mutatja a kezeletlen kontrollhoz képest, a betöltési kontrollra normalizálva. A

feltüntetett adatok négy független kísérlet átlag \pm S.D. értékeit mutatják. A kezeletlen kontrollhoz képest szignifikánsan (* $P < 0.05$) különböző eredményeket jelöltük.

Miután megbizonyosodtunk róla, hogy PP2 jelenlétében az aktív-Src mennyisége MG-132 kezelés hatására sem haladja meg az alap szintet, a Src szerepét kívántuk

vizsgálni az ERK MG-132 általi aktivációjában (**11. ábra**). A PP2 jelenléte nem gátolta teljesen az ERK foszforiláció növekedését, de csökkentette az MG-132 által kiváltott csúcsintenzitást (**11. ábra, A és grafikonok**). Ezen kívül -ellentétben a Src-gátlás nélküli esettel- 24 óránál a foszforilált ERK jel már az alap aktivitás alá csökkent, így az ERK aktiváció valamivel átmenetibb jellegűvé vált PP2 jelenlétében (**11. ábra, A és grafikonok**). A membrán ERK1-et és 2-t felismerő antitestek alkalmazásával történő újbóli előhívása igazolta a minták közel egyenlő fehérjetartalmát (**11. ábra, B**).



szignifikánsan ($P < 0.05$) különböző értékeket jelöltük.

A Src-inhibitor vegyület jelenlétében az MG-132-vel elérhető csökkent foszfo-ERK csúcsintenzitások és az ERK foszforiláció tranziensebb jellege is azt mutatja, hogy az ERK aktiváció -legalábbis részben- függ az Src intakt funkciójától.

11. ábra Az MG-132 hatása az ERK-foszforilációra Src-gátlás nélkül és PP2-vel végzett Src-gátlást követően

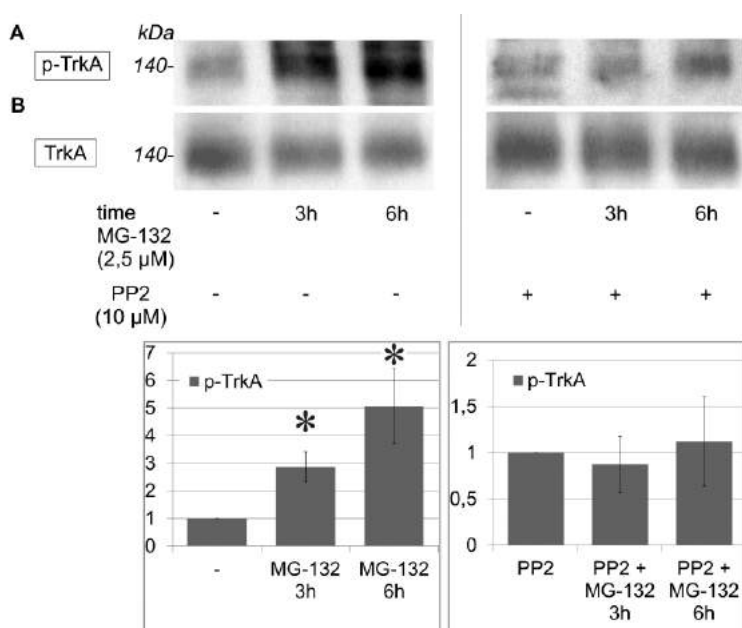
A: A PC12 tenyészeteket MG-132-vel (2,5 μM) kezeltük a jelzett ideig. A PP2-t 30 perccel az MG-132 kezelések megkezdése előtt adtuk a tenyészetekhez. A membránon megvizsgáltuk a kétszeresen, treoninon és tirozinon foszforilált/aktív p-ERK jelenlétét. **B:** Az antitestek eltávolítását követően a blotot újra előhívtuk az ERK1-et és -2-t felismerő antitestek használatával a betöltési egyenletesség igazolása érdekében. A felső diagram a p-ERK1, míg az alsó a p-ERK2 relatív intenzitását mutatja a kezeletlen kontrollhoz képest, és a betöltési kontrollra normalizálva. A feltüntetett értékek öt független kísérlet átlag±S.D. értékeit mutatják. A kezeletlen (*) vagy PP2 kezelt (#) kontrollhoz képest

4. 5. A TrkA MG-132 által kiváltott foszforilációja és annak gátlása Src-inhibítorral

Úgy gondoltuk, hogy ha az ERK MG-132 által kiváltott aktivációjához szükséges a Src működése, és mindkét kináz aktivációjában szerepet játszhat a TrkA receptor, akkor az aktivációjuk közötti kapcsolat az általunk használt kísérletes elrendezésben maga a TrkA lehet. Ennek eldöntése érdekében megvizsgáltuk a TrkA szerepét az MG-132 által kiváltott jelátviteli eseményekben. A 490-es tirozin aminosavon foszforilált aktív TrkA-t specifikusan felismerő antitest alkalmazásával, Western blot segítségével detektáltuk a receptor aktiválódását MG-132-vel kezelt PC12 sejtekben (**12. ábra, A, bal oldali Western blot és grafikon**). A membrán ezt követő újbóli előhívása TrkA-ra specifikus antitesttel megerősítette a minták megközelítőleg egyenlő fehérjetartalmát (**12. ábra, B, bal oldali Western blot**).

A TrkA MG-132 által indukált aktiválása az egyik lehetséges kiindulási pontja annak a jelnek, amely ezt követően a Ras-on keresztül aktiválja a MEK-et és az ERK-et.

30 perccel az MG-132 kezelések előtt indított, PP2-vel történő Src-gátlást követően a proteaszóma gátló már nem volt képes a TrkA foszforilációját az alapaktivitás fölé emelni (**12. ábra, A, jobb oldali Western blot és grafikon**). A membrán nem-foszforilált TrkA-ra specifikus antitest alkalmazásával történő újbóli előhívása ez esetben is gyakorlatilag egyenlő fehérjemennyiségeket igazolt az egyes mintákban (**12. ábra, B, jobb oldali Western blot**).



12. ábra Az MG-132 hatása a TrkA foszforilációjára a Src gátlása nélkül és PP2 Src-inhibítor használatával.

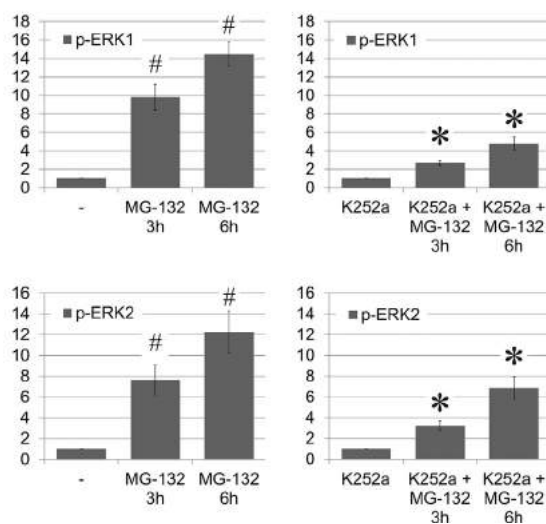
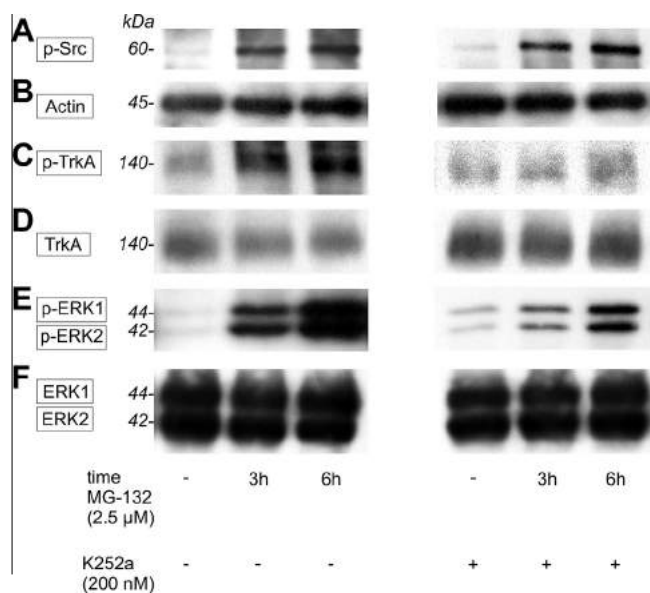
A: A PC12 tenyészeteket MG-132-vel (2,5 μM) kezeltük a jelzett ideig. A PP2-t, alkalmazása esetén, 30 perccel az MG-132 kezelések megkezdése előtt adtuk a tenyészetekhez. Első lépésként a 490-es tirozinon foszforilált TrkA jelenlétét vizsgáltuk. **B:** Az antitest eltávolítása után a blotot újra

előhívtuk a foszforilálatlan TrkA-ra specifikus antitest használatával a minták egyenletes betöltésének ellenőrzése céljából. A grafikon a foszfo-TrkA relatív intenzitását mutatja a kezeletlen kontrollhoz képest, a betöltési kontrollra normalizálva. A feltüntetett értékek három független kísérlet átlag \pm S.D. értékeit mutatják. A kezeletlen kontrollhoz képest szignifikánsan (* $P < 0.05$) különböző értékeket jelöltük.

Az a tény, hogy TrkA foszforiláció indukálható MG-132-vel kezelt PC12 sejtekben, de a Src kémiai gátlása esetén ez kivédhető volt, alátámasztja, hogy a Src aktivitása szükséges a TrkA proteaszóma gátló által kiváltott fokozott foszforilációjához.

4. 6. A Src-, TrkA- és ERK aktivitás vizsgálata TrkA-gátolt PC12 sejtekben

Az MG-132-vel történő aktiválásuk során a TrkA és a Src kapcsolatának további vizsgálata érdekében a PC12 sejteket a proteaszóma gátló kezelés megkezdése előtt 30 perccel a K252a, TrkA-inhibítor vegyülettel inkubáltuk, ami azután a kezelés teljes időtartama alatt jelen volt a tenyésztő médiumban. A K252a nem tudta megakadályozni az MG-132 által kiváltott Src foszforilációt (**13. ábra, A**), viszont meggátolta a TrkA foszforilációját (**13. ábra, C**). K252a jelenlétében az ERK aktiváció mérhető volt ugyan, de intenzitása elmaradt a TrkA-gátlóval nem kezelt mintákhoz képest (**13. ábra, E és grafikonok**). Ennek a mértéke ráadásul összevethető volt a korábban PP2 jelenlétében mért ERK aktivációs intenzitásokkal, melyeket a Src-gátlást követően mértünk (**lásd 11. ábra**). A blotok újbóli előhívása aktint (**13. ábra, B**), TrkA-t (**13. ábra, D**), ERK1-et és 2-t (**13. ábra, F**) felismerő antitestek használatával igazolta a minták közel egyenletes betöltését.



kontrolltól. Jobb oldali két grafikonon * = szignifikánsan különbözik a csak K252a-val kezelt kontrolltól.

Ezek az adatok együttesen arra utalnak, hogy PC12 sejtekben az MG-132 által kiváltott ERK aktiváció során a Src a TrkA-tól proximálisan, tehát „upstream” helyezkedik el. Ezen kívül alátámasztják azoknak az ERK-aktiváló mechanizmusoknak a létezését, amelyek függetlenek a TrkA-ról induló útvonalaktól, és amelyeket más -a Ras-tól és MEK-től is „upstream” elhelyezkedő- MG-132 által stimulált jelátviteli komponens(ek) közvetíthetnek.

13. ábra Az MG-132 hatása a Src, TrkA és ERK foszforilációjára TrkA-gátlás nélkül, illetve annak K252a-val történő gátlása mellett.

A PC12 tenyészeteket MG-132-vel (2,5 μ M) kezeltük a jelzett ideig. A K252a-t (200 nM) 30 perccel az MG-132 kezelések megkezdése előtt adtuk a tenyészetekhez az ábrán jelzett minták esetében. A membránokat az aktív Src (A), TrkA (C) és ERK1/2 (E) jelenlétére vizsgáltuk. Az antitestek eltávolítását követően a blotokat újra előhívtuk aktinra (B), illetve a foszforilálatlan TrkA-ra (D), valamint ERK1-re és 2-re (F) specifikus antitest használatával a minták egyenletes betöltésének igazolása érdekében. (A bal és a jobb oldali grafikonok a foszfo-ERK1 és 2 relatív intenzitását mutatják a kezeletlen, vagy csak K252a-val kezelt kontrollokhoz képest, és a teljes ERK1/2-re normalizálva. Az értékek három független kísérlet átlag \pm S.D. értékeit mutatják. A bal oldali két grafikonon # = szignifikánsan különbözik a kezeletlen

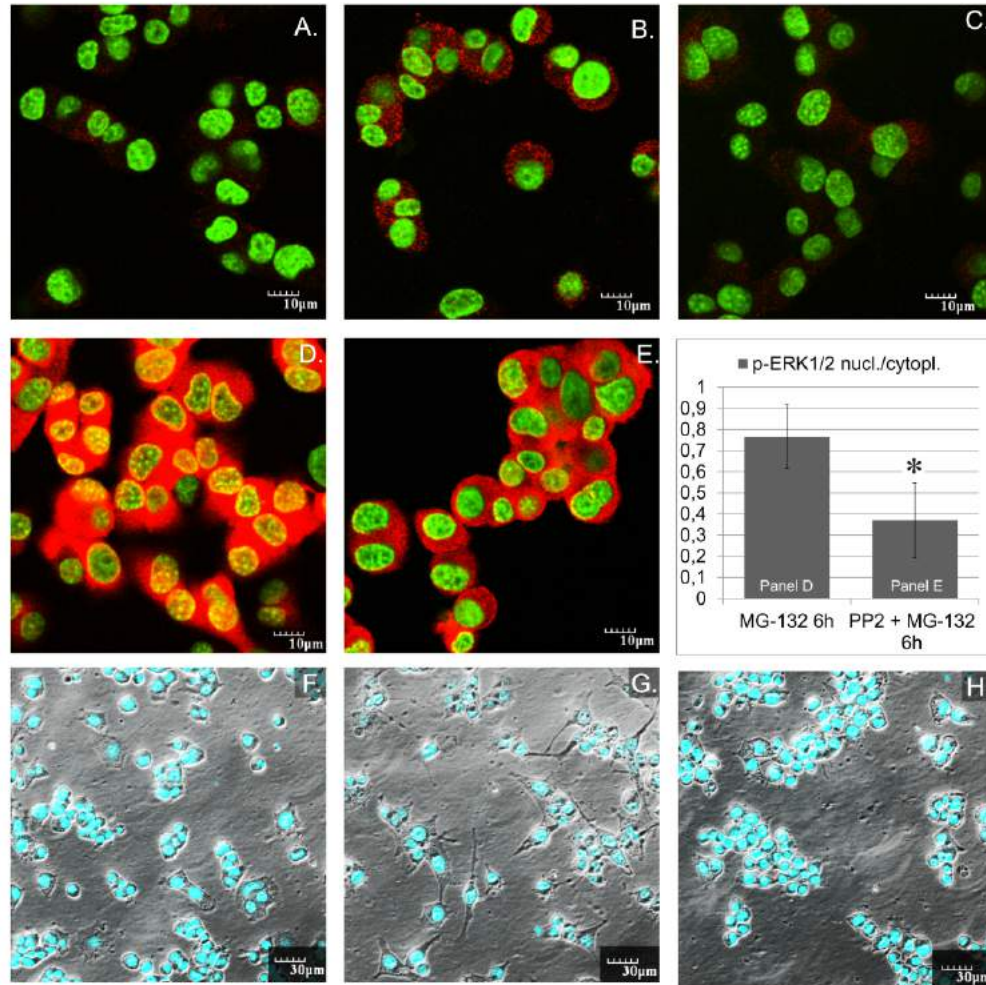
4. 7. A foszforilált Src és -ERK intracelluláris lokalizációja és a PC12 sejtek fenotípusos változásai

Mivel a Src és az ERK aktivációja kulcsfontosságúnak bizonyult a PC12 sejtek proteaszóma gátló által indukált neuronális differenciációjában, következő lépésként ezen fehérjék aktív alakjainak intracelluláris eloszlására és a sejtek morfológiai változásaira is kíváncsiak voltunk MG-132 és/vagy PP2 kezeléseket követően.

A foszforilált Src és -ERK sejten belüli megoszlását lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal detektáltuk. A kezeletlen tenyészetek sejtjeiben (**14. ábra, A**) a foszforilált Src jel alig volt kimutatható a sejtek citoplazmájában. A kizárólag proteaszóma gátlóval végzett maximális stimulációt követően 30 perc és 9 óra között a jel intenzitása nőtt, de túlnyomórészt citoplazmatikus maradt (**14. ábra, B**). Kezelés nélkül a gyenge p-ERK jel is többnyire citoplazmatikus elhelyezkedésűnek bizonyult (**14. ábra, C**). Az MG-132-vel végzett kezelés hatására a p-ERK jel intenzitása megnőtt, és a maximumot 6 óra elteltével érte el, amikor az már a citoplazmatikus lokalizáció mellett a sejtmagban is detektálható volt (**14. ábra, D**).

Önmagában a Src PP2-vel való gátlása nem volt hatással a p-ERK jel intracelluláris eloszlására és szintjére PC12 tenyészetekben (saját, nem közölt, és itt sem mutatott megfigyelésünk), de gyengítette az MG-132 kezeléseket által kiváltott maximális jelintenzitást (**14. ábra, E**). A p-ERK immunreaktivitás túlnyomórészt a Src-gátolt sejtek citoplazmájában maradt még 6 órás MG-132 kezelés után is (**14. ábra, E és grafikon**).

A sejtek fenotípusos változásait a már említett mikroszkópot fáziskontraszt módban használva vizsgáltuk, és a következő eredményekre jutottunk: kezelés nélkül a PC12 sejtek kerek, esetleg enyhén szögletes morfológiát mutattak (**14. ábra, F**). Az MG-132 kezelés előrehaladtával egyre hosszabb nyúlványokat növesztettek, amelyek az első nap végén voltak a leghosszabbak (**14. ábra, G**). Az MG-132-vel gátolt sejtek jellemzően egy-két hosszabb neuritot növesztettek néhány rövidebb nyúlvány kíséretében. A Src gátlása PP2-vel nem volt hatással a sejtek morfológiájára (saját, nem közölt, és itt sem mutatott megfigyelésünk), ugyanakkor 30 perces PP2 előkezelés hatására az MG-132 által kiváltott nyúlványnövekedés már nem volt megfigyelhető. (**14. ábra, H**). Ebben az esetben a neuritok növekedése még 24 óra elteltével sem volt detektálható (**14. ábra, H**).



14. ábra Lézer pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkópia önmagában (A-E), vagy fáziskontraszt mikroszkópiával kombinálva (F-H).

A és B: A foszforilált Src intracelluláris eloszlása. A foszforilált Src (piros) elhelyezkedése kezeletlen PC12 sejtekben (**A**) és 60 perces 2,5 μ M MG-132 kezelés után (**B**). A foszforilált Src túlnyomórészt citoplazmatikus elhelyezkedésű. **C–E:** A foszforilált ERK intracelluláris eloszlása. Gyenge ERK foszforiláció (piros) a kezeletlen PC12 sejtek citoplazmájában (**C**) és az ERK-foszforiláció növekedése nukleáris transzlokációval az enzim 2,5 μ M MG-132-vel 6 órán keresztül történő maximális stimulálását követően Src-inhibitor hiányában (**D**), vagy 10 μ M PP2 Src-inhibitor jelenlétében (**E**). Ez utóbbi gyengébb általános jelintenzitást és az aktivált enzimek nukleáris transzlokációjának jelentős csökkenését eredményezte (**E**). A magokat Hoechst 33342-vel (zöld) tettük láthatóvá. A nukleáris enzim transzlokáció következtében a zöld és a vörös jelek kolokalizációja sárga színnel jelenik meg. A grafikon összehasonlítja a **D** és **E** panelek nukleáris- és citoplazmatikus foszfo-ERK (vörös jel) intenzitását. * = szignifikánsan különbözik a kizárólag MG-132-vel kezelttől. **F–H:** Differenciálódási morfológia. A PC12 sejtek kezelés nélkül (**F**), vagy 24 órás MG-132-vel (2,5 μ M) való expozíciót követően (**G**). Az Src gátlása önmagában 10 μ M PP2-

vel nem változtatta meg a sejtek morfológiáját a kezeletlen kontrollhoz képest (saját, nem közölt, és itt sem mutatott megfigyelésünk), de gátolta az MG-132 differenciáló hatását (**H**). A sejtmagokat Hoechst 33342-vel (kék) tettük láthatóvá.

B. APOPTÓZIS

4. 8. Az MG-132-vel 24 órán át, vagy hosszabb ideig kezelt PC12 sejtek apoptózisa

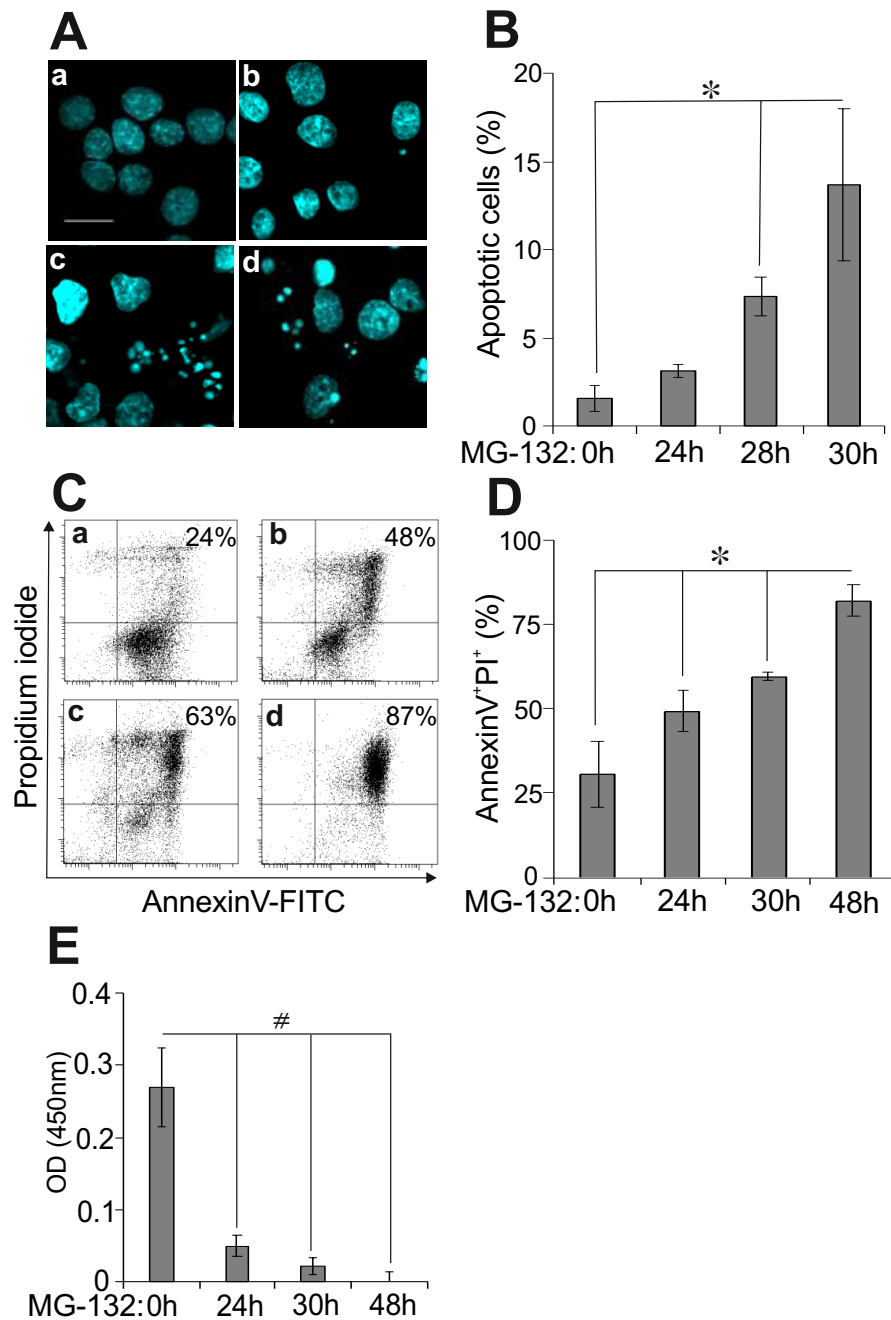
Ahogy azt már az előzőekben említettük, a PC12 sejtek MG-132 kezelése során a differenciálódásnak indult sejtek morfológiája 24 óra elteltével kifejezetten megváltozott, a sejtek a hanyatlás jeleit kezdték mutatni. A megfigyelt jelenségek arra készítettek bennünket, hogy tovább vizsgáljuk, mi történik a PC12 sejtek hosszan tartó proteaszóma gátló kezelése során, különös tekintettel a stressz- és apoptózis jelátvitelére.

Először meghatároztuk az apoptotikus sejtek arányát különböző módszerek alkalmazásával. Első lépésként Hoechst 33342 festést végeztünk, és lézer pásztázó konfokális fluoreszcens mikroszkóppal elemeztük a sejtek magmorfológiáját (**15. ábra, A**). A PC12 sejtek magjai 24 órás MG-132 kezelés erejéig többnyire egészséges megjelenést mutattak (**15. ábra, Ab**), azonban 28 vagy 30 órás kezeléseket követően a kromatin kondenzációja és a magfragmentáció egyre hangsúlyosabbá vált (**15. ábra Ac és Ad**) a kezeletlen kontrollhoz képest (**15. ábra, Aa**). A kromatin kondenzációját és a magfragmentációt látva apoptotikus változásokat sejtettünk a történések hátterében. A nukleáris elváltozások számszerűsítéséhez mintánként 100 sejtet számoltunk meg, és meghatároztuk az apoptotikus morfológiájú sejtmagok arányát, ami a kezelési idő előreheladtával jelentősen emelkedett (**15. ábra, B**). 48 órás MG-132 kezelést követően sajnos már nem tudtuk értékelni az apoptotikus sejtmagokra vonatkozó számszerű adatokat, mert az olyan mértékben érintette a sejteket, hogy azok a mikroszkópos minták előkészítése során, minden igyekezetünk ellenére leúsztak a tárgylemezekről. Ebből következően a mikroszkópban üres, vagy csaknem üres mezőket tudtunk csak detektálni, ami nem tette lehetővé az eredmények konzisztens kiértékelését és a megfelelő statisztikai elemzését. Ez az oka annak, hogy az **15. ábra A és B**. részén nem látható a 48 órás MG-132 kezeléshez tartozó apoptotikus sejtmagok képe és számszerű aránya sem.

A fenti morfológiai elemzést áramlási citometriás mérésekkel egészítettük ki. Az AnnexinV és propidium-jodid (PI) kombinált alkalmazása megbízható módszer az

apoptotikus sejtszám áramlási citometriával történő meghatározására. A PC12 sejteket Annexin V-FITC/PI-vel festettük meg 0 **(15. ábra, Ca)**, 24 **(15. ábra, Cb)**, 30 **(15. ábra, Cc)** és 48 **(15. ábra, Cd)** órás MG-132-kezeléseket követően. Az Annexin V⁺PI⁺ kettős pozitív sejteket, az irodalommal összhangban, késői apoptotikusnak (nem életképesnek) tekintettük. Az elhalt sejtek százalékos arányát egyedi „dot-plot”-okban határoztuk meg, amihez 3 független kísérlet adatait gyűjtöttük össze. 24, 30 vagy 48 órás MG-132 kezelés után szignifikánsan megnőtt az Annexin V⁺PI⁺ kettős pozitív sejtek aránya **(15. ábra, D)**. Ahogy az várható volt, az áramlási citometriával nagyobb arányban detektáltunk apoptotikus sejteket, mint a konfokális fluoreszcens mikroszkóppal **(15. ábra, A és B)**, mert itt nem csak a letapadt sejtek vettek részt az elemzésben, hanem a már a tápoldatban lebegő sejtek is.

Végül, annak érdekében, hogy még teljesebbé tegyük a PC12 sejtek apoptotikus változásainak értékelését a hosszan tartó MG-132 kezelés során, sejtleletképességi tesztet is végeztünk a WST-1 sejtproliferációs esszé segítségével **(15. ábra, E)**. Az élő sejtekben a WST-1 tetrazólium só a mitokondriális dehidrogenázok formazánná alakítják, amelynek mennyisége korrelál a tenyészetben lévő metabolikusan aktív sejtek számával. Érdeemes figyelembe venni, hogy a WST-1 vizsgálat protokolljának előírása miatt az MG-132 kezelések befejezése után a tápoldatot eltávolítottuk. Ezután a sejteket további 4 órán át inkubáltuk a tetrazólium sóval egy újonnan hozzáadott pufferben, amely nem tartalmazott ugyan MG-132-t, de az ekkorra már bekerült a sejtekbe, és a tetrazólium sóval való további 4 órás inkubációs igény miatt, gyakorlatilag az MG-132 sejteken belül kifejtett hatásának a teljes időtartama is meghosszabbodott 4 órával. Ez a körülmény nagy valószínűséggel magyarázza a mitokondriális aktivitás drámai csökkenését a 24 órán át MG-132-vel kezelt mintában a kezeletlen kontrollhoz képest. Megmértük a formazán optikai denzitását (OD) a 0, 24, 30 és 48 órán keresztül MG-132-vel kezelt mintákban **(15. ábra, E)**. A korábbi Hoechst és Annexin V/PI festéssel kapcsolatos eredményeinknek megfelelően, és talán még hangsúlyosabban, a metabolikusan aktív sejtek aránya jelentősen csökkent az MG-132 kezelés 24., majd 30. és 48. órájában **(15. ábra, E)**.



15.ábra A hosszan tartó (legalább 24 órás) MG-132 kezelés apoptózist indukál PC12 sejtekben.

A: Reprezentatív lézer pásztázó konfokális fluoreszcens mikroszkópos képek a PC12 sejtek magjairól 0 (**Aa**), 24 (**Ab**), 28 (**Ac**) és 30 (**Ad**) órás MG-132 (2,5 μ M) kezeléseket követően. A sejtmagokat fluoreszcens, DNS-kötő festékekkel (Hoechst 33342) festettük meg. Apoptotikus morfológiai változásnak tekintettük a kromatin kondenzációját és fragmentációját. Az (**Aa**) panelen látható lépték (20 μ m) minden fluoreszcens magot ábrázoló képre (a-d) vonatkozik. Megjegyzés: 48 óra elteltével a legtöbb sejt felúszott a lemezekről, ami technikailag lehetetlenné tette informatív képek készítését. **B:** A Hoechst 33342 festéssel vizsgált apoptotikus sejtek kvantitatív analízise a kísérlet különböző időpontjaiban (lásd a képeket az „A” panelen). Az apoptotikus sejtek százalékos

arányát az abnormalis és a még egészséges kromatin szerkezetű sejtek arányaként határoztuk meg. Az oszlopdiagram három független kísérlet adataiból számított átlag \pm SD értékeit mutatja. A statisztikailag szignifikáns különbségeket jelöltük (* $P \leq 0,05$). **C:** MG-132 kezelés által kiváltott apoptózis áramlási citometriás analízise PC12 sejtekben. A sejteket Annexin V-FITC/PI-vel festettük 0 (**Ca**), 24 (**Cb**), 30 (**Cc**) és 48 (**Cd**) óras MG-132 (2,5 μ M) kezeléseket követően. Az Annexin V⁺PI⁺ kettős pozitív sejteket (a reprezentatív „dot-plot”-okon a jobb felső negyedben) késői apoptotikusnak (nem életképesnek) tekintettük. Az elhalt sejtek százalékos aránya az egyes panelek jobb felső sarkában látható. **D:** Az oszlopdiagram az Annexin V⁺PI⁺ kettős pozitív sejtek három független kísérlet áramlási citometriás analíziséből (lásd **C**) számított átlagos arány \pm SD értékeit mutatja. A statisztikailag szignifikáns különbségeket jelöltük (* $P \leq 0,05$). **E:** A sejtek életképességének vizsgálata WST-1 méréssel. A kísérlet végén a mintákban lévő formazán festék mennyisége korrelál a tenyészetekben lévő élő sejtek számával. Az oszlopok a formazán optikai denzitását mutatják (450 nm-en mérve) MG-132-vel (2,5 μ M) végzett különböző inkubációs periódusok után. A statisztikailag szignifikáns különbségeket jelöltük (# $P \leq 0,05$).

4. 9. Az MG-132 kezelés hatására bekövetkező Akt-, p38-, JNK-, c-Jun foszforiláció és a kaspáz-3 aktiváció időkinetikája

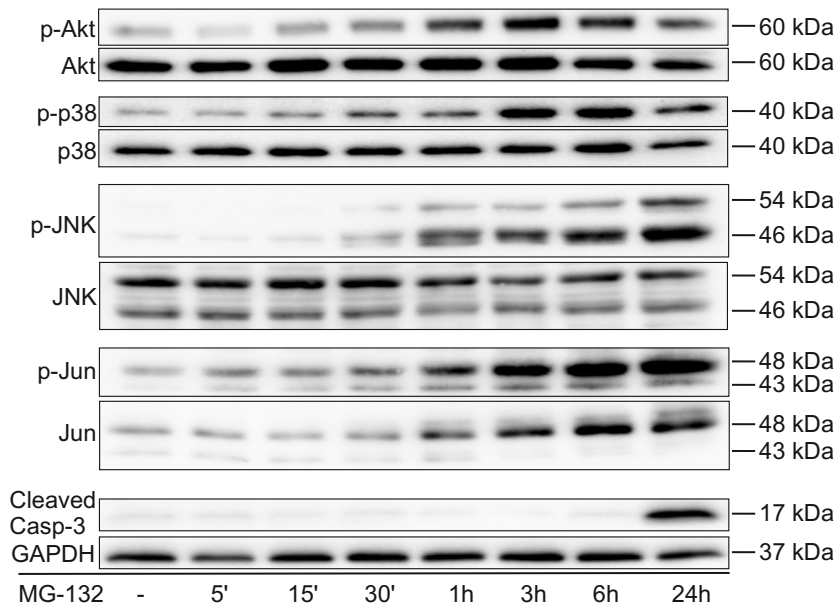
Miután azt tapasztaltuk, hogy 24 órát meghaladó MG-132 kezelés hatására a PC12 sejtek egyre nagyobb hányadát érinti az apoptózis, vizsgálni kívántuk az észlelt történések molekuláris hátterét is. Mivel a proteaszóma számos jelátviteli molekula szabályozásában részt vesz, elemeztünk néhány kulcsfontosságú útvonalat, amelyek befolyásolják a túlélést (Akt), közvetítik a sejtek stressz választát (p38, JNK és c-Jun), vagy akár azok apoptózisához vezetnek (kaspáz-3).

Először az Akt foszforiláció kinetikáját vizsgáltuk, melynek során az MG-132 jelerősödést indukált (**16. ábra**). A p-Akt jel maximuma 3 óras kezelést követően volt megfigyelhető, ezután intenzitása fokozatosan csökkenő tendenciát mutatott (**16. ábra**).

A stressz jelátviteli útvonalak szintén fontos szerepet játszanak a különböző sejtípusok (Chuang és mtsai, 2019), köztük a PC12 sejtek apoptózisának szabályozásában (Aminzadeh, 2017). Így következőnek a p38, valamint a JNK és szubsztrátja, a c-Jun (az ábrákon Jun-ként feltüntetve) foszforilációját vizsgáltuk MG-132 kezelés hatására (**16. ábra**). A p38 foszforiláció fokozódása 3-6 óras MG-132 kezelést követően mutatkozott a legkifejezettebbnek, majd 24 óras kezelést követően mérsékelt gyengülése volt megfigyelhető (**16. ábra**). A JNK aktiválódása már az első 30 perc után nyilvánvaló volt, és az MG-132 kezelés 24 óras időtartamáig még tovább

növekedett (**16. ábra**). Hasonló mintázat volt kimutatható a c-Jun-nál is, aminek a foszforilálatlan változata is ugyanazt az erősödő jelkinetikát mutatta (**16. ábra**).

A kaszpáz-3 aktív, hasított formája kizárólag a 24 órás MG-132 kezelést követően volt megfigyelhető (**16. ábra**), ami egybeesett a kezdődő apoptózis egyéb megnyilvánulásainak jelentkezésével.



16. ábra Az MG-132 által indukált Akt, p38, JNK, c-Jun foszforiláció és kaszpáz-3 hasítás időkinetikája.

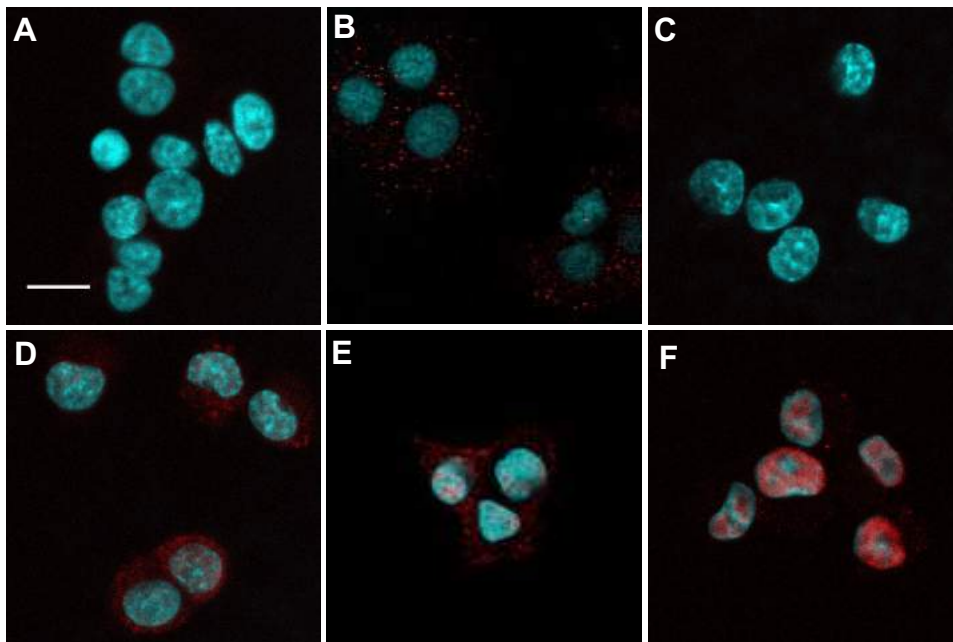
A reprezentatív Western blot vizsgálatok az Akt, p38, JNK és c-Jun foszforilációs változásait, illetve a kaszpáz-3 aktiváló hasítását mutatják 0, 5, 15, 30 perc, valamint 1, 3, 6 és 24 óra MG-132

(2,5 μ M) kezeléseket követően. A blotokat (a kaszpáz-3 kivételével) először a megfelelő foszfospecifikus antitestekkel vizsgáltuk (felső panelek), majd az antitestek eltávolítását követően a membránokat újra előhívtuk a fehérjék nem foszforilált formáival is reagáló, specifikus antitestek használatával (alsó panelek). A GAPDH jel a hasított kaszpáz-3 esetében szolgált a betöltési egyenletesség ellenőrzésére. A reprezentatív blotok hasonló eredményeket adó, többször ismételt kísérleteket szemléltetnek.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy PC12 sejtekben tartós MG-132 kezelés hatására a túlélést közvetítő Akt aktiváció a kezdeti emelkedést követően fokozatosan csökkent, miközben az apoptózist kiváltó stressz jelátviteli utak egyre aktívabbá váltak, végül a hasított kaszpáz-3 mennyiségének erőteljes emelkedése is megfigyelhető volt (**16. ábra**). E változások mind hozzájárulhatnak a PC12 sejtekben hosszan tartó MG-132 kezelést követően tapasztalt apoptotikus változások magyarázatához.

4. 10. A stressz jelátviteli fehérjék sejten belüli eloszlása MG-132 kezelés során

A p38, JNK és c-Jun stressz jelátvitelben fontos szerepet játszó szignalizációs molekulák proteaszóma gátló által indukált foszforilációs változásait látva kíváncsiak voltunk ezen fehérjék aktív formáinak intracelluláris elhelyezkedésére MG-132 kezelést követően (**17. ábra, D-F**), illetve annak hiányában (**17. ábra, A-C**). Immunfluoreszcens festést követően lézer pásztázó konfokális fluoreszcens mikroszkóppal gyakorlatilag nem volt kimutatható p-p38 és p-c-Jun jel a kezeletlen PC12 sejtekben (**17. ábra, A és C**), míg minimális foszforilált JNK immunreaktivitás kezelés nélkül is mutatkozott a citoplazmában (**17. ábra, B**). Ezután a jelátviteli fehérjék maximális aktivációjának kiváltására alkalmas MG-132 kezeléseket alkalmaztunk, amelyek a **16. ábra** alapján a p38 esetében 6 órának, JNK és c-Jun esetében pedig 24 órának feleltek meg. 6 órás MG-132 kezelés után a foszforilált p38 jel túlnyomórészt a PC12 sejtek citoplazmájában, és kismértékben a sejtmagokban jelentkezett (**17. ábra, D**). 24 órás MG-132 kezelést követően a kezeletlen kontrollhoz képest erősebb p-JNK jel volt megfigyelhető mind a sejtek citoplazmájában, mind pedig a sejtmagokban (**17. ábra, E**), míg a p-c-Jun esetében a kezeletlen kontrollhoz képest jelentősen megnövekedett immun jel szinte kizárólag nukleáris lokalizációt mutatott (**17. ábra, F**).



17. ábra Az MG-132 kezelés hatása a foszforilált p38-, JNK- és c-Jun fehérjék sejten belüli elhelyezkedésére PC12 sejtekben lézer pásztázó konfokális fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva.

A reprezentatív mikroszkópos képeken p-p38 (**A, D**), p-JNK (**B, E**) és p-c-Jun (**C, F**) jelek láthatók kezeletlen (**A, B, C**) vagy 2,5 μ M MG-132-vel 6 órán át (**D**), illetve 24 órán át (**E, F**) kezelt minták esetében. A foszforilált p38, JNK és c-Jun jelek piros színben jelennek meg, míg a sejtmagokat Hoechst 33342-vel (kék) tettük láthatóvá. Az (**A**) panelen lévő lépték (10 μ m) minden képre (**A-F**) vonatkozik.

4. 11. Specifikus kináz inhibitorok hatásainak vizsgálata az MG-132 kezelés által kiváltott Akt-, p38-, JNK- és c-Jun aktivációra

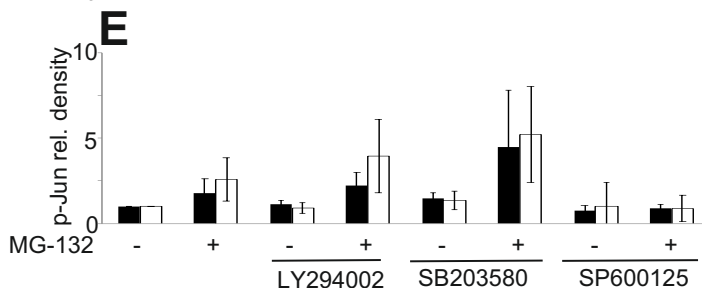
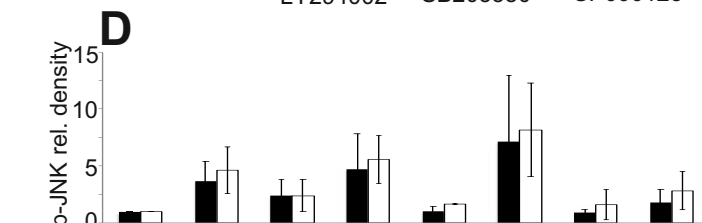
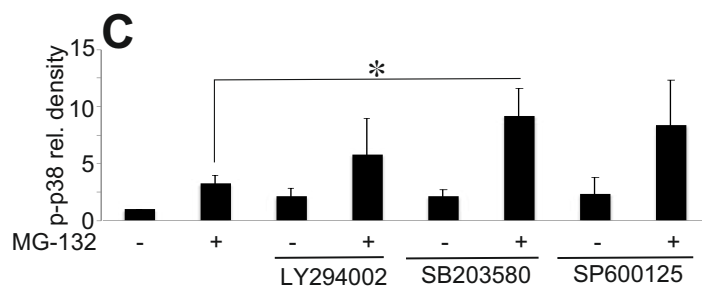
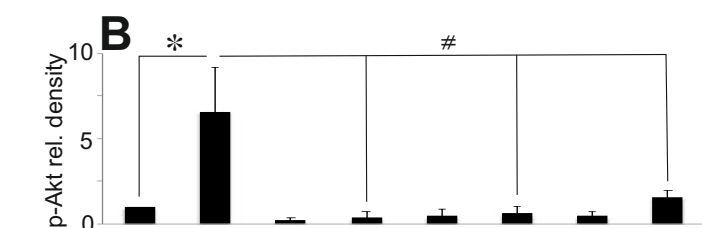
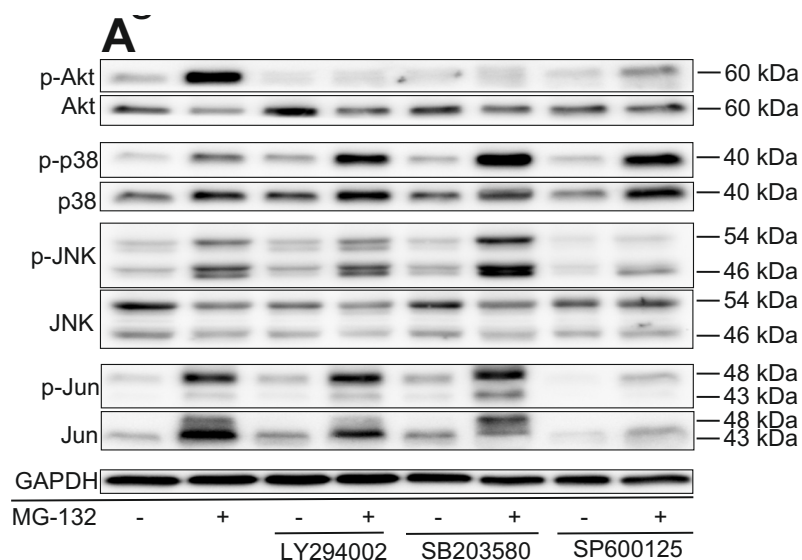
A fentiekben vizsgált kinázok szerepének jobb megértése, és a proteaszóma gátlás során felmerülő funkciójuk/kapcsolataik tisztázása érdekében a PC12 sejteket 1 órán át specifikus kináz inhibitorok jelenlétében tenyésztettük, majd 3 órán át MG-132-vel kezeltük, melynek során a kináz gátlók is végig jelen voltak a tenyészetekben (**18. ábra**). Kíváncsiak voltunk ezen kívül a különböző kináz inhibitorok proteaszóma gátlás által indukált jelátviteli változásokra gyakorolt hatásaira is.

Az LY294002 a PI3K nagy fokban szelektív inhibitora, ami így közvetetten gátolja az Akt foszforilációját. Az SB203580 a p38 specifikus inhibitora, míg az SP600125 egy erős és szelektív JNK-inhibitor.

Az LY294002-vel végzett előkezelés hatékonyan csökkentette mind az alap szintű, mind az MG-132 által kiváltott Akt foszforilációt (**18. ábra, A és B**) PC12 sejtekben, ugyanakkor némileg növekedett jelenlétében (bár statisztikailag nem szignifikáns mértékben) a p38 foszforilációja (**18. ábra, A és C**). A szer hatása a JNK és a c-Jun foszforilációjára nézve elhanyagolható volt (**18. ábra, A, D és E**).

Az SB203580 jelzésű p38-inhibitorral végzett előkezelés érdekes módon megakadályozta az MG-132 által kiváltott Akt foszforilációt, és csökkentette az Akt alap aktivitását is (**18. ábra, A és B**), de némileg növelte a p38, JNK és c-Jun fehérjék MG-132 kezelés által kiváltott foszforilációját (igaz, hogy az utóbbi kettőt statisztikailag nem szignifikánsan) (**18. ábra, A, C, D és E**).

Végül az SP600125 jelű JNK-inhibitorral végzett előkezelés megakadályozta az MG-132 által előidézett JNK, c-Jun és Akt, foszforilációt, valamint csökkentette az Akt alap aktivitását (**18. ábra, A, B, D és E**), de növelte (bár statisztikailag nem szignifikáns mértékben) a p38 alap szintű és MG-132 által indukált foszforilációját is (**18. ábra, A és C**).



18. ábra Kináz inhibitorok hatása az Akt, p38, JNK és c-Jun MG-132 által indukált foszforilációjára.

A: Az Akt, p38, JNK és c-Jun foszforiláció immunoblot analízise PC12 sejtekben PI3K-inhibitor (LY294002) (20 μ M), p38-inhibitor (SB203580) (10 μ M) vagy JNK-inhibitor (SP600125) (50 μ M) jelenlétében. A kísérletek során a tenyészeteket kezeletlenül hagytuk, vagy 3 órán át MG-132-vel (2,5 μ M) kezeltük. Ahol jeleztük, ott a megfelelő inhibitorokat 1 órával a proteaszóma gátló kezelés előtt adtuk a tenyészetekhez, majd azok a kísérlet végéig (összesen 4 óráig) még jelen voltak a sejtek felülcszójában. A diagramok az Akt (B), p38 (C), JNK (D) és c-Jun (E) foszforilációs

mintázatát mutatják. Az oszlopok három független kísérlet adataiból számított átlag \pm SD értékeket mutatnak. A statisztikailag szignifikáns különbségeket jeleztük (*#P \leq 0,05).

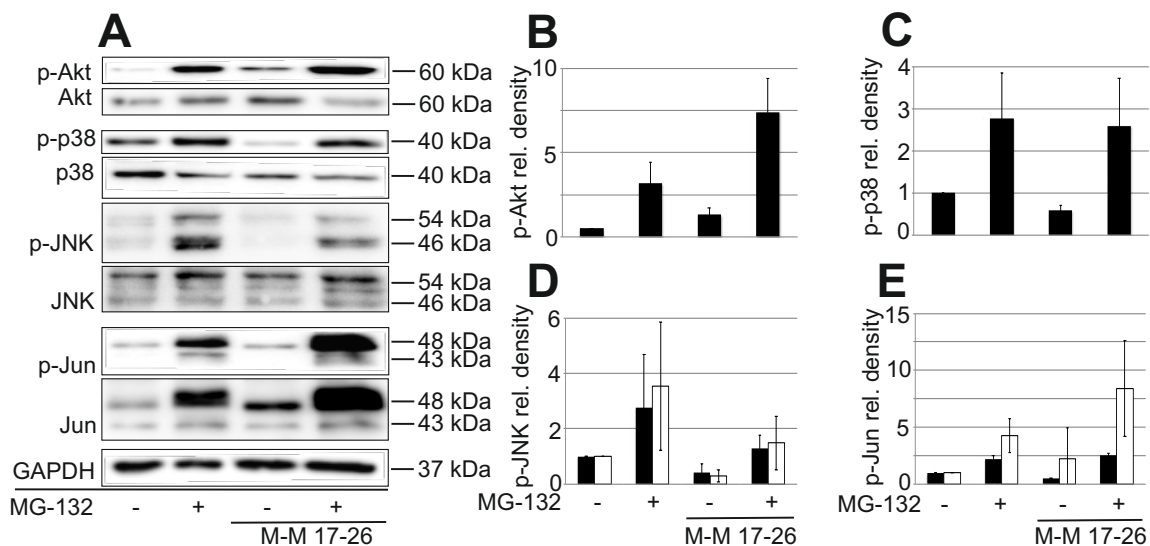
Ezek alapján az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a különböző kináz inhibitorok képesek gyengíteni, vagy bizonyos esetekben felerősíteni az MG-132 által előidézett aktivitásbeli változásokat a vizsgált molekulák esetében.

4. 12. Az Akt-, p38-, JNK- és c-Jun foszforilációja vad típusú PC12 sejtekben és M-M17-26 mutánsokban 3 órás MG-132 kezelést követően

Mivel a Ras a jelátvitel központi szabályozója különféle sejtípusokban, beleértve a PC12 sejteket is, megvizsgáltuk az MG-132 által kiváltott foszforilációs eseményeket a domináns negatív H-Ras mutánst expresszáló PC12 sejt vonalban (M-M17-26, ld fenn a 4.3. részt is) **(19. ábra)**. Ezek a sejtek MG-132 kezelés hatására nem mutatták a neuronális differenciáció jeleit, valamint bennük már rövidebb kezelést követően megfigyelhetők voltak az apoptotikus változások (saját, nem publikált, és itt sem mutatott eredményeink), mint a vad típusú PC12 sejtek esetében. A neuritogenezis elmaradása ebben a sejt vonalban magyarázható -legalábbis részben- ezen mutánsok gátolt ERK foszforilációjával **(lásd 9. ábra)**.

MG-132 kezelés hatására nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni az előzőekben, kináz gátlókkal vizsgált jelátviteli molekulák (Akt, p38, JNK és c-Jun) foszforilációs állapotában a vad típusú PC12 és az M-M17-26 sejtek között. Bár mind a kezeletlen, mind az MG-132-vel kezelt M-M17-26 tenyészetekben emelkedett volt a p-Akt szintje **(19. ábra, A és B)**, a p38 és a JNK alap aktivitása valamivel alacsonyabbnak tűnt az M-M17-26 sejtekben **(19. ábra, A, C és D)**, míg az MG-132 által indukált p38 foszforiláció hasonló mértékűnek bizonyult, mint a vad típusú PC12 sejt vonalban **(19. ábra, A és C)**. Érdekes módon a Ras-funkció hiánya csökkentette a JNK, másrésről viszont növelte a c-Jun foszforilációt MG-132 kezelés hatására **(19. ábra, A, D és E)**.

Tehát a Ras-funkció gátlása megváltoztatja egyes általunk vizsgált jelátviteli fehérjék alapaktivitását amellet, hogy az MG-132 kezelés által indukált aktivitás fokozódás mértékét is képes befolyásolni PC12 sejtekben, bár ezeket nem szignifikáns mértékben teszi.



19. ábra Az Akt, p38, JNK és c-Jun MG-132 által indukált foszforilációja vad típusú és domináns negatív H-Ras-t expresszáló (M-M17-26) PC12 sejtekben.

A: Az Akt, p38, JNK és c-Jun foszforiláció Western blot analízise vad típusú és M-M17-26 PC12 sejtvonalon. A sejteket kezelés nélkül tenyésztettük, vagy 3 órán át MG-132-vel (2,5 μ M) kezeltük. A diagramok az Akt (**B**), p38 (**C**), JNK (**D**) és c-Jun (**E**) aktiválódását mutatják MG-132 kezeléssel vagy anélkül. Az oszlopok három független kísérlet adataiból számított átlag \pm SD értékeket mutatnak.

5. Megbeszélés

Főbb eredményeink összefoglalása:

- Az MG-132 proteaszóma gátlóval végzett kezelés kétfázisú választ vált ki PC12 sejtekben. Kezdetben (kevesebb mint 24 h) neuritnövekedést indukál, de a hosszabb kezelések (több mint 24 h) a sejtek apoptózisához vezetnek.

Neuritogenezis:

- Az MG-132 által előidézett -és a PC12 sejtek differenciációjában kulcsfontosságú- időben elhúzódó ERK aktiváció Ras és MEK függő folyamatok.
- Az MG-132 kezelés Src és TrkA aktivációt is előidéz PC12 sejtekben, amik szintén szükségesek a proteaszóma gátló által kiváltott neuritnövekedéshez.
- A PC12 sejtek Src-gátló vegyülettel (PP2) történő előkezelését követően az MG-132 által előidézett Src és TrkA aktiváció növekedése nem volt megfigyelhető, az ERK foszforiláció mértéke csökkent és átmeneti jellegűvé vált, valamint az aktív ERK nukleáris transzlokációja is mérséklődött, a következményes neuritnövekedés pedig elmaradt.
- A TrkA-gátló (K252a) előkezelés a TrkA aktivációjának kivédése mellett nem befolyásolta a Src foszforilációját, de - a Src-gátlóval összevethető mértékben - csökkentette az ERK aktivációt az MG-132-vel kezelt PC12 sejtekben.
- Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Src megfelelő működése szükséges az MG-132 által indukált TrkA foszforilációhoz, melyet a Ras és MEK függő, elnyújtott ERK aktiváció és az aktív ERK nukleáris transzlokációja követ, ami pedig beindítja a PC12 sejtek neuritnövekedését. Ugyanakkor feltételezik más ERK-aktiváló mechanizmusok létezését is, amelyek függetlenek a Src-tól és a TrkA-tól, és valamely, az MG-132 által stimulált -a Ras-tól és MEK-től is „upstream” elhelyezkedő- jelátviteli komponens(ek) által közvetítettek (lásd később a **20. ábrát**).

Apoptózis:

- A 24 órát meghaladó MG-132 kezelés során a jelátvitel fokozatos eltolódása észlelhető a kezdeti, túlélést közvetítő Akt (és ERK) stimulációjától a stressz-kinázok (p38 és JNK), valamint a kaszpáz-3 fokozódó aktiválódása felé.
- A PI3K-, p38- és JNK-inhibitorok képesek módosítani az MG-132 által kiváltott jelátviteli változásokat.
- A Ras-ERK út inaktivációja megváltoztatja bizonyos jelátviteli fehérjék alapaktivitását épp úgy, mind azok MG-132 kezelést követően detektálható foszforilációjának a mértékét.
- Kináz gátlókkal és a domináns negatív H-Ras-t expresszáló M-M17-26 sejtekkel végzett kísérleteink alapján komplex szabályozási hálózatot találtunk PC12 sejtekben az Akt, p38, JNK és a Ras között, amit a proteaszóma aktivitása jelentősen befolyásol.

A neuritogenezis- és apoptózis jelpályáinak tanulmányozása fontos lehet olyan betegségek megértésében, mint a Parkinson-, vagy Alzheimer kór és más neurodegeneratív kórképek. Ezeknek a jelátviteli utaknak a pontosabb feltérképezése *in vitro* sejtes modellrendszerekben végezhető el legegyszerűbben. A proteaszóma szerepe már korábban is felmerült a neuronális differenciáció- és apoptózis jelátvitelének szabályozásában. Miután a proteaszóma gátlókat már a klinikumban is használják - főleg hematológiai megbetegedések kezelésében - ezért különösen releváns annak felderítése, hogy milyen egyéb hatásokat válthatnak ki ezek a vegyületek. Jelen munkánkban ezekre a kérdésekre kerestünk választ.

A PC12 sejtek normál médiumban tenyésztve lekerekített formájúak, míg az MG-132-vel végzett proteaszóma gátló kezelés hatására nyúlványokat kezdenek növeszteni (neuritogenezis), hasonlóan a Fenteany és munkatársai által megfigyeltekhez (1994), akik Neuro 2A egér neuroblasztóma sejteket kezeltek laktaciszttal. Az általunk használt MG-132 vegyület alacsony koncentrációja a kezeléseik első 24 órájában még nem volt citotoxikus (Song és mtsai, 2009), azonban a 24 óránál hosszabb kezelése a sejtmorfológia fokozatos megváltozásához vezettek a programozott sejthalál (apoptózis) beindítása révén (Rideout és mtsai, 2001). Ez a körülmény sajnos kizárta a hosszabb differenciációs periódusok vizsgálatának lehetőségét a proteaszóma gátló jelenlétében,

ugyanakkor módot adott a hosszabb kezelések hatására bekövetkező, másfajta biológiai és jelátviteli változások elemzésére. Az ERK-et aktiváló, a Src-ot stabilizáló és a neuritogenezist beindító hatásán túl az MG-132 stressz-útvonalakat is képes aktiválni (a JNK-n és a p38-on keresztül) PC12 sejtekben (Giasson és mtsai, 1999) és más, például prosztataráksejtekben is, (Yang és mtsai, 2006). Az UPS számos, rövid- és hosszú élettartamú fehérje intracelluláris szintjét szabályozza, amelyek közül sok a sejtproliferáció, -differentiáció vagy -apoptózis fontos regulátora (Ciechanover, 1998; Lee és Goldberg, 1998). A programozott sejthalál kiváltása során gyakran észlelhető a JNK- és p38-útvonalak aktiválódását előidéző (Sang és mtsai, 2002) és az inhibitor kappa B (I κ B) lebomlását gátló mechanizmusok (McDade és mtsai, 1999; Sasaki és mtsai., 2005) felerősödése, melyeket a proteaszóma gátlók alkalmazása esetén is tapasztalhatunk.

Az ERK különböző ágensek (pl. NGF) által kiváltott foszforilációja jól dokumentált a PC12 sejtek differenciációja során, amikor is az ERK tartós aktivációja szükséges az enzim nukleáris transzlokációjához és a neuritnövekedés beindításához. A sejtmagban az ERK az ott található transzkripciós faktorokat képes foszforilálni, minek következtében a gének átíródásának mintázatát tudja a neuronális differenciációnak kedvező irányba eltolni. (Boglári és mtsai, 1998; Marshall, 1995; Traverse és mtsai, 1992). A proteaszóma gátlók, mint az N-acetil-Leu-Leu-norleucinál és a laktaciszтин, szintén elhúzódnak ERK foszforilációt és neuritnövekedést indukálnak PC12 sejtekben (Hashimoto és mtsai, 2000). Az MG-132 használatával mi is több órán át tartó, elhúzódnak ERK aktivációt figyelhettünk meg, melyet az aktív ERK nukleáris transzlokációja kísért. A proteaszóma gátlása által kiváltott neuritogenezis már néhány óra elteltével nyilvánvaló, míg az NGF-nek napokra van szüksége ahhoz, hogy hasonló hatást fejtsen ki (Greene és Tischler, 1976). A PC12 sejtek proteaszóma gátló jelenlétében megfigyelt kezdeti fenotípusos változásai megfelelhetnek a neuronális differenciáció korai lépéseinek. A proteaszóma gátlók neuritogén hatásának átmeneti jellege (Saito és Kawashima, 1989) arra utal, hogy a proteaszóma gátlók neurit „indító” faktorként hathatnak inkább, míg a neurotrofinok a differenciált állapot stabilizálására és hosszú távú fenntartására is képesek.

A Src enzim központi szerepe ismert a PC12 sejtek differenciációjában (Alemà és mtsai, 1985), illetve a Src családba tartozó kinázok gátlása is gyengítheti az ERK aktiválódását és csökkentheti az NGF-indukálta neuritnövekedést (Dey és mtsai, 2005).

Ezen kívül a proteaszómális lebontás mechanizmusát is leírták ennek a tirozin-kináznak a szabályozásában (Hakak és Martin, 1999), amely során a Src aktív formáit ubiquitin molekulák jelölik meg, hogy aztán a 26S proteaszóma proteolitikus aktivitása révén azok lebontásra kerüljenek. Így, mint azt Obin és munkatársainak a tanulmánya is alátámasztja (1999), a neuritok növekedése egybeeshet (legalábbis részlegesen) az ubiquitin-függő proteolízis gátlásával PC12 sejtekben. Ebben a sejttypusban ráadásul a differenciáció során a Src jellemzően a nyúlványok növekedési kúpjaiban lokalizálódik (Sobue és Kanda, 1988).

Az ERK MG-132 által indukált foszforilációja, ahogy az várható volt, MEK- és Ras-függő módon valósul meg PC12 sejtekben, ami összhangban van Hashimoto és munkatársainak az eredményeivel (2000). Az ő munkacsoportjuk az ERK-aktiváció hasonló mechanizmusát mutatta ki ebben a sejt vonalban, bár az általunk használttól eltérő típusú proteaszóma gátlók (N-acetil-Leu-Leu-norleucinál és laktaciszтин) alkalmazása esetén.

A Src-inhibítor vegyület jelenlétében tapasztalt MG-132 kezelés által kiváltott csökkent foszfo-ERK csúcsintenzitások és az ERK foszforiláció átmenetibb, gyorsabban lecsengő karaktere is azt jelzik, hogy az ERK aktiváció - legalábbis részben - függ az Src intakt funkciójától. Nethrapalli és munkatársai (2001) már leírták, hogy a Src az újszerű, nem genomiális ösztrogén jelátvitel egyik legkorábbi aktivált komponense, ami az ERK fokozott foszforilációjához vezet organotipikus, egér neokortex tenyészetekben. A proteaszóma gátlóval kezelt PC12 sejtekben azonban elsőként mi mutattuk ki, hogy a Src foszforilációja megemelkedett, és kulcsszerepet játszhat a tartós ERK aktivációban.

Más munkacsoportok arról számoltak be, hogy az MG-132 képes a TrkA foszforilációját indukálni PC12 sejtekben, és hogy ez fokozhatja az NGF hatását ebben a sejt vonalban (Song és mtsai, 2009; Song és Yoo, 2011). A TrkA MG-132 által indukált aktivitás növekedése vezethet a Ras és MEK közvetítésével, végül az ERK aktiválásához is. Src-gátlást követően azonban az MG-132 már nem volt képes a TrkA foszforilációját az alap aktivitási szint fölé emelni, ami alátámasztja, hogy a Src működése szükséges a TrkA proteaszóma gátló által kiváltott fokozott foszforilációjához. Shi és munkatársai (2010) Src-függő TrkA transzaktivációról is beszámoltak a PC6 és PC12 sejtek PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) által közvetített neuronális differenciációja során. Jelenleg még nem tudjuk megmondani a pontos kapcsolatot a Src

és a TrkA között az MG-132 által kiváltott aktiválásuk során, mivel azonban a TrkA egy transzmembrán receptor, a Src-nak pedig ismert képessége, hogy kapcsolódjon olyan membrán struktúrákhoz, mint amilyenek például a fokális adhéziók, így mindkét tirozinkináz sejten belüli elhelyezkedése -legalábbis fizikai szempontból- támogathatja ilyen jellegű kölcsönhatásukat.

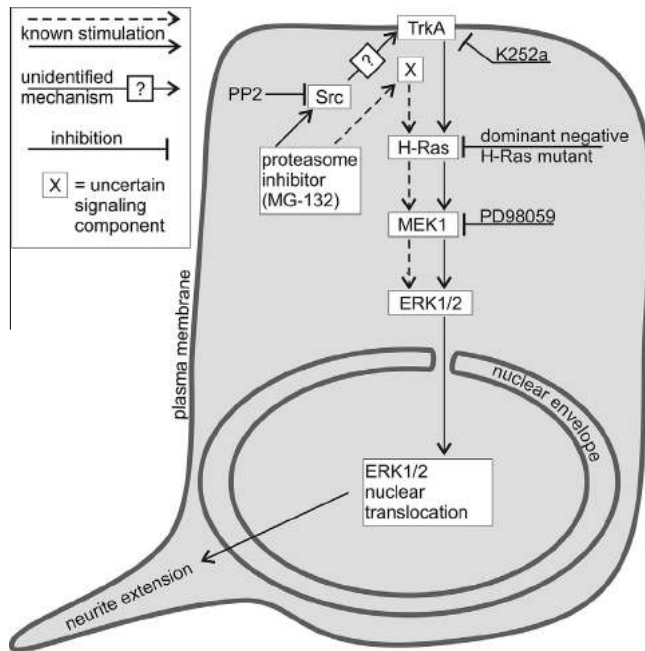
A TrkA transz-/autofoszforilációját gátló, ATP kompetitív inhibitorával, a K252a-val (Angeles és mtsai, 1998; Berg és mtsai, 1992; Tapley és mtsai, 1992) végzett kísérleteink eredményei - más kutatócsoportok (Song és mtsai, 2009; Song és Yoo, 2011) munkáival összhangban - egy olyan jelátviteli mechanizmusra utalnak, amely szerint a proteaszóma gátlása a nagy affinitású NGF-receptor, a TrkA aktiváló foszforilációját váltja ki, amelyet az ERK-nek a Ras- és MEK-függő tartós aktiválása követ. Ennek előfeltétele az aktív Src jelenléte a sejtben, mivel a Src kémiai gátlását követően a TrkA foszforiláció fokozódása elmaradt, és az ERK-é is gyengébbé, valamint átmenetibb jellegűvé vált. Ez a jelenség feltételezi továbbá más ERK-aktiváló mechanizmusok létezését is, amelyek függetlenek a TrkA-ról induló útvonalaktól, és amelyeket más -a Ras-tól és MEK-től is „upstream” elhelyezkedő- MG-132 által stimulált jelátviteli komponens(ek) közvetítenek.

Az aktív Src- és ERK-alakok intracelluláris lokalizációját vizsgálva elmondhatjuk, hogy az MG-132 kezelés hatására felszaporodó aktív Src molekulák a citoplazmában voltak megtalálhatók, míg a foszfo-ERK jel a sejtmagban és a citoplazmában is jelen volt maximális aktivációt kiváltó proteaszóma gátló kezeléseket követően. A Src- vagy TrkA-aktivitásukban gátolt PC12 sejtekben a foszfo-ERK nukleáris transzlokációja nem volt kifejezett, és a sejtek neuritogenezise is elmaradt, ami az intakt Src- és TrkA-funkció fontosságát mutatja ezekben a folyamatokban.

A sejtek morfológiai vizsgálataiból arra következtethetünk, hogy az Src, a TrkA, a Ras és a MEK funkciója is szükséges a PC12 sejtek neuronális differenciációjához, mivel ezek közül bármelyik molekula gátlása a neuritogenezis elmaradásához vezetett.

Különböző kináz gátló vegyületek (PP2, K252a, PD98059), valamint a domináns negatív Ras-t expresszáló PC12 (M-M17-26) sejt vonal használatával végzett kísérleteink eredményei alapján összeállítottunk egy jelátviteli modellt az MG-132 által indukált neuritogenezis mechanizmusára PC12 sejtekben (**20. ábra**). Ennek lényege a Src által közvetített TrkA-foszforiláció fokozódása, melyet a Ras- és MEK-függő tartós ERK

aktiváció, valamint az aktív ERK nukleáris transzlokációja követ, ami végül a sejtek neuritogeneziséhez vezet (**20. ábra, folyamatos nyilak**). Ezen kívül az MG-132 a Src és TrkA megkerülésével, de a Ras és MEK közvetítésével is képes az ERK foszforilációt bizonyos mértékig fokozni, viszont ebben az esetben az aktivált ERK nukleáris transzlokációja nem kifejezett és a neuritogenezis folyamata sem figyelhető meg (**20. ábra, szaggatott nyilak**).



20. ábra Az MG-132 ERK-aktiváló és neuritogén hatásainak eddigi eredményeink alapján javasolt modellje

Az ERK MG-132 kezeléssel indukált, elhúzódó aktiválása a Ras-tól (ez a PC12 sejtek domináns negatív H-Ras-t expresszáló M-M17-26 variánsában gátolt) és a MEK-től (amelyet a PD98059 vegyület kémiailag blokkol) függ. A tartós ERK aktivációnak, az ERK nukleáris transzlokációjának és a neuritnövekedésnek is szükséges előfeltétele az ép Src-funkció (melyet a PP2 kémiailag gátol), ami viszont a TrkA foszforilációja (ez a K252a vegyülettel

gátolható) révén aktiválja az említett útvonalat.

A proteaszóma gátlók klinikai alkalmazása, elsősorban apoptózis-indukáló képességüket kihasználva, egyelőre főleg rosszindulatú hematológiai daganatok kezelésére korlátozódik. Az első proteaszóma gátló vegyület, amit széles körben vizsgáltak, a Bortezomib volt, melynek apoptózis-indukáló képessége mögött négy különböző sejt szintű folyamatot azonosítottak. Ezek szerint a vegyület: (1) gátolja az NF- κ B útvonalat, (2) közvetlenül indukál apoptózist a JNK-n és p53-on keresztül, (3) megakadályozza a pro-apoptotikus fehérjék (mint a Bim, Bid, Bik, Noxa) lebontását és (4) endoplazmatikus retikulum (ER) stresszt és unfolded protein választ (UPR) vált ki (Nunes és Annunziata, 2017).

Munkánk második részében az MG-132 által kiváltott apoptózis molekuláris hátterét vizsgálva az Akt (a sejt túlélést közvetítő kináz) és a stresszválaszt közvetítő

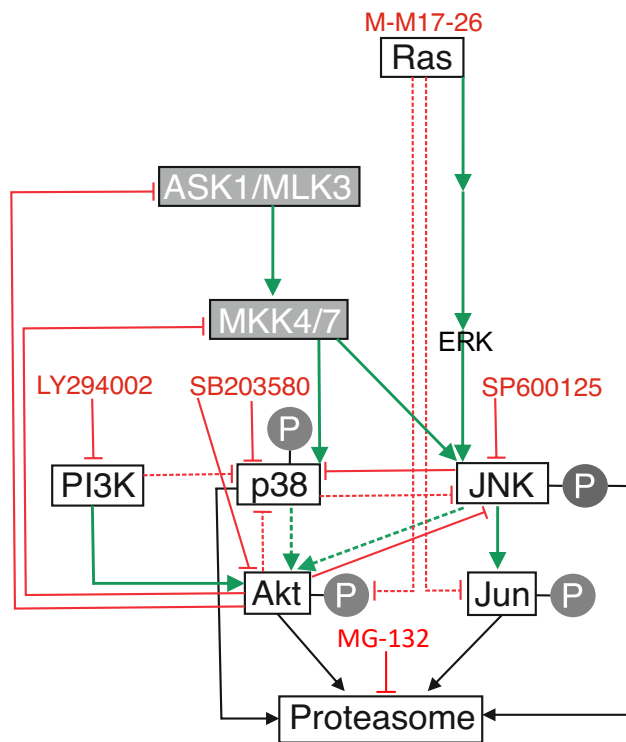
jelátviteli fehérjék (p38, JNK, c-Jun) elhúzódó aktiválódását figyelhettük meg 24 óráig tartó MG-132 kezelés során. 24 óra elteltével az ERK (lásd Dr. Berta Gergely PhD dolgozata, PTE ÁOK, 2013/14, valamint Tarjányi és mtsai, 2013) és az Akt aktivációja már csökkent, míg a p38, JNK és c-Jun stressz jelátviteli molekulák esetében még mindig kifejezett foszforiláció volt megfigyelhető, és az apoptózis jelei is egyre inkább kimutathatók voltak a tenyészetekben. A legfontosabb azonban, hogy a 24 órán át MG-132-vel kezelt mintákban a kaszpáz-3 aktiváló hasítása is nyilvánvalóvá vált. Wu és munkatársai (2020) korábbi eredményei is megerősítették, hogy a JNK tartós – nem átmeneti – aktiválódása hozzájárulhat az apoptózis folyamatához. Ez összhangban van a fenti megfigyelésünkkel, miszerint PC12 sejtekben az MG-132-kezelés hatására a JNK tartós foszforilációja jön létre, mielőtt és mialatt a sejthalál folyamata zajlik.

Megvizsgáltuk az aktivált stressz jelátviteli molekulák sejten belüli lokalizációját is az MG-132 kezelés során. Az aktivált MAPK-k (p38 és JNK) mind a citoplazmában, mind pedig a sejtmagban detektálhatók voltak, a p-c-Jun transzkripciós faktor ezzel szemben kizárólag a proteaszóma gátlóval kezelt PC12 sejtek magjaiban volt megfigyelhető.

A hatásmechanizmussal kapcsolatban fontos szempont, hogy a proteaszóma gátló kezelés hogyan növelheti a jelátviteli molekulák expressziós szintjét vagy aktivitását? Általánosságban elmondható, hogy egyrészt megakadályozhatja magának a foszforilált, tehát aktív jelátviteli molekulának a proteaszómális lebontását és/vagy emellett hasonló hatással lehet azok „upstream” aktivátorára/aktivátoraira. Irodalmi adatok alapján, az összes jelátviteli molekulát, amelyet ebben a kísérletsorozatban vizsgáltunk (de ezeken kívül az aktiválásukban vagy inaktiválásukban részt vevő számos további molekulát is, amelyeket kísérleteinkben nem vizsgáltunk) a proteaszóma lebonthatja. Jelen eredményeink azt támasztják alá, hogy PC12 sejtekben az Akt, p38, JNK és c-Jun foszforilált formái a proteaszómális szabályozás célpontjai. A tartós proteaszóma gátlás az aktivált p38, JNK és kaszpáz-3 felhalmozódásához vezethetett, ami a sejtek apoptózisát idézte elő. Irodalmi adatok alapján mind a p38, mind a JNK részt vesz a pro-apoptotikus Bcl-2 családtagok (pl. Bax és Bim) aktiválásában, valamint az anti-apoptotikus Bcl-2 izoformák (pl. Bcl-2) inaktiválásában, ami végül citokróm c felszabaduláshoz és kaszpáz aktivációhoz vezet (Nguyen és mtsai, 2006).

A hosszan tartó proteaszóma gátló kezelés által kiváltott PC12 sejt apoptózis vizsgálata hozzájárulhat a proteaszóma gátlókkal kezelt betegeknek a megfigyelhető neurológiai mellékhatások jobb megértéséhez. Ezen kívül egyes neurodegeneratív betegségekből, például a Parkinson kórban, a proteaszóma csökkent működését figyelték meg, ami hibásan feltekeredett fehérjék felhalmozódását eredményezi, és a neuronok pusztulásához vezet (Cao és mtsai, 2020). Az első klinikai terápiában használt proteaszóma gátló, a Bortezomib kezelés egyik jól dokumentált szövődménye a Bortezomib-indukálta perifériás neuropathia (BIPN), ami a kezelt betegek mintegy 30-60%-ánál alakul (Velasco és mtsai, 2019). Korábbi tanulmányok az ER stresszt, a mitokondriális diszfunkciót, a gyulladást, a DNS-károsodást és a mikrotubulusokkal kapcsolatos elváltozásokat azonosították a BIPN hátterében (Velasco és mtsai, 2019). Eredményeink alapján a neuronális apoptózis egyéb folyamatai is hozzájárulhatnak a neuropátia kialakulásához, azonban ennek a közvetlen megerősítéséhez még további vizsgálatok szükségesek.

A proteaszóma gátló és kináz inhibitor kezelések kombinálásával betekintést nyerhettünk az Akt, p38, JNK és c-Jun közötti, potenciálisan fennálló kapcsolatok rendszerébe is. A bemutatott kísérleti eredményeink és a vonatkozó szakirodalomból vett további adatok alapján a **21. ábrán** foglaljuk össze ezeknek a kölcsönhatásoknak az általunk javasolt modelljét.



21. ábra Az általunk javasolt hálózat az MG-132 kezelés során végbemenő jelátviteli eseményekről kináz inhibitorok, vagy Ras-gátlás együttes jelenlétekor PC12 sejtekben.

Az aktiválást zöld nyilak, a gátlást piros vonalak jelzik. A szaggatott vonalak a bemutatott eredményeink alapján felvetődött új kapcsolatokat, a folyamatos vonalak az irodalomban már megerősített összefüggéseket jelölik. A munkánk apoptózissal foglalkozó részében vizsgált jelátviteli molekulákat fekete feliratú fehér négyzetek, az általunk nem vizsgált komponenseket pedig szürke

négyzetek jelzik fehér felirattal. Az ERK-et a kísérleteink neuritogenezissel kapcsolatos részében vizsgáltuk, ezért keret nélkül tüntettük fel az ábrának ezen a változatán.

Ahogy az várható volt, a PI3K-inhibitor LY294002 teljesen megszüntette az Akt aktivációt (**18. ábra**). Érdekes módon a PI3K gátlása fokozta az MG-132 által indukált p38 foszforilációt, ami arra utal, hogy a PI3K vagy Akt normális esetben gátló hatással lehet a p38 aktiválására (**18. és 21. ábra**). Más tanulmányok arról számoltak be, hogy az Akt gátolja az MKK4-et, az ASK1-et és az MLK3-at (Fey és mtsai, 2012), amelyek a p38 és a JNK „upstream” aktivátorai. Habár ismert, hogy az Akt gátló hatással bír a JNK-ra a tőle „upstream” irányban található kinázokon keresztül (Fey és mtsai, 2012), PC12 sejtekben mi nem tudtuk kimutatni a JNK és c-Jun-aktiváció szignifikáns növekedését az LY294002 és MG-132 kettős kezelése hatására a kizárólag proteaszóma gátlóval kezelt mintákhoz képest (**18. ábra**). Az ATP kompetitív p38-inhibitor, az SB203580 viszont negatív hatással volt az Akt foszforilációjára, ami arra enged következtetni, hogy a p38 szerepet játszik az MG-132 által kiváltott Akt aktivációban PC12 sejtekben (**18. és 21. ábra**). Az Akt SB203580 általi közvetlen gátlásáról is beszámoltak már (Lali és mtsai, 2000). Az SB203580 kapcsolódik a p38 ATP-kötőhelyéhez, és így gátolja annak kináz-

aktivitását, de az enzim „upstream” kinázok általi foszforilációját nem befolyásolja. Szignifikánsan megnövekedett p38 foszforilációt figyeltünk meg SB203580 és MG-132 kombinált kezelések során, összehasonlítva a kizárólag MG-132-vel kezelt mintákkal (**18. ábra**). Az MG-132 által kiváltott JNK és c-Jun foszforiláció is megemelkedett az SB203580-nal történő kombinált kezelés hatására. Ennek a jelenségnek több magyarázata is lehetséges (**21. ábra**): (1) maga a p38 gátolja a JNK foszforilációját, vagy (2) az Akt különböző szinteken [pl. ASK1, MLK3 (MAPKKKs), MKK4/7 (MAPKK) vagy JNK] gátolja a JNK aktiválódását. Így amikor az SB203580 inaktíválja az Akt-ot közvetlenül vagy közvetve, a p38 inaktiválásán keresztül, az Akt nem képes gátolni a JNK útvonalat. (3) Kimutatták továbbá, hogy az SB203580 fokozza a JNK foszforilációját az MLK3 aktiválása révén, amely utóbbi a JNK aktiválásában szerepet játszó MAPKKK (Muniyappa és Das, 2008). Végül érdemes megemlíteni, hogy az SB203580 által kiváltott MLK3 foszforiláció a korábban említett SB203580 által előidézett Akt inaktiváció következménye is lehet, mivel ebben az esetben az Akt nem képes az MLK3-at gátolni (**21. ábra**).

Az SP600125 egy ATP kompetitív JNK-inhibitor, amely a JNK minden izoformájának kináz aktivitását képes gátolni. Az SP600125 előkezelés jelentősen csökkentette az MG-132 által kiváltott Akt foszforilációt (**18. ábra**), ami arra utal, hogy a JNK aktivitása szükséges az MG-132 kezelés hatására bekövetkező Akt aktivációhoz PC12 sejtekben (**21. ábra**). Az MG-132 által kiváltott p38 foszforiláció megemelkedett a JNK-inhibitor előkezelés hatására (**18. ábra**), ami pedig azt jelzi, hogy a JNK - közvetlen vagy közvetett módon - gátló hatással bír a p38 aktivációra (**21. ábra**). A JNK például aktivál egy E3 ubiquitin ligázt, az Itch-et, amely részt vesz az MKK4 inaktiválásában (Ahn és Kurie, 2009), és ha ezt a gátló útvonalat az SP600125 blokkolja, akkor az MKK4 aktiválhatja a p38-at. A csökkent c-Jun foszforiláció azt mutatja, hogy a JNK aktivitását blokkolja az SP600125 (**18. ábra**), de ezzel párhuzamosan maga a JNK foszforilációja is csökkent a JNK-inhibitor előkezelés hatására (**18. ábra**), ami viszont arra utal, hogy vagy egy pozitív visszacsatolási hurok lehet ebben az útvonalban, vagy a JNK autofoszforilációja a felelős ezért a jelenségért. Fey és munkatársai említik munkájukban, hogy a JNK pozitív feedback-en keresztül képes aktiválni saját „upstream” kinázait, az ASK-t és MLK-t (Fey és mtsai, 2012). Ezen kívül a JNK2 autofoszforilációjáról is beszámoltak már (Cui és mtsai, 2005). A fent említett két

folyamaton kívül más lehetőségek is vannak annak magyarázatára, hogy az SP600125 előkezelés hogyan csökkentheti a JNK foszforilációját. A korábbi következtetések alapján, miszerint az SP600125 növeli a p38 aktivitást, a p38 pedig aktiválja az Akt-ot, ami viszont inaktiválja a JNK „upstream” kinázait (ASK/MLK, MKK4/7), így ez az egész folyamat a JNK foszforilációjának a csökkenéséhez is vezethet **(21. ábra)**.

Végül megvizsgáltuk a Ras, monomer G-fehérje lehetséges szerepét is a fent vázolt folyamatokban. Működő Ras hiányában a proteaszóma gátló kezelés lényegesen eltérő következményekkel járt. A domináns negatív Ras-mutánst expresszáló M-M17-26 PC12 sejtekben az MG-132 által kiváltott ERK foszforiláció teljesen elmaradt **(9. ábra)** és a sejtek neuritogenezise sem volt kimutatható (saját, nem publikált megfigyelésünk). Azonban ezek a mutáns sejtek is mutatták az apoptózis jeleit hosszan tartó MG-132 kezelés hatására, valójában valamivel gyorsabban is, mint a normál/vad típusú PC12 sejtek (saját, nem publikált eredményünk). Ez a megfigyelés is alátámasztja, hogy a Ras-ERK útvonal funkciója szükséges ahhoz, hogy érvényesüljenek az MG-132 kezelés korai fázisában tapasztalt morfológiai változások, azaz a PC12 sejtek neuritogenezise. A tartós proteaszóma gátló kezelés során fellépő későbbi, apoptózist kiváltó eseményeket azonban a Ras-gátlás nem befolyásolta.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy az MG-132 proteaszóma gátlóval végzett kezelés kétfázisú választ indukál a PC12 sejtekben: kezdetben neuritogenezist vált ki, de a hosszabb kezelésekre már apoptózishoz vezetnek. A kezelés korai fázisában (első 24 óra) az MG-132 fokozza a TrkA foszforilációját, melyet a neuronális differenciáció előfeltételének tartott, időben elhúzódó ERK aktiváció követ a Ras, Raf, MEK útvonalon keresztül. Ezekben a folyamatokban fontos szerepe van az aktív Src stabilizálásának, melyet proteaszómális lebontásának gátlásával értünk el. Src-inhibitorral (PP2) történő előkezelés hatására ugyanis a proteaszóma gátló által előidézett TrkA foszforiláció elmaradt, az ERK aktiváció kisebb mértékűnek bizonyult és előbb lecsengett, az aktív ERK nukleáris transzlokációja mérséklődött, és a következményes neuritnövekedés sem volt megfigyelhető. Hasonló változásokat észleltünk K252a (TrkA-inhibitor) előkezelés alkalmazása esetén is. A proteaszóma gátló kezelés második szakaszában (24 óra után) inkább az apoptózis jelei domináltak, melynek hátterében a stressz-kinázok (JNK és p38) és a kaszpáz-3 fokozott, valamint a túlélést közvetítő Akt és ERK csökkent aktivitása volt megfigyelhető. A különböző kináz gátlókkal végzett kísérleteink alapján kimutattuk a

Src, a TrkA és a MEK fehérje szerepét az MG-132 által kiváltott neuritogenezisben, valamint feltérképeztük egy komplex szabályozási hálózat részleteit a stressz-kinázok és a túlélésben szerepet játszó jelátviteli molekulák (Akt és ERK) között. Végül kimutattuk, hogy egyes kináz inhibitorok képesek gátolni, vagy potencírozni az MG-132 által kiváltott jelátviteli változásokat.

Úgy gondoljuk, hogy kísérleti adataink hozzájárulhatnak a proteaszóma gátlók, mint komoly klinikai terápiás potenciállal rendelkező szerek hatásának a jobb megértéséhez. Ezeknek a vegyületeknek mind a differenciációt indukáló, mind a sejtek apoptózisát kiváltó hatása előnyös lehet a tumorterápiában, ugyanakkor eredményeink új információkkal szolgálhatnak a proteaszóma gátlók által kiváltott perifériás neuropátia, illetve különböző neurodegeneratív betegségek molekuláris hátterének megértését illetően is. Az e téren egyre bővülő ismeretek remélhetőleg szelektívebb és kevesebb mellékhatással járó, vagy akár újszerű, kombinációs terápiák kidolgozásához is hozzásegíthetnek a jövőben.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, ifj. Dr. Sétáló Györgynek, hogy szakmai tudásával mindvégig támogatta munkámat, Dr. Szeberényi József professzor úrnak és Dr. Ábrahám Hajnalkának, hogy az Orvosi Biológiai Intézetben végezhettem el kísérleteimet, Dr. Berta Gergelynek a hatékony, közös munkáért, Vecsernyés Mónikának a kísérletek kivitelezésében nyújtott sok segítségével, és az Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium minden dolgozójának.

Szeretném megköszönni továbbá a támogatást szerető férjemnek és három csodálatos gyermekemnek.

Irodalomjegyzék

- Adams J, Kauffman M (2004) Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest* 22:304–311. <https://doi.org/10.1081/cnv-120030218>
- Ahn Y, Kurie JM (2009) MKK4 / SEK1 Is Negatively Regulated through a Feedback Loop Involving the E3 Ubiquitin Ligase Itch. 284:29399–29404. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.044958>
- Alemà S, Casalbore P, Agostini E, Tatò F (1985) Differentiation of PC12 pheochromocytoma cells induced by v-src oncogene. *Nature* 316:557–559. <https://doi.org/10.1038/316557a0>
- Alonso G, Koegl M, Mazurenko N, Courtneidge SA (1995) Sequence requirements for binding of Src family tyrosine kinases to activated growth factor receptors. *J Biol Chem* 270:9840–9848. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.17.9840>
- Aminzadeh A (2017) Protective effect of tropisetron on high glucose induced apoptosis and oxidative stress in PC12 cells: roles of JNK, P38 MAPKs, and mitochondria pathway. *Metab Brain Dis* 32:819–826. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-9976-5>
- Angeles TS, Yang SX, Steffler C, Dionne CA (1998) Kinetics of trkA tyrosine kinase activity and inhibition by K-252a. *Arch Biochem Biophys* 349:267–274. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0490>
- Arthur DB, Akassoglou K, Insel PA (2006) P2Y2 and TrkA receptors interact with Src family kinase for neuronal differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 347:678–682. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.141>
- Ashcroft M, Stephens RM, Hallberg B, et al (1999) The selective and inducible activation of endogenous PI 3-kinase in PC12 cells results in efficient NGF-mediated survival but defective neurite outgrowth. *Oncogene* 18:4586–4597. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202814>
- Berg MM, Sternberg DW, Parada LF, Chao M V (1992) K-252a inhibits nerve growth factor-induced trk proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity. *J Biol Chem* 267:13–16
- Bertheloot D, Latz E, Franklin BS (2021) Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol* 18:1106–1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
- Boglári G, Erhardt P, Cooper GM, Szeberényi J (1998) Intact Ras function is required for sustained activation and nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinases in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *Eur J Cell Biol* 75:54–58. [https://doi.org/10.1016/S0171-9335\(98\)80046-0](https://doi.org/10.1016/S0171-9335(98)80046-0)
- Boglári G, Szeberényi J (2001) Nerve growth factor in combination with second messenger analogues causes neuronal differentiation of PC12 cells expressing a dominant inhibitory Ras protein without inducing activation of extracellular signal-regulated kinases. *Eur J Neurosci* 14:1445–1454. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01787.x>

- Buetow L, Huang DT (2016) Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:626–642. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.91>
- Cai H, Szeberényi J, Cooper GM (1990) Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on mitogenic signal transduction in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 10:5314–5323. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.10.5314-5323.1990>
- Cao Y, Zhu H, He R, et al (2020) Proteasome, a promising therapeutic target for multiple diseases beyond cancer. *Drug Des Devel Ther* 14:4327–4342. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S265793>
- Cheng HC, Bjorge JD, Aebersold R, et al (1996) Purification of bovine thymus cytosolic C-terminal Src kinase (CSK) and demonstration of differential efficiencies of phosphorylation and inactivation of p56lyn and pp60c-src by CSK. *Biochemistry* 35:11874–11887. <https://doi.org/10.1021/bi9603940>
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR (2006) Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 13:1396–1402. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401963>
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, et al (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303:1010–1014. <https://doi.org/10.1126/science.1092734>
- Chuang CY, Tang CM, Ho HY, et al (2019) Licochalcone A induces apoptotic cell death via JNK/p38 activation in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Environ Toxicol* 34:853–860. <https://doi.org/10.1002/tox.22753>
- Ciechanover A (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79:13–21. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90396-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90396-4)
- Ciechanover A (1998) The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 17:7151–7160. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7151>
- Ciechanover A, Brundin P (2003) The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: Sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40:427–446. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00606-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00606-8)
- Cooper JA, Gould KL, Cartwright CA, Hunter T (1986) Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science* 231:1431–1434. <https://doi.org/10.1126/science.2420005>
- Corey EJ, Li WD (1999) Total synthesis and biological activity of lactacystin, omuralide and analogs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 47:1–10. <https://doi.org/10.1248/cpb.47.1>
- Correia C, Lee S-H, Meng XW, et al (2015) Emerging understanding of Bcl-2 biology: Implications for neoplastic progression and treatment. *Biochim Biophys Acta* 1853:1658–1671. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.012>
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65:801–847. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.004101>

- Cox ME, Maness PF (1991) Neurite extension and protein tyrosine phosphorylation elicited by inducible expression of the v-src oncogene in a PC12 cell line. *Exp Cell Res* 195:423–431. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90393-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90393-9)
- Cui J, Holgado-Madruga M, Su W, et al (2005) Identification of a specific domain responsible for JNK2 α 2 autophosphorylation. *J Biol Chem* 280:9913–9920. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412165200>
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
- Darling NJ, Cook SJ (2014) The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta* 1843:2150–2163. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.009>
- Deacon K, Blank JL (1997) Characterization of the mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4)/c-Jun NH2-terminal kinase 1 and MKK3/p38 pathways regulated by MEK kinases 2 and 3. MEK kinase 3 activates MKK3 but does not cause activation of p38 kinase in vivo. *J Biol Chem* 272:14489–14496. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.14489>
- Dey N, Howell BW, De PK, Durden DL (2005) CSK negatively regulates nerve growth factor induced neural differentiation and augments AKT kinase activity. *Exp Cell Res* 307:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.02.029>
- Dick LR, Cruikshank AA, Grenier L, et al (1996) Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin: a central role for clasto-lactacystin beta-lactone. *J Biol Chem* 271:7273–7276. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.13.7273>
- Dikic I, Batzer AG, Blaikie P, et al (1995) Shc binding to nerve growth factor receptor is mediated by the phosphotyrosine interaction domain. *J Biol Chem* 270:15125–15129. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.25.15125>
- Ellis C, Moran M, McCormick F, Pawson T (1990) Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* 343:377–381. <https://doi.org/10.1038/343377a0>
- Esposito D, Patel P, Stephens RM, et al (2001) The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J Biol Chem* 276:32687–32695. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011674200>
- Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, et al (1995) Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268:726–731. <https://doi.org/10.1126/science.7732382>
- Fenteany G, Standaert RF, Reichard GA, et al (1994) A beta-lactone related to lactacystin induces neurite outgrowth in a neuroblastoma cell line and inhibits cell cycle progression in an osteosarcoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3358–3362. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3358>
- Fey D, Croucher DR, Kolch W, Kholodenko BN (2012) Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. *Front Physiol* 3 SEP: <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00355>

- Ganju P, O'Bryan JP, Der C, et al (1998) Differential regulation of SHC proteins by nerve growth factor in sensory neurons and PC12 cells. *Eur J Neurosci* 10:1995–2008. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00209.x>
- Ghosh J, Das J, Manna P, Sil PC (2011) The protective role of arjunolic acid against doxorubicin induced intracellular ROS dependent JNK-p38 and p53-mediated cardiac apoptosis. *Biomaterials* 32:4857–4866. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.048>
- Ghosh Roy S, Sadigh B, Datan E, et al (2014) Regulation of cell survival and death during Flavivirus infections. *World J Biol Chem* 5:93–105. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v5.i2.93>
- Giasson BI, Bruening W, Durham HD, Mushynski WE (1999) Activation of stress-activated protein kinases correlates with neurite outgrowth induced by protease inhibition in PC12 cells. *J Neurochem* 72:1081–1087. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0721081.x>
- Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82:373–428. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2001>
- Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B (2015) Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* 16:2129–2144. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.6.2129>
- Goldberg AL (2007) Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 35:12–17. <https://doi.org/10.1042/BST0350012>
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. 73:2424–2428
- Haas AL, Warms J V, Hershko A, Rose IA (1982) Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 257:2543–2548
- Hagag N, Halegoua S, Viola M (1986) Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to ras p21. *Nature* 319:680–682. <https://doi.org/10.1038/319680a0>
- Hakak Y, Martin GS (1999) Ubiquitin-dependent degradation of active Src. *Curr Biol* 9:1039–1042. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)80453-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80453-9)
- Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, et al (1996) Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271:695–701. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.695>
- Hashimoto K, Guroff G, Katagiri Y (2000) Delayed and sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase induced by proteasome inhibitors through p21(ras) in PC12 cells. *J Neurochem* 74:92–98. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740092.x>
- Hattori K, Hatakeyama S, Shirane M, et al (1999) Molecular dissection of the interactions among IkappaBalpha, FWD1, and Skp1 required for ubiquitin-mediated proteolysis of IkappaBalpha. *J Biol Chem* 274:29641–29647. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.29641>

- Hayakawa R, Hayakawa T, Takeda K, Ichijo H (2012) Therapeutic targets in the ASK1-dependent stress signaling pathways. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 88:434–453. <https://doi.org/10.2183/pjab.88.434>
- Hershko A, Ciechanover A (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61:761–807. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.003553>
- Hershko A, Ciechanover A (1998) THE UBIQUITIN SYSTEM. *Annu Rev Biochem* 67:425–479. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609–642. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>
- Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R (2003) Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist* 8:508–513. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.8-6-508>
- Karlsson T, Kullander K, Welsh M (1998) The Src homology 2 domain protein Shb transmits basic fibroblast growth factor- and nerve growth factor-dependent differentiation signals in PC12 cells. *Cell growth Differ Mol Biol J Am Assoc Cancer Res* 9:757–766
- Kim EK, Choi E-J (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802:396–405. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>
- Kiss K, Salamon S, Töröcsik B, Szeberényi J (2006) Role of phospholipase C-gamma in NGF-stimulated differentiation and gene induction. *Acta Biol Hung* 57:147–155. <https://doi.org/10.1556/ABiol.57.2006.2.2>
- Kisselev AF (2021) Site-Specific Proteasome Inhibitors. *Biomolecules* 12:. <https://doi.org/10.3390/biom12010054>
- Kisselev AF, Goldberg AL (2001) Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 8:739–758. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(01\)00056-4](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(01)00056-4)
- Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L (2015) A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int J Mol Sci* 16:2942–2955. <https://doi.org/10.3390/ijms16022942>
- Kremer NE, D’Arcangelo G, Thomas SM, et al (1991) Signal transduction by nerve growth factor and fibroblast growth factor in PC12 cells requires a sequence of src and ras actions. *J Cell Biol* 115:809–819. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.3.809>
- Kubiczkova L, Pour L, Sedlarikova L, et al (2014) Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *J Cell Mol Med* 18:947–961. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12279>
- Layfield R, Cavey JR, Lowe J (2003) Role of ubiquitin-mediated proteolysis in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev* 2:343–356. [https://doi.org/10.1016/S1568-1637\(03\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S1568-1637(03)00025-4)
- Lee DH, Goldberg AL (1996) Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271:27280–27284. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27280>

- Lee DH, Goldberg AL (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 8:397–403. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(98\)01346-4](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(98)01346-4)
- Li B, Yi P, Zhang B, et al (2011) Differences in endoplasmic reticulum stress signalling kinetics determine cell survival outcome through activation of MKP-1. *Cell Signal* 23:35–45. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.07.019>
- Li W, Bengtson MH, Ulbrich A, et al (2008) Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* 3:e1487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001487>
- Liu W, Tang X, Qi X, et al (2020) The Ubiquitin Conjugating Enzyme: An Important Ubiquitin Transfer Platform in Ubiquitin-Proteasome System. *Int J Mol Sci* 21:. <https://doi.org/10.3390/ijms21082894>
- Lopez J, Tait SWG (2015) Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer* 112:957–962. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.85>
- Ma J, Lv Z, Liu X, et al (2018) MG-132 reverses multidrug resistance by activating the JNK signaling pathway in FaDu/T cells. *Mol Med Rep* 18:1820–1825. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9138>
- Manieri E, Sabio G (2015) Stress kinases in the modulation of metabolism and energy balance. *J Mol Endocrinol* 55:R11-22. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0146>
- Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179–185. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90401-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90401-8)
- Martin GS (2001) The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:467–475. <https://doi.org/10.1038/35073094>
- McConkey DJ, Zhu K (2008) Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother* 11:164–179. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2008.08.002>
- McDade TP, Perugini RA, Vittimberga FJJ, Callery MP (1999) Ubiquitin-proteasome inhibition enhances apoptosis of human pancreatic cancer cells. *Surgery* 126:371–377
- Meister S, Schubert U, Neubert K, et al (2007) Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res* 67:1783–1792. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2258>
- Meng L, Mohan R, Kwok BH, et al (1999) Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10403–10408. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.10403>
- Mielke K, Herdegen T (2000) JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol* 61:45–60. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(99\)00042-8](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(99)00042-8)

- Mohamed MS, Bishr MK, Almutairi FM, Ali AG (2017) Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis* 22:1487–1509. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1429-4>
- Mohty M, Brissot E, Savani BN, Gaugler B (2013) Effects of bortezomib on the immune system: a focus on immune regulation. *Biol blood marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 19:1416–1420. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2013.05.011>
- Moore BS, Eustáquio AS, McGlinchey RP (2008) Advances in and applications of proteasome inhibitors. *Curr Opin Chem Biol* 12:434–440. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.06.033>
- Mulcahy LS, Smith MR, Stacey DW (1985) Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature* 313:241–243. <https://doi.org/10.1038/313241a0>
- Muniyappa H, Das KC (2008) Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580: A MLK-3-MKK7-dependent mechanism. *Cell Signal* 20:675–683. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.12.003>
- Munshi A, Ramesh R (2013) Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. *Genes Cancer* 4:401–408. <https://doi.org/10.1177/1947601913485414>
- Nagata Y, Todokoro K (1999) Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis. *Blood* 94:853–863
- Nethrapalli IS, Singh M, Guan X, et al (2001) Estradiol (E2) elicits SRC phosphorylation in the mouse neocortex: the initial event in E2 activation of the MAPK cascade? *Endocrinology* 142:5145–5148. <https://doi.org/10.1210/endo.142.12.8546>
- Nguyen HT, Hsieh MH, Gaborro A, et al (2006) JNK/SAPK and p38 SAPK-2 mediate mechanical stretch-induced apoptosis via caspase-3 and -9 in NRK-52E renal epithelial cells. *Nephron - Exp Nephrol* 102:.. <https://doi.org/10.1159/000088401>
- Nunes AT, Annunziata CM (2017) Proteasome inhibitors: structure and function. *Semin Oncol* 44:377–380. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2018.01.004>
- Obin M, Mesco E, Gong X, et al (1999) Neurite outgrowth in PC12 cells. Distinguishing the roles of ubiquitylation and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 274:11789–11795. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11789>
- Ola MS, Nawaz M, Ahsan H (2011) Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 351:41–58. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0709-x>
- Omura S, Fujimoto T, Otoguro K, et al (1991) Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 44:113–116
- Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappaB1 precursor protein and the activation of NF-kappaB. *Cell* 78:773–785. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(94\)90482-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(94)90482-0)

- Pap M, Szeberényi J (1998) Differential Ras-dependence of gene induction by nerve growth factor and second messenger analogs in PC12 cells. *Neurochem Res* 23:969–975. <https://doi.org/10.1023/a:1021032405390>
- Petroski MD (2008) The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC Biochem* 9 Suppl 1:S7. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-S1-S7>
- Piwnicka-Worms H, Saunders KB, Roberts TM, et al (1987) Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of pp60c-src. *Cell* 49:75–82. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90757-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90757-4)
- Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, et al (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129:1337–1349. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.027>
- Rechsteiner MC (2004) Ubiquitin-mediated proteolysis: an ideal pathway for systems biology analysis. *Adv Exp Med Biol* 547:49–59. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8861-4_5
- Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD (2009) Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 78:363–397. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526>
- Rideout HJ, Larsen KE, Sulzer D, Stefanis L (2001) Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J Neurochem* 78:899–908. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00474.x>
- Rui L, Herrington J, Carter-Su C (1999) SH2-B is required for nerve growth factor-induced neuronal differentiation. *J Biol Chem* 274:10590–10594. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10590>
- Saito Y, Kawashima S (1989) The neurite-initiating effect of a tripeptide aldehyde protease inhibitor on PC12h cells. *J Biochem* 106:1035–1040. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122960>
- Sang C, Kobayashi Y, Du J, et al (2002) c-Jun N-terminal kinase pathway mediates Lactacystin-induced cell death in a neuronal differentiated Neuro2a cell line. *Brain Res Mol Brain Res* 108:7–17. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(02\)00460-6](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(02)00460-6)
- Sano R, Reed JC (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1833:3460–3470. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>
- Santos SDM, Verveer PJ, Bastiaens PIH (2007) Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol* 9:324–330. <https://doi.org/10.1038/ncb1543>
- Sasaki CY, Barberi TJ, Ghosh P, Longo DL (2005) Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I κ B α -independent NF- κ B pathway. *J Biol Chem* 280:34538–34547. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504943200>
- Segal RA, Greenberg ME (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 19:463–489. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.19.030196.002335>
- Seufert W, Jentsch S (1992) In vivo function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *EMBO J* 11:3077–3080. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05379.x>

- Shi G-X, Jin L, Andres DA (2010) Src-dependent TrkA transactivation is required for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38-mediated Rit activation and neuronal differentiation. *Mol Biol Cell* 21:1597–1608. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-12-1033>
- Shiizaki S, Naguro I, Ichijo H (2013) Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. *Adv Biol Regul* 53:135–144. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2012.09.006>
- Shirley M (2016) Ixazomib: First Global Approval. *Drugs* 76:405–411. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0548-5>
- Sobue K, Kanda K (1988) Localization of pp60c-src in growth cone of PC12 cell. *Biochem Biophys Res Commun* 157:1383–1389. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(88\)81028-3](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(88)81028-3)
- Song EJ, Hong H-M, Yoo YS (2009) Proteasome inhibition induces neurite outgrowth through posttranslational modification of TrkA receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 41:539–545. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.04.022>
- Song EJ, Yoo YS (2011) Nerve growth factor-induced neurite outgrowth is potentiated by stabilization of TrkA receptors. *BMB Rep* 44:182–186. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2011.44.3.182>
- Steele JM (2013) Carfilzomib: A new proteasome inhibitor for relapsed or refractory multiple myeloma. *J Oncol Pharm Pract Off Publ Int Soc Oncol Pharm Pract* 19:348–354. <https://doi.org/10.1177/1078155212470388>
- Superti-Furga G, Fumagalli S, Koegl M, et al (1993) Csk inhibition of c-Src activity requires both the SH2 and SH3 domains of Src. *EMBO J* 12:2625–2634. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05923.x>
- Szeberényi J (1991) NGF-induced neurite regeneration is mediated by a ras-independent pathway in PC12 cells. *Acta Biol Hung* 42:365–369
- Szeberényi J, Cai H, Cooper GM (1990) Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on neuronal differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol* 10:5324–5332. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.10.5324-5332.1990>
- Szeberényi J, Erhardt P (1994) Cellular components of nerve growth factor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1222:187–202. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)90168-6](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90168-6)
- Szeberényi J, Erhardt P, Cai H, Cooper GM (1992) Role of Ras in signal transduction from the nerve growth factor receptor: relationship to protein kinase C, calcium and cyclic AMP. *Oncogene* 7:2105–2113
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7:880–885. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400779>
- Tabas I, Ron D (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13:184–190. <https://doi.org/10.1038/ncb0311-184>

- Tapley P, Lamballe F, Barbacid M (1992) K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7:371–381
- Tarjányi O, Berta G, Harci A, et al (2013) The role of Src protein in the process formation of PC12 cells induced by the proteasome inhibitor MG-132. *Neurochem Int* 63:413–422. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.07.008>
- Teicher BA, Tomaszewski JE (2015) Proteasome inhibitors. *Biochem Pharmacol* 96:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.04.008>
- Toma-Fukai S, Shimizu T (2021) Structural Diversity of Ubiquitin E3 Ligase. *Molecules* 26:. <https://doi.org/10.3390/molecules26216682>
- Traverse S, Cohen P (1994) Identification of a latent MAP kinase kinase in PC12 cells as B-raf. *FEBS Lett* 350:13–18. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00723-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00723-3)
- Traverse S, Gomez N, Paterson H, et al (1992) Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem J* 288 (Pt 2):351–355. <https://doi.org/10.1042/bj2880351>
- Tucker BA, Rahimtula M, Mearow KM (2008) Src and FAK are key early signalling intermediates required for neurite growth in NGF-responsive adult DRG neurons. *Cell Signal* 20:241–257. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.10.014>
- van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 10:251–337. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.10.110194.001343>
- Vaudry D, Stork PJS, Lazarovici P, Eiden LE (2002) Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* 296:1648–1649. <https://doi.org/10.1126/science.1071552>
- Velasco R, Alberti P, Bruna J, et al (2019) Bortezomib and other proteasome inhibitors-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment. *J Peripher Nerv Syst* 24 Suppl 2:S52–S62. <https://doi.org/10.1111/jns.12338>
- Ventura J-J, Hübner A, Zhang C, et al (2006) Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell* 21:701–710. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.018>
- Vetter ML, Martin-Zanca D, Parada LF, et al (1991) Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5650–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5650>
- von Kriegsheim A, Baiocchi D, Birtwistle M, et al (2009) Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nat Cell Biol* 11:1458–1464. <https://doi.org/10.1038/ncb1994>
- Wade M, Li Y-C, Wahl GM (2013) MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 13:83–96. <https://doi.org/10.1038/nrc3430>

- Walkinshaw G, Waters CM (1994) Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. *Neuroscience* 63:975–987. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90566-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90566-5)
- Wang X, Chen L, Maures TJ, et al (2004) SH2-B is a positive regulator of nerve growth factor-mediated activation of the Akt/Forkhead pathway in PC12 cells. *J Biol Chem* 279:133–141. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310040200>
- Wu Q, Wu W, Jacevic V, et al (2020) Selective inhibitors for JNK signalling: a potential targeted therapy in cancer. *J Enzyme Inhib Med Chem* 35:574–583. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1720013>
- Yamaguchi M, Tanaka T, Waki M, et al (1997) Antisense src expression inhibits tyrosine phosphorylation of Shc and its association with Grb2 and Sos which leads to MAP kinase activation in U937 human leukemia cells. *Leukemia* 11:497–503. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2400605>
- Yang W, Monroe J, Zhang Y, et al (2006) Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells. *Cancer Lett* 243:217–227. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.11.033>
- Yang Y, Yu X (2003) Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 17:790–799. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0654rev>
- Ye K, Compton DA, Lai MM, et al (1999) Protein 4.1N binding to nuclear mitotic apparatus protein in PC12 cells mediates the antiproliferative actions of nerve growth factor. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 19:10747–10756. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-24-10747.1999>
- Yee-Lin V, Pooi-Fong W, Soo-Beng AK (2018) Nutlin-3, A p53-Mdm2 Antagonist for Nasopharyngeal Carcinoma Treatment. *Mini Rev Med Chem* 18:173–183. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170717125821>
- Yew EHJ, Cheung NS, Choy MS, et al (2005) Proteasome inhibition by lactacystin in primary neuronal cells induces both potentially neuroprotective and pro-apoptotic transcriptional responses: A microarray analysis. *J Neurochem* 94:943–956. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03220.x>
- Yi S, Shi W, Zuo M, et al (2021) Endoplasmic Reticulum Stress Is Involved in Glucocorticoid-Induced Apoptosis in PC12 Cells. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2021:5565671. <https://doi.org/10.1155/2021/5565671>
- Yip KW, Reed JC (2008) Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 27:6398–6406. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.307>
- Young SW, Dickens M, Tavaré JM (1994) Differentiation of PC12 cells in response to a cAMP analogue is accompanied by sustained activation of mitogen-activated protein kinase. *FEBS Lett.* 338:212–216

Saját közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények (IF: 7,259; jelen dolgozatban felhasznált IF: 6,087)

Tarjányi O., Berta G., Harci A., Bacsa E., Stark B., Pap M., Szeberényi J., and Setalo G. J. (2013) The role of Src protein in the process formation of PC12 cells induced by the proteasome inhibitor MG-132. *Neurochem Int* 63:413–422. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.07.008> IF: 2,659

(Dr Berta Gergely PhD értekezésében (PTE-ÁOK, 2014) ebből felhasznált IF:1,172) Jelen dolgozatban felhasznált **IF: 1,487**

Tarjányi O., Haerer J., Vecsernyés M., Berta G., Stayer-Harci A., Balogh B., Farkas K., Boldizsár F., Szeberényi J., and Sétáló G. J. (2022) Prolonged treatment with the proteasome inhibitor MG-132 induces apoptosis in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Sci Rep* 12:5808. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09763-z> **IF: 4,600**

Egyéb közlemények (IF: 32,984)

Balogh B., Vecsernyés M., Stayer-Harci A., Berta G., Tarjányi O., Sétáló G. J. (2023) Urocortin stimulates the ERK1/2 signaling pathway and the proliferation of HeLa cells via CRF receptor 1. *FEBS Open Bio* 13:818–832. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13602> **IF: 2,600 (2022)**

Balogh B., Vecsernyés M., Veres-Székely A., Berta G., Stayer-Harci A., Tarjányi O., Sétáló G. J. (2022) Urocortin stimulates ERK1/2 phosphorylation and proliferation but reduces ATP production of MCF7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 547:111610. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111610> **IF: 4,100**

Boldizsár F., **Tarjányi O.**, Olasz K., Hegyi A., Mikecz K., Glant T.T., Rauch T.A. (2016) FTY720 (Gilenya) treatment prevents spontaneous autoimmune myocarditis and dilated cardiomyopathy in transgenic HLA-DQ8-BALB/c mice. *Cardiovasc Pathol* 25:. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2016.05.003> **IF: 2,359**

Hanyecz A., Olasz K., **Tarjányi O.**, Nemeth P., Mikecz K., Glant T.T., Boldizsár F. (2014) Proteoglycan aggrecan conducting T cell activation and apoptosis in a murine model of rheumatoid arthritis. *Biomed Res Int* 2014:. <https://doi.org/10.1155/2014/942148> **IF: 1,579**

Berta G., Harci A., **Tarjányi O.**, Vecsernyés M., Balogh A., Pap M., Szeberényi J., Sétáló G. J. (2013) Partial rescue of geldanamycin-induced TrkA depletion by a proteasome inhibitor in PC12 cells. *Brain Res* 1520:. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.05.015> **IF: 2,828**

Olasz K., Boldizsár F., Kis-Toth K., **Tarjányi O.**, Hegyi A., van Eden W., Rauch T.A., Mikecz K., Glant T.T. (2012) T cell receptor (TCR) signal strength controls arthritis severity in proteoglycan-specific TCR transgenic mice. *Clin Exp Immunol* 167:. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04506.x> **IF: 3,409**

- Boldizsar F., Kis-Toth K., **Tarjanyi O.**, Olasz K., Hegyi A., Mikecz K., Glant T.T. (2010) Impaired activation-induced cell death promotes spontaneous arthritis in antigen (cartilage proteoglycan)-specific T cell receptor-transgenic mice. *Arthritis Rheum* 62.: <https://doi.org/10.1002/art.27614> **IF: 8,435**
- Tarjanyi O.**, Boldizsar F., Nemeth P., Mikecz K., Glant T.T. (2009) Age-related changes in arthritis susceptibility and severity in a murine model of rheumatoid arthritis. *Immun Ageing* 6.: <https://doi.org/10.1186/1742-4933-6-8> **IF: -**
- Boldizsar F., **Tarjanyi O.**, Nemeth P., Mikecz K., Glant T.T. (2009) Th1/Th17 polarization and acquisition of an arthritogenic phenotype in arthritis-susceptible BALB/c, but not in MHC-matched, arthritis-resistant DBA/2 mice. *Int Immunol* 21.: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp018> **IF: 3,403**
- Farkas B., Boldizsar F., **Tarjanyi O.**, Laszlo A., Lin S.M., Hutas G., Trynieszewska B., Mangold A., Nagyeri G., Rosenzweig H.L., Finnegan A., Mikecz K., Glant T.T. (2009) BALB/c mice genetically susceptible to proteoglycan-induced arthritis and spondylitis show colony-dependent differences in disease penetrance. *Arthritis Res Ther* 11.: <https://doi.org/10.1186/ar2613> **IF: 4,271**

Az értekezés témájában készült poszterek:

- Tarjányi Oktávia**, Vecsernyés Mónika, Berta Gergely, Stayer-Harci Alexandra, Balogh Bálint, Boldizsár Ferenc, Szeberényi József, ifj. Sétáló György: Proteaszóma gátló (MG-132) és kináz gátlók hatása patkány feokromocitóma (PC12) sejtek jelátvitelére (51. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2022)
- Oktávia Tarjányi**, Mónika Vecsernyés, Gergely Berta, Alexandra Stayer-Harci, Bálint Balogh, Ferenc Boldizsár, György Sétáló Jr.: *In vitro treatment with the proteasome inhibitor MG-132 has a biphasic effect in rat pheochromocytoma cells* (11th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/ Organoprotection (ISCTICO) joint meeting of the Hungarian Society for Experimental and Clinical Pharmacology (HUPHAR) and the International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR), Pécs, 2021)
- Oktávia Tarjányi**, Gergely Berta, Alexandra Harci, Bálint Balogh, Mónika Vecsernyés, József Szeberényi, György Sétáló Jr.: *Signaling events induced by the proteasome inhibitor MG-132 in PC12 (rat pheochromocytoma) cells* (Federation of European Neuroscience Societies (FENS), Pécs, 2017)
- Tarjányi Oktávia**, Haerer Julian Tim, Berta Gergely, Harci Alexandra, Balogh Bálint, ifj. Sétáló György: *Patkány feokromocitóma (PC12) sejtvonal proteaszóma gátló (MG-132) által kiváltott apoptózisának jelátviteli változásai* (47. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2017)
- Tarjányi Oktávia**, Berta Gergely, Harci Alexandra, Bacsa Eszter Bernadett, Stark Borbála, Pap Marianna, Szeberényi József, ifj. Sétáló György: *Proteaszóma gátló (MG-132) által indukált neuritnövekedés jelátvitelének vizsgálata patkány feokromocitóma (PC12) sejtekben* (44. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2014)

- Tarjányi Oktávia**, Bacsa Eszter Bernadett, Vecsernyés Mónika, Berta Gergely, Galgóczi Szilvia, Szabó Klaudia, ifj. Sétáló György és Szeberényi József: *Proteaszóma gátló (MG-132) ERK aktivációra kifejtett hatásainak vizsgálata patkány feokromocitóma (PC12) sejtekben* (41. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2011)
- Tarjányi Oktávia**, Harci Alexandra, Berta Gergely, Varga Judit, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: *Patkány feokromocitóma (PC12) sejtek jelátvitelének vizsgálata proteaszóma gátló (MG-132) és Src-inhibitorok (PPI, PP2) jelenlétében* (PhD Tudományos Napok, Budapest, 2009)
- Harci Alexandra, **Tarjányi Oktávia**, Ifj. Sétáló György, Szeberényi József: *Proteaszómagátló hatása az ERK1/2 és Src kinázok foszforilációjára, illetve intracelluláris elhelyezkedésére PC12 sejtekben* (PhD Tudományos Napok, Budapest, 2009)
- Harci Alexandra, **Tarjányi Oktávia**, Setalo Gyorgy Jr and Szeberenyi Jozsef: *Phosphorylation and intracellular distribution of protein kinases ERK1/2 and Src in proteasome-inhibited PC12 cells* (33rd Federation of European Biochemical Societies (FEBS) and 11th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference, Athén, Görögország, 2008)
- Berta Gergely, Stark Borbála, **Tarjányi Oktávia**, Harci Alexandra, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: *MG-132 proteaszóma gátló differenciációs és apoptotikus hatása PC12 sejtekben* (Magyar Humán-genetikai társaság VII. Kongresszusa, Pécs, 2008)
- Tarjányi Oktávia**, Stark Borbála, Berta Gergely, Harci Alexandra, Varga Judit, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: *Proteaszóma gátló (MG-132) és Src-inhibitorok (PPI, PP2) neuronális differenciációt befolyásoló hatásainak vizsgálata PC12 sejtekben* (Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006)
- Stark Borbála, Berta Gergely, **Tarjányi Oktávia**, Harci Alexandra, Varga Judit, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: *MG-132 jelátviteli és morfológiai hatásai patkány feokromocitóma tenyészetekben* (Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006)
- Tarjányi Oktávia**, Berta Gergely, Stark Borbála, Harci Alexandra, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: *Proteaszóma gátló (MG-132) és Src-inhibitorok (PPI, PP2) jelátviteli hatásainak vizsgálata patkány feokromocitóma (PC12) sejtekben* (36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006)
- Stark Borbála, Berta Gergely, **Tarjányi Oktávia**, Harci Alexandra, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: *Proteaszóma gátlás hatása PC12 patkány feokromocitóma sejtek differenciációjára és túlélésére* (36. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2006)

Egyéb posztterek:

- Reka Kugyelka, Katalin Olasz, Zoltan Kohl, Sohn Hee Seung, **Oktavia Tarjanyi**, Peter Nemeth, Timea Berki, Ferenc Boldizsar: *Analysis of partial ZAP-70 deficiency in a murine model of rheumatoid arthritis* (4th European Congress of Immunology (ECI), Bécs, Ausztria, 2015)
- Gergely Berta, Alexandra Harci, **Oktavia Tarjányi**, Mónika Vecsernyés, András Balogh, Marianna Pap, József Szeberényi and György Sétáló, Jr.: *Partial rescue of geldanamycin- induced TrkA depletion by a proteasome inhibitor in PC12 cells* (2nd International Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2013)
- Boldizsár Ferenc, **Tarjányi Oktávia**, Olasz Katalin, Kis-Tóth Katalin, Mikecz Katalin, Glant T. Tibor: *A TcR jelátvitel és apoptosis patogenetikai szerepe spontán arthritis modellben* (42. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2012)
- Boldizsár Ferenc, **Tarjányi Oktávia**, Olasz Katalin, Hegyi Ákos, Németh Péter, Mikecz Katalin és Glant T. Tibor: *Az interleukin-4 (IL-4) módosítja az in vitro aktiváció indukált sejthalált egér T sejtekben* (39. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2009)
- Oktavia Tarjanyi**, Ferenc Boldizsar, Katalin Mikecz, Tibor T. Glant *Gene Expression Profile of Secondary Lymphoid Organs in BALB/c Mice with Proteoglycan-Induced Arthritis* (72nd Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology/43rd Annual Scientific Meeting of the Association of Rheumatology Health Professionals, San Francisco, USA, 2008) *Arthritis and Rheumatism*, 2008; 58(9) Suppl. S 509.
- Ferenc Boldizsar, **Oktavia Tarjanyi**, Balint Farkas, Katalin Mikecz, Tibor T. Glant: *Th1 and Th17 Cells Dominate in the Peritoneal Cavity of BALB/c Mice during the Initiation Phase of Proteoglycan-Induced Arthritis (PGIA)* (72nd Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology/43rd Annual Scientific Meeting of the Association of Rheumatology Health Professionals, San Francisco, USA, 2008) *Arthritis and Rheumatism*, 2008; 58(9) Suppl. S 842-843.
- Ferenc Boldizsar, **Oktavia Tarjanyi**, Katalin Mikecz, Tibor T. Glant: *Adoptive Transfer of Proteoglycan (PG)-Induced Arthritis (PGIA) to SCID mice with Peritoneal Cells from PG Immunized BALB/c Mice* (72nd Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology/43rd Annual Scientific Meeting of the Association of Rheumatology Health Professionals, San Francisco, USA, 2008) *Arthritis and Rheumatism*, 2008; 58(9) Suppl. S 507.
- Varga Judit, Bátor Judit, Stark Borbála, Harci Alexandra, **Tarjányi Oktávia**, Szeberényi József: *Nitrogén-oxid szerepe PC12 patkány phaeochromocytoma sejtek apoptózisában* (VII. Magyar Genetikai Kongresszus XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007)
- Bátor Judit, Varga Judit, Harci Alexandra, Stark Borbála, **Tarjányi Oktávia**, Szeberényi József: *Nitroziláció hatása PC12 sejtek neuronális differenciációjára* (Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006)
- Berta Gergely, Stark Borbála, **Tarjányi Oktávia**, Sétáló György Jr., Szeberényi József: *The effect of proteasome inhibition on PC12 cells* (30th Federation of European

Biochemical Societies (FEBS) – 9th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference, Budapest, 2005)

Berta Gergely, Stark Borbála, **Tarjányi Oktávia**, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: *Proteaszóma-, és nukleáris export- gátlás hatásának vizsgálata PC12 sejtekben* (VI. Magyar Genetikai Kongresszus XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, 2005)

Egyéb előadások:

Ferenc Boldizsar, Katalin Olasz, Katalin Kis-Toth, **Oktavia Tarjányi**, Akos Hegyi, Willem van Eden, Tibor A. Rauch, Katalin Mikecz, Tibor T. Glant: *TcR signal dependent experimental arthritis in proteoglycan-specific TcR transgenic mice* (46th Annual Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Budapest, 2012)

Ferenc Boldizsar, Katalin Olasz, Katalin Kis-Toth, **Oktavia Tarjányi**, Akos Hegyi, Willem van Eden, Tibor A. Rauch, Katalin Mikecz, Tibor T. Glant: *Studying the role of T cell receptor (TcR) signaling in the arthritis of proteoglycan-specific TcR transgenic mice* (IMPULSE, EFIS-EJI Symposium, Visegrád, Magyarország, 2011)

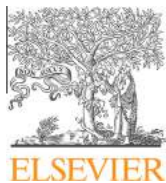
Ferenc Boldizsar, **Oktavia Tarjányi**, Katalin Kis-Toth, Katalin Olasz, Akos Hegyi, Peter Nemeth, Katalin Mikecz, Tibor T. Glant: *Spontaneous arthritis develops in aged cartilage proteoglycan(PG)- specific TcR transgenic (tg) mice* (7th International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, Szlovénia, 2010)

Ferenc Boldizsar, **Oktavia Tarjányi**, Katalin Olasz, Akos Hegyi, Peter Nemeth, Katalin Mikecz, Tibor T. Glant: *HLA-DQ8 transgenic mice in BALB/c genetic background develop spontaneous myocarditis* (2nd European Congress of Immunology (ECI), Berlin, Németország, 2009)

Varga Judit, Bátor Judit, **Tarjányi Oktávia**, Szeberényi József: *A Ras fehérje szerepe PC12 sejtek nitrogén-oxid indukálta apoptózisában* (PhD Tudományos Napok, Budapest, 2009)

Balint Farkas, Ferenc Boldizsar, **Oktavia Tarjányi**, Aaron Mangold, Anna Laszlo, Tibor T. Glant: *A New Murine Model of Spondyloarthritis: Arthritis Resistant DBA/2 Mice Develop Autoimmune Ankylosing Spondylitis* (72nd Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology/43rd Annual Scientific Meeting of the Association of Rheumatology Health Professionals, San Francisco, USA, 2008) *Arthritis and Rheumatism*, 2008; 58(9) Suppl. S 945.

Melléklet



The role of Src protein in the process formation of PC12 cells induced by the proteasome inhibitor MG-132



Oktávia Tarjányi^{a,b}, Gergely Berta^{a,b}, Alexandra Harci^{a,b}, Eszter B. Bacsa^a, Borbála Stark^a, Marianna Pap^{a,b}, József Szeberényi^{a,b}, György Sétáló Jr.^{a,b,*}

^a Department of Medical Biology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, Szigeti út 12, H-7643 Pécs, Hungary

^b Signal Transduction Research Group, János Szentágotthai Research Centre, Pécs, Hungary, Ifjúság útja 20, H-7624 Pécs, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 January 2013

Received in revised form 5 July 2013

Accepted 23 July 2013

Available online 31 July 2013

Keywords:

PC12 cell line

Proteasome inhibition

MG-132

ERK1/2

Src

Neuronal differentiation

ABSTRACT

The PC12 (rat pheochromocytoma) cell line is a popular model system to study neuronal differentiation. Upon prolonged nerve growth factor (NGF) exposure these tumor cells stop to divide, become polygonal, grow projections and start to look and behave like sympathetic neurons. Differentiation of PC12 cells can also be induced by peptidyl-aldehyde proteasome inhibitors, such as Z-Leu-Leu-Leu-al (also known as MG-132) or via infection of the cells with Rous sarcoma virus. The signal transduction pathways underlying process formation, however, are still not fully understood. The liganded NGF receptor initiates a protein kinase cascade a member of which is Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK). Active ERK1/2 enzymes phosphorylate various cytoplasmic proteins and can also be translocated into the nucleus, where they regulate gene expression by activating key transcription factors. Using immunological methods we detected phosphorylation of TrkA, prolonged activation of Src, and ERK1/2 with nuclear translocation of the latter during MG-132-induced process formation of PC12 cells. Activated Src remained predominantly cytoplasmic. MG-132-induced sustained ERK1/2 activation, nuclear translocation and neuritogenesis required the intact function of Src since these phenomena were markedly reduced or failed upon chemical inhibition of Src tyrosine protein kinase activity.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

PC12 cells are derived from a tumor of the rat's adrenal medulla. Upon prolonged exposure to nerve growth factor (NGF) these

Abbreviations: Cy3, a fluorophore cyanin dye; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMSO, dimethyl-sulfoxide; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1 and 2; H-Ras, an isoform of the small guanine nucleotide-binding protein Ras named after Harvey; IκB, inhibitor of kappa B; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAP Kinase, mitogen-activated protein kinase; MEK, mitogen-activated protein kinase/ERK kinase; MG-132, a peptidyl-aldehyde proteasome inhibitor, also known as Z-Leu-Leu-Leu-al; M-M17-26, a variant PC12 clone that stably expresses a dominant negative H-Ras mutant; NGF, nerve growth factor; nnr5, a TrkA-deficient PC12 variant clone; p38MAPK, a MAP kinase with the molecular weight of 38 kDa; PBS, phosphate buffered saline; PC12, rat pheochromocytoma cell line; PD98059, a chemical compound that inhibits MEK; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; PP2, 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine, an inhibitor of Src; PVDF, polyvinylidene difluoride; Ras, a monomeric G-protein; Src, a non-receptor tyrosine kinase; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS, Tris-buffered saline; TrkA, tropomyosin-related kinase.

* Corresponding author at: Department of Medical Biology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, Szigeti út 12, H-7643 Pécs, Hungary. Tel.: +36 72 536 216; fax: +36 72 536 453.

E-mail addresses: gyorgy.setalo.jr@aok.pte.hu, setalogy@citromail.hu (G. Sétáló Jr.).

cells stop to proliferate, grow in size and develop processes, becoming similar to sympathetic neurons both in appearance and behavior (Greene and Tischler, 1976). Complex signaling events are initiated behind these phenomena by the binding of NGF to its high affinity receptor, tropomyosin-related kinase (TrkA) (Chao and Hempstead, 1995; Esposito et al., 2001). Activation of the monomeric G-protein Ras is then followed by the induction of a cytoplasmic protein kinase cascade, with MEK (mitogen-activated protein kinase/ERK kinase) and ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) being its main downstream effectors (Segal and Greenberg, 1996; Szeberényi and Erhardt, 1994; Vaudry et al., 2002). Prolonged activation and nuclear translocation of ERK 1/2 is a necessary requirement of neuronal differentiation in PC12 cells, whereby nuclear ERK can alter gene expression through phosphorylation of key transcription factors (Boglári et al., 1998; Marshall, 1995; Traverse et al., 1992).

Additional pathways can also play a role in PC12 cell differentiation (Szeberényi, 1991). One of these is mediated by the tyrosine protein kinase Src. Expression of the v-src oncogene's protein product in PC12 cells induces neurite outgrowth similar to that resulting from NGF treatment (Alemà et al., 1985; Rausch et al., 1989; Thomas et al., 1991). In the active form Src is not phosphorylated on its C-terminal tyrosine, another tyrosine in the catalytic domain

will, however, be at the same time maximally phosphorylated (Smart et al., 1981).

The ubiquitin–proteasome system plays an important role in the degradation of proteins regulating the cell cycle, apoptosis (Hattori et al., 1999) and cellular metabolism (Doherty et al., 2002; Pickart, 2001). NGF-induced neurite outgrowth coincides with elevated levels of endogenous ubiquitin and ubiquitinated proteins (Obin et al., 1999). Various signal transduction molecules, among them Src can become the victim of proteasome-mediated degradation as the active form of this kinase is broken down through the ubiquitin–proteasome pathway (Hakak and Martin, 1999). The role of the proteasome in protein degradation is well established (Hershko and Ciechanover, 1998; Verma et al., 2004). In addition, the proteasome has been implicated in a number of biological processes, like receptor internalization, protein sorting, subnuclear trafficking, gene expression or neuronal differentiation (Pickart, 2001; Rubinsztein, 2006).

Proteasome inhibitors have been shown to induce neurite outgrowth (Fenteany et al., 1994; Inoue et al., 2004; MacInnis and Campenot, 2005; Momose et al., 2002; Obin et al., 1999) and enhance the differentiation of oligodendroglial cells (Pasquini et al., 2003). MG-132 is a peptidyl-aldehyde, peptidomimetic type proteasome inhibitor (Lee and Goldberg, 1998). Consequently it is in a position to reduce the degradation of various signaling proteins, including that of active Src.

In this study, we investigated the possible role and intracellular localization of Src and ERK1/2, well known components of the differentiative signaling of PC12 cells. Our attention was focused onto the involvement of Src in the MG-132-induced differentiation processes of PC12 cells as we chemically inhibited the negative regulatory pathway of Src mediated by the proteasome or, alternatively, we blocked the activity of Src itself.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All chemicals used were from Sigma–Aldrich (Budapest, Hungary) unless otherwise stated. NGF and the Src inhibitor PP2 were purchased from Invitrogen (Paisley, Scotland, UK). The peptidyl-aldehyde proteasome inhibitor MG-132 has been selected based on its relatively good membrane permeability (Saito and Kawashima, 1989; Saito et al., 1990) and the studies of Giasson et al. (1999) analyzing the stress inducing effect of this compound. Safe concentration (2.5 μ M) and treatment times to avoid possible toxic effects were determined based on the schemes of Song et al. (2009) and Song and Yoo (2011) and were further supported by healthy cell and nuclear morphology during our experiments, also documented on confocal images using fluorescence labeling or a combination of it with phase contrast detection (for examples see Fig. 9). Pilot experiments repeatedly confirmed that dimethyl-sulfoxide (DMSO), the vehicle of non-water-soluble chemicals had no effect on the examined parameters of the experiments at the concentrations applied (0.025 v/v % for single and 0.05 v/v % for combined treatments, not shown).

2.2. Tissue culture

PC12 rat pheochromocytoma cells and their variant clones (M-M17-26 that stably expresses a dominant negative H-Ras mutant or the TrkA deficient nnr5 cells, all three PC12 cell lines kindly provided by G.M. Cooper) passage number 5–15 were plated onto plastic Petri dishes or Thermanox (Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA) coverslips (at 50% or 30% confluence, respectively) and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) complemented with 5% fetal bovine and 10% horse serum,

for a day to achieve sufficient adhesion. The cultures were kept at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Next day the media were replaced by 0.5% horse serum-containing DMEM for 24 h to silence serum-stimulated pathways before and during treatments.

2.3. Western blotting

Upon completion of the treatments the cultures were scraped into ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-base, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EGTA, 1 mM Na-orthovanadate, 5 μ M ZnCl₂, 100 mM NaF, 10 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100) and stored frozen. On the day of processing samples were thawed and homogenized by vortexing for 20 s. The homogenates were centrifuged at 40,000 \times g at 4 °C for 30 min and the protein concentration of the supernatants was determined (Lowry's method, Detergent Compatible Protein Assay Kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Samples containing equal amounts of protein (50 μ g in case of Src/p-Src or TrkA/p-TrkA and 25 μ g for the rest) were mixed with 4 \times Laemmli buffer (25 ml 1 M Tris–HCl, pH 6.8, 40 ml glycerol, 8 g SDS, 10 ml 100 mM EDTA, 10 ml 100 mM EGTA and 1 ml 1% bromophenol blue brought up to 100 ml with distilled water), and boiled for three minutes. Subsequently, they were loaded onto 10% polyacrylamide gels to perform size-based separation. The gels were electro-blotted onto PVDF membranes (Hybond-P, GE Healthcare, UK).

Immunodetection of the protein of interest was carried out by blocking the membrane in 3% nonfat dry milk dissolved in TBS-Tween (10 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20, pH 8.0), followed by addition of the primary antibody [anti-TrkA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti- β -actin, phospho-TrkA and phospho-p44/42 MAP Kinase to detect phospho-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), ERK-1 (C-16), ERK-2 (C-14) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), phosphospecific (Tyr 418) polyclonal anti-Src (Biosource, Camarillo, CA, USA), monoclonal anti-active Src recognizing Src that is phosphorylated at Tyr 418 but unphosphorylated at Tyr 529 (Invitrogen)] diluted in the blocking solution 1:1000 and incubated overnight. Methodical control samples prepared by the omission of the primary antibodies produced no immune signal as determined in pilot experiments. (The reliability of TrkA and phospho-TrkA antisera has also been confirmed by the lack of specific signals in lysates of the TrkA-deficient PC12 variant nnr5 cells.) Excess antibody was removed by five washes of TBS-Tween. Membranes were incubated with a horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Pierce, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA) diluted 1:50,000 in blocking solution. Five washes in TBS-Tween were followed by detection of the enhanced chemiluminescent signal (Immobilon Western, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Densitometry was carried out using the ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

2.4. Data presentation of Western blots

Representative photos are from series with similar results. Densitometric values are the mean \pm S.D. for the indicated repeat number of independent experiments. Significance of differences was determined using ANOVA testing applying Bonferroni corrections for multiple samples. *P* values <0.05 were considered to be significant. Significant differences relevant to major findings are marked in the graphs and their corresponding *P* values are indicated in the figure legend.

2.5. Fluorescence microscopy

Treatments were stopped by rinsing in 37 °C PBS (1.37 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.43 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 0.14 mM KH₂PO₄,

pH 7.4) followed by fixation at room temperature for 1 h in 4% paraformaldehyde dissolved in PBS, pH 7.4. Excess fixative was washed out in three changes of PBS, and three changes of TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl). The blocking of nonspecific binding sites was carried out by incubating the samples in 5% nonfat dry milk dissolved in TBS-Triton (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100), at 4 °C for 1 h under gentle rocking. The primary antibodies phospho-ERK1/2 (Cell Signaling Technology) and anti-active Src (recognizing Src that is phosphorylated at Tyr 418 but unphosphorylated at Tyr 529, Invitrogen) were diluted 1:300 and 1:100, respectively, in the blocking solution and incubated with the samples at 4 °C under gentle rocking overnight. Five washes in TBS-Triton followed to remove the nonspecifically bound antibodies. The fluorescent signal was generated by adding a Cy3-conjugated secondary antibody from Jackson Immuno Research (Cambridgeshire, UK) diluted 1:600 in the blocking solution. At this dilution rate methodical control samples prepared by the omission of the primary antibody produced no immune signal using the applied microscope settings. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Calbiochem, La Jolla, CA).

2.6. Data presentation of confocal micrographs

All experiments have been performed at least three times. Micrographs are representative of series with similar results. Confocal images were generated using an Olympus FV-1000 laser scanning system. Single optical sections were taken with a 40 \times , long distance phase objective at zoom setting 4 for fluorescent captures and setting 2 for fluorescent images combined with phase contrast optics.

Nuclear to cytoplasmic phospho-ERK1/2 ratios, where applicable, were determined by dividing corresponding average pixel intensities and subjecting them to unpaired *t*-test analysis (*P* value <0.0001).

3. Results and discussion

3.1. The kinetics of ERK activation elicited by the proteasome inhibitor MG-132

Inspired by the study of Hashimoto and colleagues (2000) in which they induced PC12 cell differentiation using the proteasome inhibitors *N*-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal and lactacystin we first tested the MG-132-induced kinetics of ERK phosphorylation by Western-blot and an anti-phospho-44/42 MAPK antibody (Fig. 1, panel A). Unlike described by their group a moderate increase of ERK2 activation was detectable in our system already after 15 min of MG-132 treatment, but a more robust rise in the strength of both phospho-specific (ERK1/2) signals was visible only around 30–60 min. ERK1/2 phosphorylation intensity peaked at the sixth hour but stayed above baseline for several hours afterwards. The total ERK content of each sample detected on the same membrane with anti-ERK1 and anti-ERK2 antibodies (Fig. 1, panel B) was used for normalization of the phosphorylated ERK1/2 signals during densitometric analysis of the data (Fig. 1, graphs). To reduce the possibility that the observed effects of MG-132 on ERK phosphorylation were caused by the compound *per se* and not through the inhibition of the proteasome we repeated the experiment using 10 nM epoxomicin, another specific inhibitor of the proteasome and recorded similar results of sustained ERK1/2 phosphorylation accompanied by PC12 cell differentiation (see figure in electronic supplementary material, Western blot panels A, B with top two graphs and the micrograph in panel E). Prolonged ERK activation is a requirement of neuronal differentiation in PC12 cells (Traverse et al., 1992; Young et al., 1994).

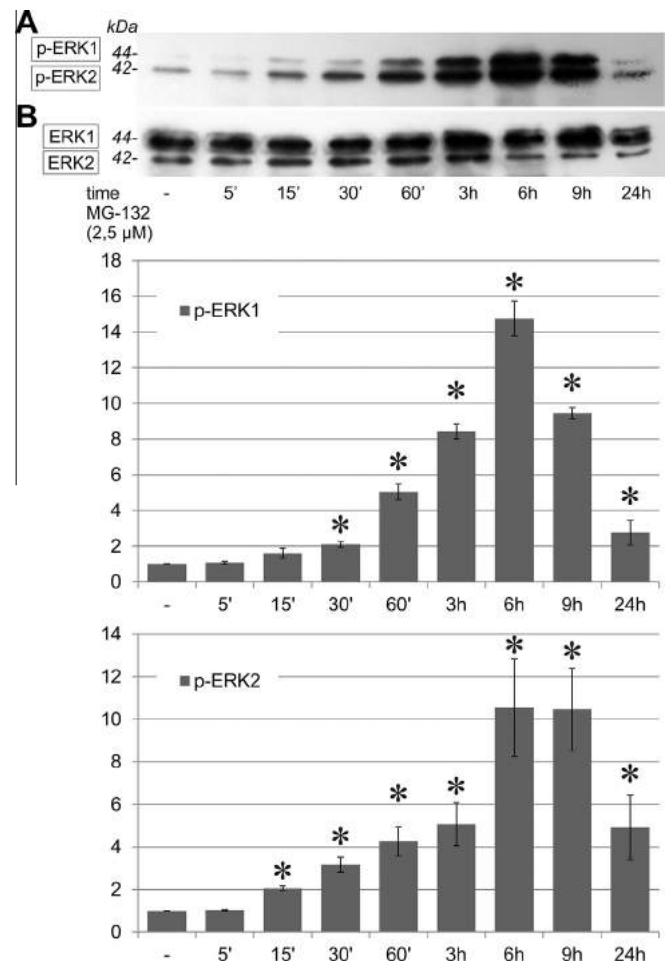


Fig. 1. Time course of ERK phosphorylation induced by MG-132. Panel A: PC12 cultures were treated with MG-132 (2.5 μ M) for the indicated time periods and ERK1/2 phosphorylation was studied by Western blotting. The membrane was probed for the presence of doubly phosphorylated/active p-ERK1 and p-ERK2. Panel B: Subsequently the membrane was stripped and reprobed for total ERK1/2 as loading control. The graphs demonstrate relative intensities of p-ERK1 and 2 (upper and lower diagrams, respectively) compared to the untreated control and normalized against the loading control. The values shown are mean \pm S.D. of three independent experiments. * = significantly different from the untreated control. (*P*-values of pairwise lane comparisons numbered left-to-right for p-ERK1 are: $P_{1-4} = 0.0364$; $P_{1-5} < 0.0001$; $P_{1-6} < 0.0001$; $P_{1-7} < 0.0001$; $P_{1-8} < 0.0001$; $P_{1-9} = 0.0005$; and for p-ERK2 are: $P_{1-3} = 0.0101$; $P_{1-4} = 0.0425$; $P_{1-5} = 0.0027$; $P_{1-6} = 0.0001$; $P_{1-7} < 0.0001$; $P_{1-8} < 0.0001$; $P_{1-9} = 0.0002$).

3.2. The kinetics of Src-phosphorylation induced by MG-132

The known involvement of Src in PC12 cell differentiation (Alemà et al., 1985) and that of the proteasome in the regulation of this tyrosine kinase (Hakak and Martin, 1999) made Src another logical target of analysis during the MG-132-induced differentiative signaling events. Indeed, we could detect the MG-132-induced activation of Src on immunoblots using a polyclonal phosphospecific (Tyr 418) anti-Src antibody. Strong Src activity was detectable between 30 min and 9 h during treatments. Even at 24 h we could measure Src-phosphorylation above the baseline (Fig. 2, panel A and graph). In view of possible alterations in the amount of total Src during prolonged MG-132 treatments (Hakak and Martin, 1999) reprobing of the membrane was performed with an anti-actin antibody and proved equal loading of the lanes (Fig. 2, panel B). A similar, sustained phosphorylation of Src could also be detected during treatment of PC12 cells with 10 nM of the specific proteasome inhibitor compound epoxomicin (see figure in electronic

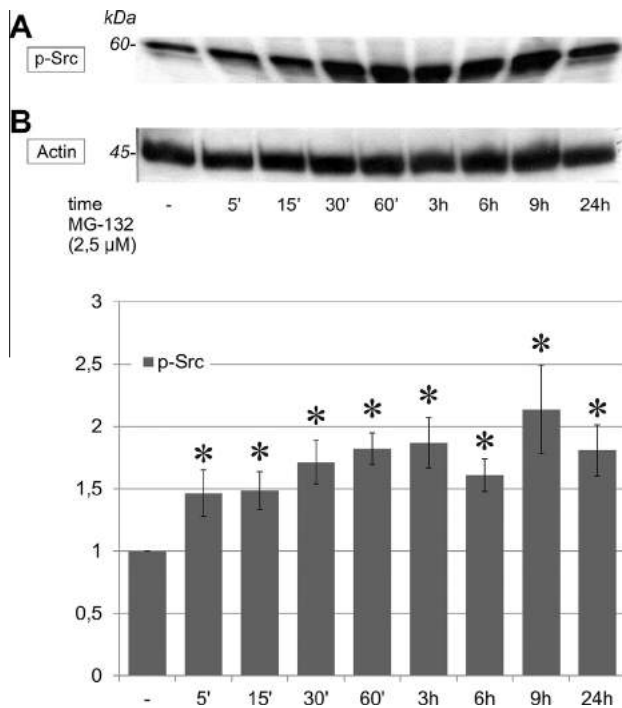


Fig. 2. Time course of Src phosphorylation induced by MG-132. Panel A: PC12 cultures were treated with MG-132 (2.5 μM) for the indicated time periods and Src phosphorylation was analyzed by immunoblotting. The membrane was probed for the presence of phosphorylated/active p-Src with a polyclonal antibody. Panel B: Subsequently the membrane was stripped and reprobed for actin as loading control. The graph demonstrates relative intensities of p-Src compared to the untreated control and normalized against the loading control. The values shown are mean ± S.D. of four independent experiments. * = significantly different from the untreated control. (*P*-values of pairwise p-Src lane comparisons numbered left-to-right are: $P_{1-2} = 0.003$; $P_{1-3} = 0.0017$; $P_{1-4} < 0.0001$; $P_{1-5} < 0.0001$; $P_{1-6} < 0.0001$; $P_{1-7} < 0.0001$; $P_{1-8} < 0.0001$; $P_{1-9} < 0.0001$).

supplementary material, Western blot panels C, D with bottom graph). This observation reduces the likelihood of that the effects seen were elicited by the applied different compounds *per se* and not as proteasome inhibiting agents.

Differentiation of PC12 cells is accompanied by the activation of numerous pathways including ERK1/2, and pp60c-Src is localized to the growth cones of processes (Sobue and Kanda, 1988). Highly active forms of Src family kinases are marked by ubiquitination for degradation by the 26S proteasome and MG-132 treatment is known to inhibit the degradation of active Src (Hakak and Martin, 1999). We could detect the increased activity of Src in MG-132-treated PC12 cells and it showed sustained kinetics similar to that of ERK1/2.

3.3. The MG-132-induced phosphorylation of ERK is MEK-dependent

Testing the role of MEK, the activating kinase of ERK1/2 in the MG-132-induced phosphorylation of ERK, the MEK-inhibitor PD98059 (20 μM added 30 min before the start of specific treatments) blocked ERK1/2 activation. The MG-132-induced and unstimulated phospho-ERK signals both went below baseline in the presence of PD98059 (Fig. 3, panel A). Reprobing of the membrane for total ERK1/2 excluded loading differences behind the observed alterations of the phospho-specific signal (Fig. 3, panel B). This observation indicates that the MG-132-induced phosphorylation of ERK1/2, as expected, occurs in a MEK-dependent way in PC12 cells.

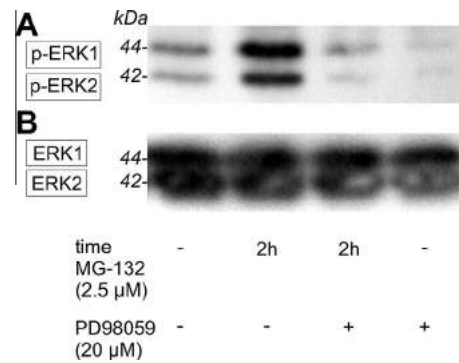


Fig. 3. The dependence of ERK1/2 phosphorylation on intact MEK function. Panel A: PC12 cultures were treated with MG-132 (2.5 μM) for 2 h in the presence or absence of the MEK inhibitor compound PD98059 (20 μM) and the phosphorylation of ERK1/2 was analyzed by immunoblotting. The MEK inhibitor was added to the cultures 30 min before the start of MG-132 treatments. Panel B: Subsequently the membrane was stripped and reprobed for total ERK1/2 as loading control. The experiment was repeated three times with similar results.

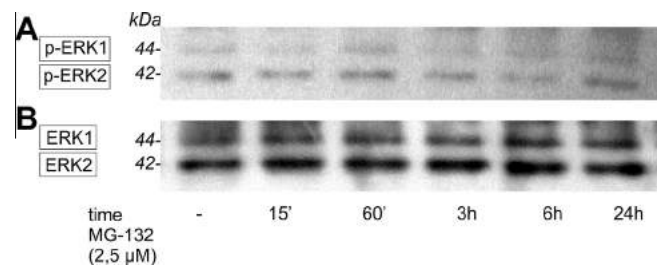


Fig. 4. The dependence of ERK1/2 phosphorylation on intact Ras function. Panel A: PC12 variant M-M17-26 cultures were treated with MG-132 (2.5 μM) for the indicated times and the phosphorylation of ERK1/2 was analyzed by immunoblotting. Panel B: Subsequently the membrane was stripped and reprobed for total ERK1/2 as loading control. The experiment was repeated three times with similar results.

3.4. The role of Ras in the MG-132-induced phosphorylation of ERK

In order to see if the MG-132-induced phosphorylation of ERK depended on the function of Ras we performed time-course experiments using the PC12 variant clone M-M17-26 that expresses a dominant negative mutant of H-Ras in a stable fashion. The baseline level of ERK phosphorylation was weak in this cell line and it could not be further increased at any treatment timepoint (Fig. 4, panel A). The blot was subsequently reprobed for total ERK1/2 to be used as loading control (Fig. 4, panel B). These data support the Ras-dependence of MG-132-induced ERK1/2 phosphorylation in PC12 cells. This observation, together with the effect of PD98059 under Section 3.3 is in line with the report of Hashimoto et al. (2000), who also found the Ras- and MEK-dependent activation of ERK1/2 in PC12 cells using *N*-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal and lactacystin, both being specific inhibitors of the proteasome.

3.5. The effect of Src inhibition on Src phosphorylation

To further investigate the role of Src we applied 10 μM PP2 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl) pyrazolo [3,4-*d*]pyrimidine), a potent and selective inhibitor of the Src family of tyrosine kinases (Hanke et al., 1996; Liu et al., 1999; Maruyama et al., 2004; Nagao et al., 1998). During MG-132 treatments accompanied by PP2 pretreatments the latter always started 30 min before the addition of the proteasome inhibitor. Experiments were carried out for durations that induced maximal Src phosphorylation in

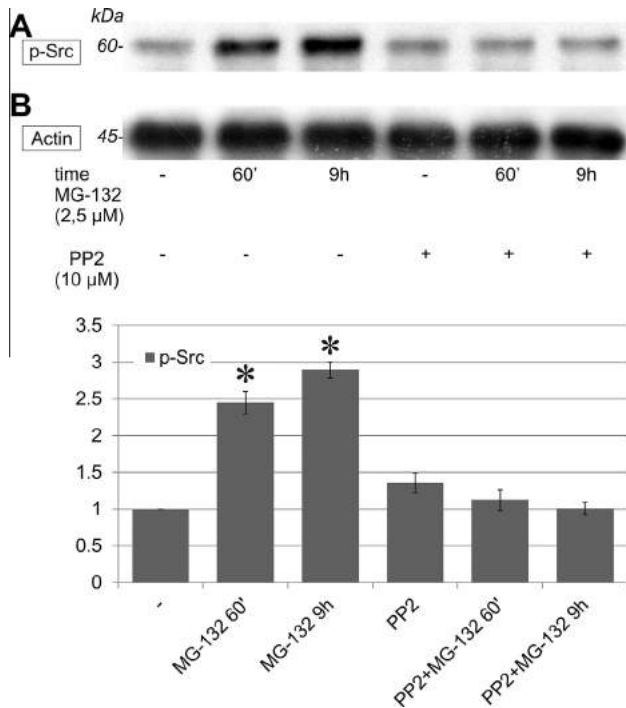


Fig. 5. The effect of MG-132 on Src phosphorylation without and with the inhibition of Src using PP2. Panel A: PC12 cultures were treated with MG-132 (2.5 μ M) for the indicated time periods. PP2, where applicable, was added to the cultures 30 min before the start of MG-132 treatments. The membrane was probed for the presence of phosphorylated/active p-Src using a monoclonal antibody. Panel B: Subsequently the blot was stripped and reprobed for actin as loading control. The graph demonstrates relative intensities of p-Src compared to the untreated control and normalized against the loading control. The values shown are mean \pm S.D. of four independent experiments. * = significantly different from the untreated control. (*P*-values of pairwise p-Src lane comparisons numbered left-to-right are: $P_{1-2} = 0.0049$; $P_{1-3} = 0.0008$).

preceding time-course studies. The Src inhibitor could completely block the Src activating effect of MG-132 (Fig. 5, panel A and graph). Reprobing of the membrane with anti-actin verified equal loading over the lanes (Fig. 5, panel B).

3.6. The effect of Src inhibition on ERK1/2 phosphorylation

Next we examined the effect of Src inhibition on the activation of ERK1/2 by MG-132. Like above, in Section 3.5, the cells' incubation with the Src inhibitor started 30 min before treatments with MG-132. The presence of PP2 did not block the increase in ERK1/2 phosphorylation completely but reduced its peak intensities elicited by MG-132. Moreover, unlike without Src inhibition, at 24 h the phosphorylated ERK1/2 signal was already below baseline, thus ERK activation has become somewhat more transient in the presence of PP2 (Fig. 6, panel A and graphs). Reprobing the membrane for total ERK1/2 verified equal loading over the lanes (Fig. 6, panel B). The reduced peak levels and more transient nature of ERK1/2 phosphorylation achievable with MG-132 in the presence of the Src-inhibitor compound is indicative of, at least partial dependence of ERK1/2 activation on the intact function of Src. Nethrapalli and colleagues in the Toran-Allerand laboratory (2001) have already described Src as one of the earliest activated component of novel estrogen signaling leading to increased phosphorylation of ERK1/2 in the mouse neocortex. In proteasome inhibitor-treated PC12 cells, however, we are the first to show that Src phosphorylation is elevated and that it might play a pivotal role in sustained ERK activation.

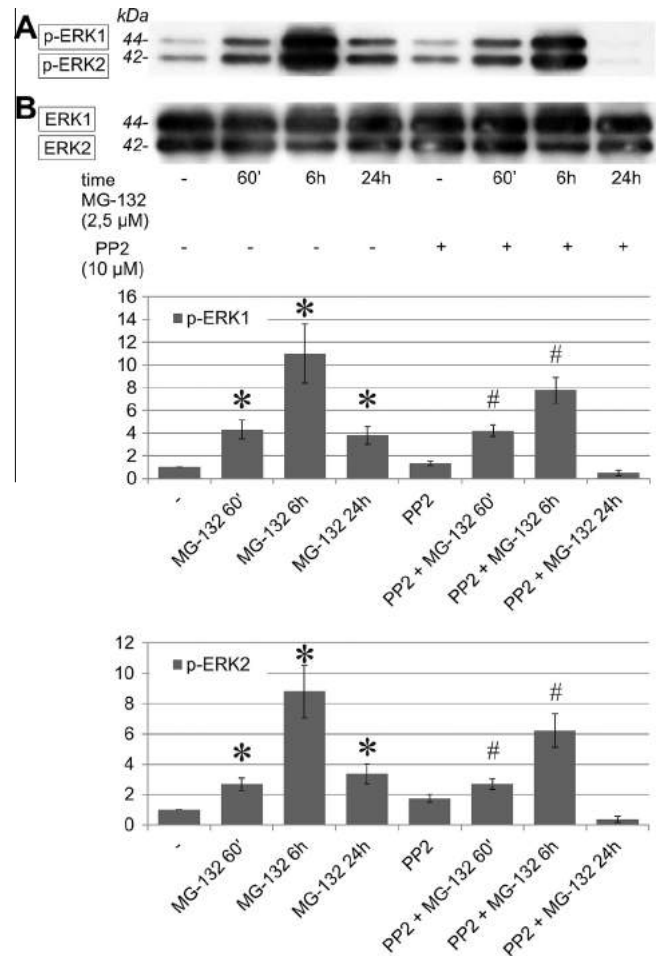


Fig. 6. The effect of MG-132 on ERK phosphorylation without and with the inhibition of Src using PP2. Panel A: PC12 cultures were treated with MG-132 (2.5 μ M) for the indicated time periods. PP2, where applicable, was added to the cultures 30 min before the start of MG-132 treatments. The membrane was probed for the presence of doubly phosphorylated/active p-ERK1/2. Panel B: Subsequently the blot was stripped and reprobed for total ERK1/2 as loading control. The graphs demonstrate relative intensities of p-ERK1 and 2 (upper and lower diagrams, respectively) compared to the untreated control and normalized against the loading control. The values shown are mean \pm S.D. of five independent experiments. * = significantly different from the untreated control. # = significantly different from PP2 treatment alone. (*P*-values of pairwise lane comparisons numbered left-to-right for p-ERK1 are: $P_{1-2} = 0.0009$; $P_{1-3} < 0.0001$; $P_{1-4} = 0.0062$; $P_{5-6} = 0.0049$; $P_{5-7} < 0.0001$ and for p-ERK2 are: $P_{1-2} = 0.0278$; $P_{1-3} < 0.0001$; $P_{1-4} = 0.0007$; $P_{5-6} = 0.0222$; $P_{5-7} < 0.0001$).

3.7. The role of TrkA in MG-132-induced phosphorylation of ERK1/2

Song et al. (2009) and Song and Yoo (2011) have reported the ability of MG-132 to induce phosphorylation of TrkA in PC12 cells and that it could potentiate the effect of NGF in this cell line. In order to find a possible link between the activation of Src and ERK1/2 in our system we decided to test the involvement of the high affinity NGF receptor in these signaling events. Using an antibody that specifically recognizes active TrkA phosphorylated on tyrosine 490, we too could detect the activation of the receptor in PC12 cells by means of Western blotting (Fig. 7, panel A left three lanes and graph). Subsequent reprobing of the membrane for TrkA verified equal loading of the lanes (Fig. 7, panel B, left three lanes). MG-132-induced activation of TrkA is one feasible point of origin of the signal that, subsequently, through Ras activates MEK and ERK1/2.

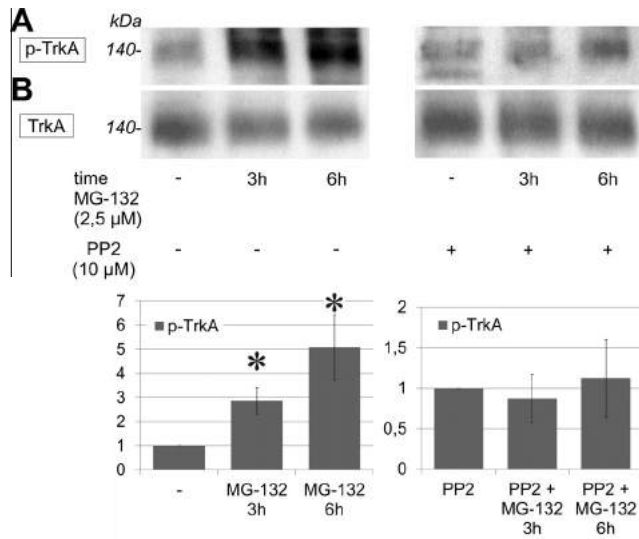


Fig. 7. The effect of MG-132 on TrkA phosphorylation without and with the inhibition of Src using PP2. Panel A: PC12 cultures were treated with MG-132 (2.5 μM) for the indicated time periods. PP2, where applicable, was added to the cultures 30 min before the start of MG-132 treatments. The membrane was probed for the presence of TrkA phosphorylated on tyrosine 490. Panel B: Subsequently the blot was stripped and reprobed for total TrkA as loading control. The graph demonstrates relative intensities of phospho-TrkA compared to the untreated control and normalized against the loading control. The values shown are mean ± S.D. of three independent experiments. * = significantly different from the untreated control. (P-values of pairwise lane comparisons numbered left-to-right for p-TrkA are: $P_{1-2} = 0.0199$; $P_{1-3} = 0.0281$).

3.8. The effect of Src-inhibition on MG-132-induced phosphorylation of TrkA

Upon inhibition of Src with PP2 starting 30 min before MG-132 treatments the proteasome inhibitor could no longer increase the phosphorylation of TrkA above baseline (Fig. 7, panel A, right three lanes and graph). Reprobing of the membrane for total TrkA verified equal loading across the lanes (Fig. 7, panel B, right three lanes). The fact that without Src inhibition TrkA phosphorylation could be induced in MG-132-treated PC12 cells, but upon chemical inhibition of Src it failed is supportive of that Src activity is necessary for successful phosphorylation of TrkA elicited by the proteasome inhibitor. Shi et al. (2010) have also reported Src-dependent TrkA transactivation during PACAP-mediated neuronal differentiation of PC6 and PC12 cells. Currently we can not tell the exact relationship between Src and TrkA during their activation elicited by MG-132. Nevertheless, TrkA being a transmembrane receptor and Src's known ability to associate with membrane structures, like focal contacts, brings both tyrosine kinases into a spatial relationship that might be in favor of their interaction, at least from the physical perspective.

3.9. Activation of Src in TrkA-inhibited PC12 cells

To further evaluate the relationship of TrkA and Src during their activation by MG-132 we treated PC12 cells with the indolocarbazole inhibitor compound K252a (Berg et al., 1992; Tapley et al., 1992) that acts as a competitive inhibitor of TrkA trans-/autophosphorylation with respect to ATP (Angeles et al., 1998). While incubation of the cells with this compound starting 30 min before MG-132 treatments blocked MG-132-induced phosphorylation of TrkA (Fig. 8, panel C) it could not prevent Src phosphorylation elicited by the proteasome inhibitor (Fig. 8, panel A). ERK1/2 activation could also be measured, although its intensity was weaker (Fig. 8, panel E and graphs) than without inhibitors, being comparable to that measured earlier in the presence of PP2, the compound

blocking Src (see Fig. 6). Reprobing of the membranes for actin, TrkA and ERK1/2 verified equal loading of the lanes. These data, collectively, suggest that Src is positioned upstream of TrkA during the MG-132-induced activation of the ERK cascade in PC12 cells. They are also supportive of the existence of ERK activating mechanisms that are independent of pathways originating from TrkA and are mediated by other signaling component(s) stimulated by MG-132 upstream of Ras and MEK.

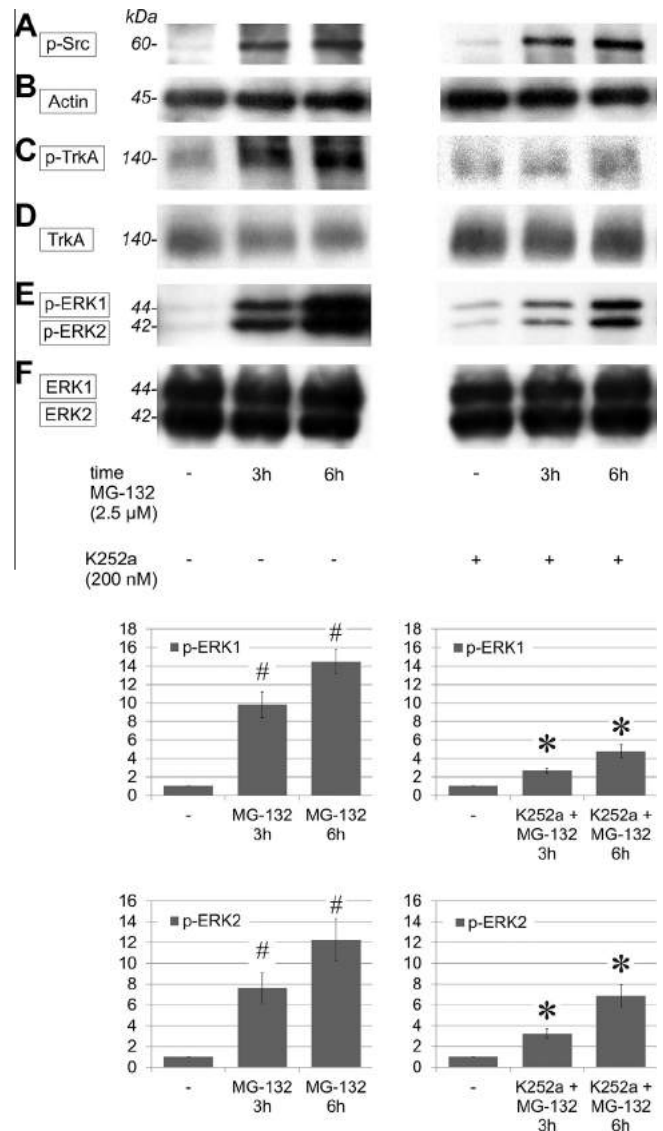


Fig. 8. The effect of MG-132 on Src, TrkA and ERK1/2 phosphorylation without, and with inhibition of TrkA, using K252a. PC12 cultures were treated with MG-132 (2.5 μM) for the indicated time periods. K252a (200 nM), where applied, was added to the cultures 30 min before the start of MG-132 treatments. The membrane was probed for the presence of TrkA phosphorylated on tyrosine 490 (Panel C). Subsequently the blot was stripped and reprobed for total TrkA as loading control (Panel D). Phospho-TrkA signal intensities of K252a- and MG-132-treated samples compared to the control treated with K252a alone and normalized against the TrkA loading control showed no significant differences (graph not shown). Phosphorylation of Src and that of ERK1/2 is demonstrated by panels A and E, respectively. The left and right graphs represent relative intensities of phospho-ERK1/2 compared to controls left untreated or treated with K252a alone, respectively, and normalized against total ERK1/2 (panel F). The values are mean ± S.D. of three independent experiments. Left two graphs: # = significantly different from the untreated control. (P-values of pairwise lane comparisons numbered left-to-right for p-ERK1 are: $P_{1-2} = 0.0031$; $P_{1-3} = 0.008$ and for p-ERK2 are: $P_{1-2} = 0.0078$; $P_{1-3} = 0.0047$) Right two graphs: * = significantly different from the control treated with K252a alone. (P-values of pairwise lane comparisons numbered left-to-right for p-ERK1 are: $P_{1-2} = 0.0028$; $P_{1-3} = 0.0049$ and for p-ERK2 are: $P_{1-2} = 0.0062$; $P_{1-3} = 0.005$).

Our Western blot data suggest a model of signal transduction according to which, in line with the findings of Song et al. (2009) and Song and Yoo (2011) inhibition of the proteasome elicits the activating phosphorylation of the high affinity NGF-receptor TrkA followed by Ras- and MEK-dependent sustained activation of ERK1/2. A precondition of it is the stabilization of active Src since increased phosphorylation of TrkA failed and that of ERK1/2 has also become weaker and more transient after chemical inhibition of Src.

3.10. The intracellular localization of phosphorylated Src and phosphorylated ERK1/2

In cells of untreated cultures (Fig. 9, panel A) or in the presence of PP2 (not shown) the phosphorylated Src signal was barely

detectable in the cytoplasm of single cells. Following maximal stimulation with the proteasome inhibitor alone, between 30 min and 9 h the signal intensity increased but remained predominantly cytoplasmic (Fig. 9, panel B).

Without treatment the weak phospho-ERK1/2 signal was mostly cytoplasmic (Fig. 9, panel C). Upon treatment with MG-132 the signal intensity increased, and reaching its maximum at 6 h was both cytoplasmic and nuclear (Fig. 9, panel D). NGF-induced sustained ERK1/2 activation is accompanied by nuclear translocation of the enzyme (Boglári et al., 1998; Marshall, 1995; Traverse et al., 1992). Activated ERK1/2 can phosphorylate transcription factors in the nucleus, this way adjusting the pattern of gene transcription in favor of neuronal differentiation. Prolonged activation of ERK1/2 elicited by the proteasome inhibitor MG-132

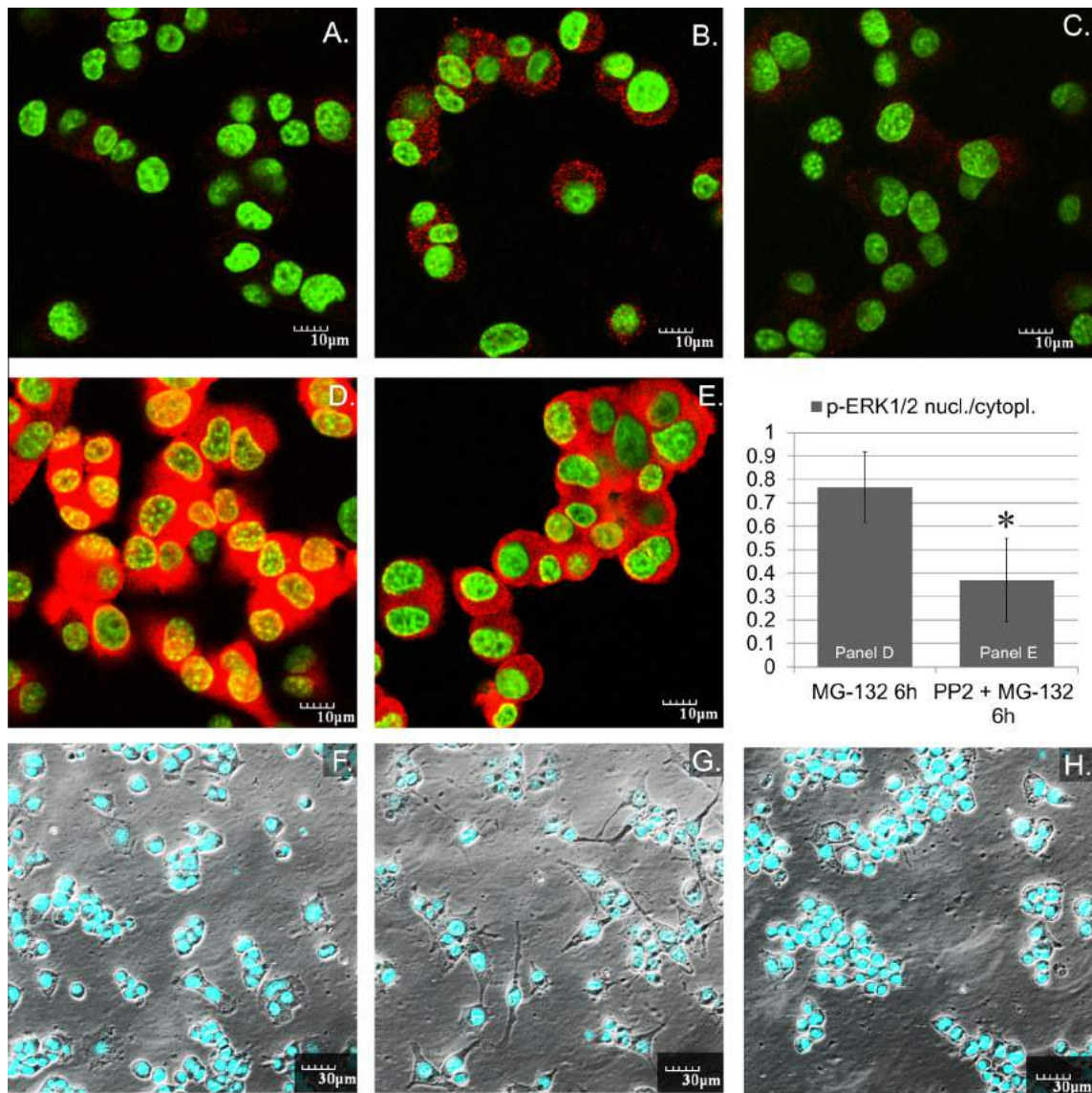


Fig. 9. Confocal fluorescence laser scanning and phase contrast microscopy. A and B: The intracellular distribution of phosphorylated Src is predominantly cytoplasmic. Phosphorylated Src (red) in untreated PC12 cells (Panel A) and following stimulation of the enzyme with 2.5 μM MG-132 for 60 min (Panel B). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (green). C–E: The intracellular distribution of phosphorylated ERK1/2. Weak ERK1/2 phosphorylation (red) in the cytoplasm of untreated PC12 cells (Panel C) and its increase with nuclear translocation following maximal stimulation of the enzyme with 2.5 μM MG-132 for 6 h without (Panel D) or after the inhibition of Src with 10 μM PP2. The latter resulted in weaker overall signal intensity and marked reduction of nuclear translocation of the activated enzymes (Panel E). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (green). Colocalization of the green and red signals as a result of nuclear enzyme translocation appears in yellow. The graph inset compares nuclear to cytoplasmic phospho-ERK1/2 (red signal) intensities of panels D and E. * = significantly different from treated with MG-132 alone. F–H: Differentiation morphology. PC12 cells without treatment (Panel F) or following their exposure to MG-132 (2.5 μM) for 24 h (Panel G). The inhibition of Src with 10 μM PP2 did not alter the morphology of the cells (not shown) when compared to the untreated control but blocked the differentiative effect of MG-132 (Panel H). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue).

was followed by nuclear translocation of the enzyme in our cultures as well, as detected by laser scanning confocal microscopy.

Inhibition of Src family kinases can weaken the activation of ERK and decrease NGF-induced neurite outgrowth (Dey et al., 2005). The inhibition of Src alone with PP2 had no effect on the intracellular distribution (not shown) and level of the phospho-ERK1/2 signal in PC12 cultures but weakened the achievable signal intensities induced by MG-132 treatments (Fig. 6, panel A and graphs). The phospho-ERK1/2 immunoreactivity remained predominantly in the cytoplasm of the Src-inhibited cells even after MG-132 treatment for 6 h (Fig. 9, panel E and graphs). Similarly, the intracellular distribution of the residual phospho-ERK1/2 signal elicited by MG-132 in the presence of the TrkA inhibitor exhibited cytoplasmic dominance (not shown).

3.11. Phenotypical changes of MG-132-treated PC12 cells without and with inhibition of kinases or H-Ras

Without treatment PC12 cells showed a round or polygonal morphology (Fig. 9, panel F). In the presence of MG-132 they gradually developed projections that was maximal at around the end of the first day (Fig. 9, panel G) similar to that observed by Fentany et al. (1994) in Neuro 2A mouse neuroblastoma cells treated with lactacystin. Our MG-132-inhibited cells typically developed one or two longer neurites accompanied by few shorter processes. The low concentration of MG-132 used by us and others (Song et al., 2009) is not cytotoxic for the first 24 h of the treatments and its safety was further supported by the healthy appearance of cell bodies under phase contrast optics, and that of nuclei on fluorescence images (Fig. 9, panels F–H). MG-132 treatments longer than 24 h, however, led to the gradual deterioration of cellular morphology, most likely due to initiation of programmed cell death (Rideout et al., 2001; Borbála Stark, unpublished observations). This circumstance, unfortunately, excluded the possibility of longer differentiation periods in the presence of the proteasome inhibitor. Beyond its ERK activating, Src stabilizing and differentiation stimulating effect MG-132 can also initiate stress (e.g. through JNK and p38MAPK) pathways in PC12 cells (Giasson et al., 1999) and other cell types as described, for example, in prostate cancer cells (Yang et al., 2006). Proteolysis regulates the intracellular level of several short- and long-lived proteins, many of which are important regulators of cell proliferation, differentiation or apoptosis (Ciechanover, 1998; Lee and Goldberg, 1998). The activation of JNK- and p38MAPK-pathways (Sang et al., 2002) and mechanisms blocking inhibitor of kappa B ($\text{I}\kappa\text{B}$) degradation are frequently detected during induction of programmed cell death (McDade et al., 1999; Sasaki et al., 2005).

Inhibition of Src alone by PP2 had no effect on the cells' undifferentiated morphology (not shown). On the other hand, upon exposure of the cells to PP2, 30 min before the addition of MG-132, process formation induced by the proteasome inhibitor was no longer observable. In most cases the outgrowth of neurites was completely missing even at 24 h (Fig. 9, panel H).

A similar, differentiation-inhibiting effect could be seen in PC12 cells expressing a dominant inhibitory H-Ras mutant (M-M17-26) and in the presence of the TrkA or MEK-inhibitor, where MG-132 could no longer induce neuritogenesis (not shown).

The phosphorylation of ERK1/2 induced by various agents is well documented during differentiation of this cell type, where sustained activation of ERK1/2 is necessary for nuclear translocation of the enzyme and sympathetic neuronal-like morphological alteration of the cells (Boglári et al., 1998; Marshall, 1995; Traverser et al., 1992). Proteasome inhibitors like N-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal and lactacystin can also induce prolonged ERK phosphorylation and neurite extension in PC12 cells (Hashimoto et al., 2000). Using MG-132 we too could observe sustained ERK activation that

lasted for several hours and was accompanied by nuclear translocation of ERK1/2. Neuritogenesis elicited by proteasome inhibition is apparent within hours, whereas NGF requires days to have a similar effect (Greene and Tischler, 1976). The phenotypical changes of PC12 cells observed in the presence of the proteasome inhibitor could therefore correspond to early steps of neuronal differentiation. The transitory nature of the neuritogenic effects of proteasome inhibitors (Saito and Kawashima, 1989) suggests that proteasome inhibitors might have an effect as neurite "initiating" factors, while neurotrophins are responsible for the stabilization and long-term maintenance of the differentiated state.

Among their numerous targets proteasome inhibitors could regulate the turnover of proteins like Src. As supported by the study of Obin et al. (1999) the outgrowth of neurites can coincide with (at least partial) inhibition of ubiquitin-dependent proteolysis and neurite outgrowth induced in PC12 cells. In our experiments the chemical inhibition of Src blocked phosphorylation of TrkA and compromised the ability of the proteasome inhibitor MG-132 to induce prolonged ERK1/2 phosphorylation. The remaining ERK1/2 phosphorylation could not be accompanied by robust nuclear translocation of the enzyme and the formation of neurites also failed. Based on these observations we conclude and show for the first time that intact Src function is a necessary requirement of TrkA phosphorylation, followed by Ras- and MEK-dependent sustained ERK1/2 activation with nuclear translocation of the latter and neurite induction during MG-132-treatment of PC12 cells, as summarized schematically in Fig. 10 (shown by solid arrows).

In view of the plethora of proteins regulated by the proteasome ERK can most likely be activated via multiple different pathways in proteasome inhibitor-treated cells. After the chemical blockade of Src or TrkA with PP2 or K252a, respectively, the MG-132-induced activation of ERK1/2 was still possible with more transient kinetics and the nuclear translocation of the enzyme was also inhibited (dashed arrows via uncertain signaling component upstream of Ras in Fig. 10). Investigations to identify mechanism of ERK1/2

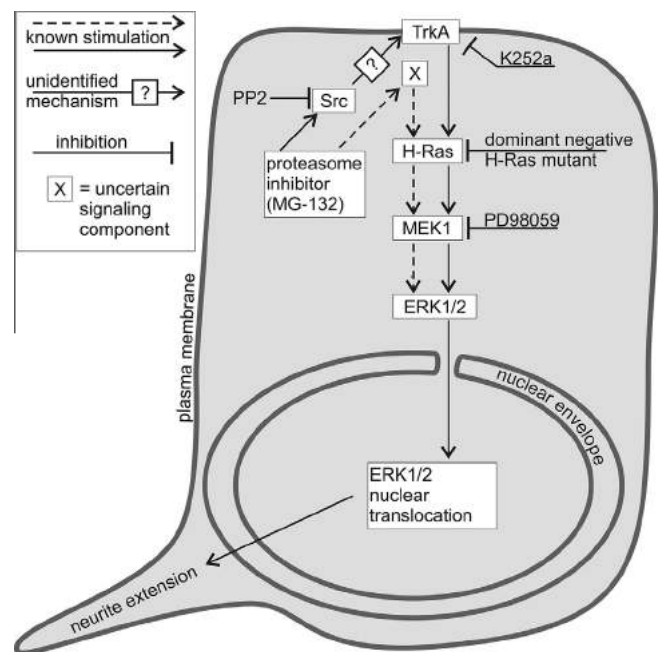


Fig. 10. Our proposed model of MG-132's ERK1/2-activating and neuritogenic effects. Activation of ERK1/2 by MG-132 is dependent on Ras (inhibited in the dominant negative H-Ras-expressing M-M17-26 variant of PC12 cells) and MEK (chemically blocked by the compound PD98059). Sustained ERK1/2 activation, nuclear translocation and neurite extension requires the intact function of Src (chemically inhibited by PP2) and is preceded by the phosphorylation of TrkA.

activation in Src- or TrkA-inhibited cells are currently underway in our laboratory. Nevertheless, neuronal differentiation was no longer detected under such conditions in PC12 cells, underlying the importance of intact Src function and that of the TrkA-Ras-MEK-ERK pathway in this context.

We believe that our experimental data contribute to the better understanding of how proteasome inhibitors, agents with great clinical potential act, and through that might help the development of therapeutics that are more selective and have fewer side effects.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Hungarian National Research Fund (OTKA T037528), from SROP-4.2.2/B-10/1-2010-0029 Supporting Scientific Training of Talented Youth at the University of Pécs, and from the University of Pécs (PTE ÁOK-KA-2013/24). The purchase of the Olympus FV-1000 laser scanning confocal system was supported by grant GVOP-3.2.1-2004-04-0172/3.0 to the University of Pécs. The funding sources had no involvement in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

Special thanks to Mrs. Mónika Vecsernyés and Miss Anikó Kiss for their excellent technical assistance throughout the experiments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2013.07.008>.

References

- Alemà, S., Casalbone, P., Agostini, E., Tatò, F., 1985. Differentiation of PC12 pheochromocytoma cells induced by v-src oncogene. *Nature* 14, 557–559.
- Angeles, T.S., Yang, S.X., Steffler, C., Dionne, C.A., 1998. Kinetics of trkA tyrosine kinase activity and inhibition by K-252a. *Arch. Biochem. Biophys.* 349, 267–274.
- Berg, M.M., Sternberg, D.W., Parada, L.F., Chao, M.V., 1992. K-252a inhibits nerve growth factor-induced trk proto-oncogene tyrosine phosphorylation and kinase activity. *J. Biol. Chem.* 267, 13–16.
- Boglári, G., Erhardt, P., Cooper, G.M., Szeberényi, J., 1998. Intact Ras function is required for sustained activation and nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinases in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *Eur. J. Cell Biol.* 75, 54–58.
- Chao, M.V., Hempstead, B.L., 1995. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci.* 18, 321–326.
- Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17, 7151–7160.
- Dey, N., Howell, B.W., De, P.K., Durden, D.L., 2005. CSK negatively regulates nerve growth factor induced neural differentiation and augments AKT kinase activity. *Exp. Cell Res.* 307, 1–14.
- Doherty, F.J., Dawson, S., Mayer, R.J., 2002. The ubiquitin-proteasome pathway of intracellular proteolysis. *Essays Biochem.* 38, 51–63.
- Esposito, D., Patel, P., Stephens, R.M., Perez, P., Chao, M.V., Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., 2001. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 276, 32687–32695.
- Fenteany, G., Standaert, R.F., Reichard, G.A., Corey, E.J., Schreiber, S.L., 1994. A beta-lactone related to lactacystin induces neurite outgrowth in a neuroblastoma cell line and inhibits cell cycle progression in an osteosarcoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3358–3362.
- Giasson, B.I., Bruening, W., Durham, H.D., Mushynski, W.E., 1999. Activation of stress-activated protein kinases correlates with neurite outgrowth induced by protease inhibition in PC12 cells. *J. Neurochem.* 72, 1081–1087.
- Greene, L.A., 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.
- Hakak, Y., Martin, G.S., 1999. Ubiquitin-dependent degradation of active Src. *Curr. Biol.* 9, 1039–1042.
- Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, P.S., Brissette, W.H., Weringer, E.J., Pollok, B.A., Connelly, P.A., 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J. Biol. Chem.* 271, 695–701.
- Hashimoto, K., Guroff, G., Katagiri, Y., 2000. Delayed and sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase induced by proteasome inhibitors through p21(ras) in PC12 cells. *J. Neurochem.* 74, 92–98.
- Hattori, K., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Nakayama, K., 1999. Molecular dissection of the interactions among I κ B α , FWD1, and Skp1 required for ubiquitin-mediated proteolysis of I κ B α . *J. Biol. Chem.* 274, 29641–29647.
- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479.
- Inoue, M., Zhai, H., Sakazaki, H., Furuyama, H., Fukuyama, Y., Hiramata, M., 2004. TMC-95A, a reversible proteasome inhibitor, induces neurite outgrowth in PC12 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 663–665.
- Lee, D.H., Goldberg, A.L., 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* 8, 397–403.
- Liu, Y., Bishop, A., Witucki, L., Kraybill, B., Shimizu, E., Tsien, J., Ubersax, J., Blethrow, J., Morgan, D.O., Shokat, K.M., 1999. Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chem. Biol.* 6, 671–678.
- Marshall, C.J., 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179–185.
- Maruyama, T., Yamamoto, Y., Shimizu, A., Masuda, H., Sakai, N., Sakurai, R., Asada, H., Yoshimura, Y., 2004. Pyrazolo pyrimidine-type inhibitors of SRC family tyrosine kinases promote ovarian steroid-induced differentiation of human endometrial stromal cells in vitro. *Biol. Reprod.* 70, 214–221.
- MacLinnis, B.L., Campenot, R.B., 2005. Regulation of Wallerian degeneration and nerve growth factor withdrawal-induced pruning of axons of sympathetic neurons by the proteasome and the MEK/Erk pathway. *Mol. Cell. Neurosci.* 28, 430–439.
- McDade, T.P., Perugini, R.A., Vittimberga Jr., F.J., Callery, M.P., 1999. Ubiquitin-proteasome inhibition enhances apoptosis of human pancreatic cancer cells. *Surgery* 126, 371–377.
- Momose, I., Sekizawa, R., Iinuma, H., Takeuchi, T., 2002. Inhibition of proteasome activity by tyropeptin A in PC12 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2256–2258.
- Nagao, M., Yamauchi, J., Kaziro, Y., Itoh, H., 1998. Involvement of protein kinase C and Src family tyrosine kinase in Galphaq/11-induced activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 22892–22898.
- Nethrapalli, I.S., Singh, M., Guan, X., Guo, Q., Lubahn, D.B., Korach, K.S., Toran-Allerand, C.D., 2001. Estradiol (E2) elicits SRC phosphorylation in the mouse neocortex: the initial event in E2 activation of the MAPK cascade? *Endocrinology* 142, 5145–5148.
- Obin, M., Mesco, E., Gong, X., Haas, A.L., Joseph, J., Taylor, A., 1999. Neurite outgrowth in PC12 cells. Distinguishing the roles of ubiquitylation and ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 274, 11789–11795.
- Pasquini, L.A., Paez, P.M., Moreno, M.A., Pasquini, J.M., Soto, E.F., 2003. Inhibition of the proteasome by lactacystin enhances oligodendroglial cell differentiation. *J. Neurosci.* 23, 4635–4644.
- Pickart, C.M., 2001. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol. Cell* 8, 499–504.
- Rausch, D.M., Dickens, G., Doll, S., Fujita, K., Koizumi, S., Rudkin, B.B., Tocco, M., Eiden, L.E., Guroff, G., 1989. Differentiation of PC12 cells with v-src: comparison with nerve growth factor. *J. Neurosci. Res.* 24, 49–58.
- Rideout, H.J., Larsen, K.E., Sulzer, D., Stefanis, L., 2001. Proteasomal inhibition leads to formation of ubiquitin/alpha-synuclein-immunoreactive inclusions in PC12 cells. *J. Neurochem.* 78, 899–908.
- Rubinsztein, D.C., 2006. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443, 780–786.
- Saito, Y., Kawashima, S., 1989. The neurite-initiating effect of a tripeptide aldehyde protease inhibitor on PC12 cells. *J. Biochem.* 106, 1035–1040.
- Saito, Y., Tsubuki, S., Ito, H., Kawashima, S., 1990. Possible involvement of a novel protease in neurite outgrowth of PC12 cells. *Neurosci. Res. Suppl.* 13, S97–S101.
- Sang, C., Kobayashi, Y., Du, J., Katsumo, M., Adachi, H., Doyu, M., Sobue, G., 2002. C-Jun N-terminal kinase pathway mediates Lactacystin-induced cell death in a neuronal differentiated Neuro2a cell line. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 108, 7–17.
- Sasaki, C.Y., Barberi, T.J., Ghosh, P., Longo, D.L., 2005. Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I κ B α -independent NF- κ B pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 34538–34547.
- Segal, R.A., Greenberg, M.E., 1996. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 463–489.
- Shi, G.X., Jin, L., Andres, D.A., 2010. Src-dependent TrkA transactivation is required for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38-mediated Rit activation and neuronal differentiation. *Mol. Biol. Cell* 21, 1597–1608.
- Smart, J.E., Oppermann, H., Czernilofsky, A.P., Purchio, A.F., Erikson, R.L., Bishop, J.M., 1981. Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp 60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6013–6017.
- Sobue, K., Kanda, K., 1988. Localization of pp 60c-src in growth cone of PC12 cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 1383–1389.

- Song, E.J., Hong, H.M., Yoo, Y.S., 2009. Proteasome inhibition induces neurite outgrowth through posttranslational modification of TrkA receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 539–545.
- Song, E.J., Yoo, Y.S., 2011. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth is potentiated by stabilization of TrkA receptors. *B.M.B. Rep.* 44, 182–186.
- Szeberényi, J., 1991. NGF-induced neurite regeneration is mediated by a ras-independent pathway in PC12 cells. *Acta Biol. Hung.* 42, 365–369.
- Szeberényi, J., Erhardt, P., 1994. Cellular components of nerve growth factor signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1222, 187–202.
- Tapley, P., Lamballe, F., Barbacid, M., 1992. K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7, 371–381.
- Thomas, S.M., Hayes, M., D'Arcangelo, G., Armstrong, R.C., Meyer, B.E., Zilberstein, A., Brugge, J.S., Halegoua, S., 1991. Induction of neurite outgrowth by v-src mimics critical aspects of nerve growth factor-induced differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4739–4750.
- Traverse, S., Gomez, N., Paterson, H., Marshall, C., Cohen, P., 1992. Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem. J.* 288, 351–355 (Pt 2).
- Vaudry, D., Stork, P.J., Lazarovici, P., Eiden, L.E., 2002. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* 296, 1648–1649.
- Verma, R., Oania, R., Graumann, J., Deshaies, R.J., 2004. Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* 118, 99–110.
- Yang, W., Monroe, J., Zhang, Y., George, D., Bremer, E., Li, H., 2006. Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells. *Cancer Lett.* 243, 217–227.
- Young, S.W., Dickens, M., Tavare, J.M., 1994. Differentiation of PC12 cells in response to a cAMP analogue is accompanied by sustained activation of mitogen-activated protein kinase. Comparison with the effects of insulin, growth factors and phorbol esters. *FEBS Lett.* 338, 212–216.



OPEN

Prolonged treatment with the proteasome inhibitor MG-132 induces apoptosis in PC12 rat pheochromocytoma cells

Oktávia Tarjányi^{1,2}, Julian Haerer¹, Mónika Vecsernyés^{1,2}, Gergely Berta^{1,2}, Alexandra Stayer-Harci^{1,2}, Bálint Balogh¹, Kornélia Farkas³, Ferenc Boldizsár⁴, József Szeberényi^{1,2} & György Sétáló Jr.^{1,2}✉

Rat pheochromocytoma (PC12) cells were treated with the proteasome inhibitor MG-132 and morphological changes were recorded. Initially, neuronal differentiation was induced but after 24 h signs of morphological deterioration became apparent. We performed nuclear staining, flow cytometry and WST-1 assay then analyzed signal transduction pathways involving Akt, p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), JNK (c-Jun N-terminal Kinase), c-Jun and caspase-3. Stress signaling via p38, JNK and c-Jun was active even after 24 h of MG-132 treatment, while the survival-mediating Akt phosphorylation declined and the executor of apoptosis (caspase-3) was activated by that time and apoptosis was also observable. We examined subcellular localization of stress signaling components, applied kinase inhibitors and dominant negative H-Ras mutant-expressing PC12 cells in order to decipher connections of stress-mediating pathways. Our results are suggestive of that treatment with the proteasome inhibitor MG-132 has a biphasic nature in PC12 cells. Initially, it induces neuronal differentiation but prolonged treatments lead to apoptosis.

Abbreviations

Akt	A protein kinase, also known as Protein Kinase B (PKB)
ASK1	Apoptosis Signal-regulated Kinase 1, it is a MAPKKK that can activate the JNK pathway
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, an antiapoptotic protein
Bax	Bcl-2-associated X, a proapoptotic protein
Bid	BH3 interacting domain death agonist, a proapoptotic protein
Bik	Bcl-2 interacting killer, a proapoptotic protein
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death, a proapoptotic protein
BIPN	Bortezomib-induced peripheral neuropathy
c-Jun	A transcription factor, a substrate of JNK
Cy3	A fluorophore cyanine dye
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ER	Endoplasmic reticulum
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2
E3	A ubiquitin ligase enzyme
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FITC	Fluorescein isothiocyanate

¹Department of Medical Biology and Central Electron Microscope Laboratory, University of Pécs, Medical School, Szigeti út 12., Pécs 7624, Hungary. ²Signal Transduction Research Group, János Szentágothai Research Centre, Ifjúság útja 20., Pécs 7624, Hungary. ³Institute of Bioanalysis, University of Pécs, Medical School, Szigeti út 12., Pécs 7624, Hungary. ⁴Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Medical School, Szigeti út 12., Pécs 7624, Hungary. ✉email: gyorgy.setalo.jr@aok.pte.hu

FL1/FL2	Fluorescence channel 1/2
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HRP	Horseradish-peroxidase
Itch	A HECT domain-containing Nedd4-like ubiquitin protein ligase, it can be activated by JNK
JNK	C-Jun N-terminal kinase, also known as stress-activated protein kinase (SAPK)
LY294002	A highly selective inhibitor of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAPK kinase
MAPKKK	MAPKK kinase
MEK	Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase, it is a MAPKK
MG-132	A peptidyl-aldehyde type proteasome inhibitor
MKK4	MAPK kinase 4, it can activate JNK and/or p38 MAPK
MKK4/7	MAPK kinase 4/7
MLK3	Mixed lineage kinase 3, it is a MAPKKK, it can activate the JNK and/or p38 MAPK pathway(s)
M-M17-26	Dominant negative H-Ras protein-expressing PC12 cell line
NFκB	Nuclear factor κ B
NGF	Nerve growth factor
NOXA	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, a proapoptotic protein
p38 MAPK	A MAP kinase with the molecular weight of 38 kDa
PBS	Phosphate buffered saline
PC12	Rat pheochromocytoma cell line
PI	Propidium-iodide
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PMSF	Phenyl methane sulfonyl fluoride
PVDF	Polyvinylidene difluoride
p53	A tumor suppressor protein with the molecular weight of 53 kDa
Ras	A monomeric G-protein, it can activate the ERK pathway
S	Centrifugal sedimentation constant, named after Svedberg
SAPK/JNK	Stress-activated protein kinase, also known as JNK
SB203580	An ATP-competitive p38 MAPK inhibitor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SP600125	An ATP-competitive pan-JNK inhibitor
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	0.1% Triton X-100 dissolved in TBS
TBS-Tween	0.2% Tween-20 dissolved in TBS
UPS	Ubiquitin-proteasome system
WST-1	A tetrazolium salt used to determine the ratio of living cells

Rat pheochromocytoma (PC12) cells are a popular model to study neuronal differentiation, survival and apoptosis. They are round-shaped and proliferate readily under normal culturing conditions. Upon exposure to nerve growth factor (NGF) they stop to divide, grow projections (neurites) and differentiate into a sympathetic neuron-like phenotype. Besides NGF other agents can also induce neuritogenesis in these cells, for example the proteasome inhibitor MG-132 within approximately 24 h¹. However, longer treatments with this compound do not cause further differentiation, on the contrary, the morphology of the cells quickly deteriorates. The signaling mechanisms behind the morphological alterations are not yet fully understood.

The ubiquitin-proteasome system (UPS) plays a critical role in the breakdown of unnecessary, misfolded or damaged proteins² and it regulates the activation or inactivation of various signaling molecules involved in cell cycle control, inflammation, apoptosis or differentiation³⁻⁵. Around 80% of intracellular proteins are degraded by this mechanism in a well-regulated manner. Poly-ubiquitinated proteins are recognized and broken down by a cylindrical multicatalytic proteinase complex called the 26S proteasome. It consists of a 20S catalytic core and two 19S regulatory caps. The 20S catalytic core is organized into two α and two β rings. Three subunits of the β-rings (β1, β2, β5) are responsible for the proteolytic activities of the proteasome⁶. The dysfunction of the UPS is involved in numerous pathological conditions such as inflammation⁷, tumors⁸ or neurological diseases⁹.

Several inhibitors have been developed to block the function of the proteasome either in a reversible- or irreversible fashion¹⁰. Some of these compounds have already been approved for the treatment of hematological malignancies and their field of indication is likely to broaden further. At the same time, in case of some proteasome inhibitors, peripheral neuropathy was reported as a therapeutic side effect¹¹, although the exact mechanism of it is still not understood.

In our previous work¹ we treated PC12 cells with 2.5 μM MG-132 for various time periods and examined the morphological and intracellular signaling events induced. Initially, we could see neuronal differentiation (neuritogenesis) but after 24 h of MG-132 treatment substantial morphological changes occurred to the cells fairly rapidly: the neurites shrank, the cells were getting again rounder, their adherence to the culture dish became weaker and an increasing number of cells tended to float in groups in the culturing medium. In the present study we focused our attention onto the process of possible cellular stress and apoptosis in PC12 cells as a result of MG-132 treatments longer than 24 h (prolonged treatment).

Here we report that prolonged exposure of PC12 cells to the proteasome inhibitor MG-132 causes cell death by apoptosis. At the molecular level—besides the previously reported differentiative signaling events¹—we identified a slow but sustained phosphorylation of the signaling components Akt, p38 MAPK (Mitogen-Activated

Protein Kinase), JNK (c-Jun N-terminal Kinase) and c-Jun. After 24 h of treatment the survival signals declined, while stress signaling via p38 and JNK was still highly active. Additionally, caspase-3 cleavage is also detectable upon 24 h of MG-132 treatment of the cells. The observed shift towards stress signaling and the consequential caspase-3 activation is likely to contribute to the programmed death of PC12 cells induced by prolonged proteasome inhibitor treatment.

Materials and methods

Reagents. All fine chemicals were purchased from Sigma (Saint Louis, MO, USA) unless indicated otherwise. MG-132 (Merck, Kenilworth, NJ, USA Cat. # 474790) used at a final concentration of 2.5 μ M is a potent and selective, cell permeable, peptidyl-aldehyde type proteasome inhibitor that blocks the enzymatic activity of the proteasome reversibly. Hoechst 33342 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) is a fluorescent DNA-dye used to visualize the nuclei of cells. AnnexinV-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA Cat. # 556419) and propidium-iodide (PI) are used to identify apoptotic cells. WST-1 (Roche, Mannheim, Germany, Cat. # 11 644 807 001) is a tetrazolium salt used for the determination of the ratio of living cells in samples based on the activity of mitochondrial dehydrogenases which convert WST-1 to formazan. LY294002 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, Cat. # 9901) used at a concentration of 20 μ M is a highly selective inhibitor of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K). It blocks the PI3K-dependent phosphorylation and kinase activity of Akt. SB203580 (Cat. # S8307) used at 10 μ M concentration is a selective p38 MAPK inhibitor that blocks the catalytic activity of p38 by interfering with the ATP binding pocket of the enzyme. SP600125 (Cat. # S5567) used at 50 μ M concentration is a potent and selective ATP-competitive inhibitor of JNK-1, -2 and -3. The Western blot lysis buffer contained 50 mM Tris base (pH 7.4), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EGTA, 1 mM Na-orthovanadate, 5 mM ZnCl₂, 100 mM NaF, 10 mg/ml aprotinin, 1 mg/ml leupeptin, 1 mM PMSF and 1% Triton X-100. The Western blot sample buffer contained 7 ml 4 \times Tris-HCl/SDS (pH: 6.8), 3.8 g (~3 ml) glycerol, 1 g SDS, 0.93 g dithiothreitol (DTT), 1.2 mg bromophenol blue dissolved in 10 ml distilled water (dH₂O). TBS-Tween for Western blotting contained: 10 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20, pH 8.0. The Western blot stripping buffer contained 0.2 M glycine-HCl (pH 2.5), 0.05% Tween 20 dissolved in 1 L dH₂O. The 4 \times -concentrated Tris-HCl/SDS solution (pH: 6.8) contained 6.05 g Tris base, 0.4 g SDS dissolved in 100 ml dH₂O. For immunofluorescence the TBS buffer contained 50 ml 10 \times Tris HCl, 15 ml 5 M NaCl dissolved in 435 ml dH₂O. The TBS-T buffer contained 0.1% Triton X-100 dissolved in TBS. The PBS buffer (pH 7.4) contained 1.37 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.43 mM Na₂HPO₄ 7H₂O, 0.14 mM KH₂PO₄. For fixation, 4% paraformaldehyde was dissolved in PBS (pH 7.4). AnnexinV-FITC and PI staining was performed in Annexin-binding buffer containing 0.01 M HEPES (pH 7.4), 0.14 M NaCl and 2.5 mM CaCl₂. The proteasome activity was measured by the 20S Proteasome Activity Assay Kit (Merck, Darmstadt, Germany, Cat. # APT280). Lysis buffer for the Proteasome Activity Assay Kit contained 50 mM HEPES (pH 7.5), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl and 1% Triton X-100.

Cells. Wild type PC12 and M-M17-26 (dominant negative H-Ras protein-expressing)¹² rat pheochromocytoma cells were cultured in DMEM containing 5% fetal calf serum and 10% heat-inactivated horse serum (GIBCO, Paisley, Scotland). Both cell lines were kindly provided by G.M. Cooper (Department of Biology, Boston University, MA).

Proteasome inhibitor and kinase inhibitor treatments, measurement of proteasome activity. 10⁶ cells were seeded onto Petri dishes or plastic cover slips. Treatments were started when the cells adhered to the surface and presented healthy phenotype 1 day after plating. First, cells were starved in 0.5% horse serum-containing medium for 24 h to reduce mitogenic signals. Treatments of various lengths (5-, 15-, 30 min, 1-, 3-, 6-, 24-, 28-, 30- and 48 h) with the proteasome inhibitor (MG-132) at 2.5 μ M concentration were started so that all cultures could be terminated simultaneously. To check the effectivity and kinetics of MG-132 treatments, we measured the proteasome activity in PC12 cells (Supplementary Fig. 1). 20 μ l from the cell lysates of 5 \times 10⁶ cells were used from each sample. The assay was carried out according to the manufacturer's instructions. Lactacystin was used as positive control, representing maximal proteasome inhibition. The fluorescent end product was measured by a BMG Labtech CLARIOstar Plus microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany) at 380/460 nm. Kinase inhibitors (LY294002, SB203580, SP600125) were added to the cultures 1 h prior to the proteasome inhibitor so that both compounds were present during the 3-h-long MG-132 treatment.

Antibodies. The following primary antibodies (all from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) were used: Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP rabbit mAb (Cat. # 4060): 1:1000 (Western blot), Akt (Cat. # 9272) at 1:1000 (Western blot), Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (Cat. # 9211) at 1:1000 (Western blot) or 1:200 (immunofluorescence), p38 MAPK (Cat. # 9212) at 1:1000 (Western blot), Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (Cat. # 9251) at 1:1000 (Western blot) or 1:200 (immunofluorescence), SAPK/JNK (Cat. # 9252) at 1:1000 (Western blot), Phospho-c-Jun (Ser73) (Cat. # 9164) at 1:1000 (Western blot) or 1:200 (immunofluorescence), c-Jun (60A8) Rabbit mAb (Cat. # 9165) at 1:1000 (Western blot), Cleaved Caspase-3 (Asp175) (Cat. # 9661) at 1:1000 (Western blot), GAPDH (D16H11) XP Rabbit mAb (Cat. # 5174) at 1:5000 (Western blot). HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA, Cat# 31460) was used at 1:10 000 for Western blots and Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA Cat# 111-165-144) at 1:600 for immunofluorescence as secondary antibodies.

Phase contrast microscopy. Phenotypic changes of PC12 cells, cultured under the indicated conditions, were analyzed using an Olympus FluoView-1000 laser scanning confocal fluorescence microscope in combined phase contrast mode.

Figure 1. Prolonged MG-132 treatment induces apoptosis in PC12 cells. **(A)** Representative phase contrast images show PC12 cells after 0 (**Aa**), 6 (**Ab**), 24 (**Ac**), 28 (**Ad**) and 30 (**Ae**) hours of MG-132 (2.5 μM) treatment. The scalebar (200 μm) in panel (e) applies to all phase contrast images (a–e) **(B)** Representative laser scanning confocal fluorescence microscopic images of PC12 cells' nuclei in response to 0 (**Ba**), 24 (**Bb**), 28 (**Bc**), and 30 (**Bd**) hours of MG-132 (2.5 μM) treatment. Nuclei were stained with the fluorescent DNA-binding dye, Hoechst 33342. Chromatin condensation and fragmentation were considered as apoptotic morphological changes. The scalebar in panel (a) (20 μm) applies to all images (a–d) with fluorescent nuclei. Note, at 48 h most of the cells floated off from the slides making it impossible technically to take informative images. **(C)** Quantitative analysis of apoptotic cells detected with Hoechst 33342 staining (see micrographs under **B**) at different time points of the experiment. The percentage of apoptotic cells was determined as the ratio of cells with abnormal- versus normal chromatin structure. Column diagram shows the mean \pm SD values calculated from the data of three independent experiments. Statistically significant differences are indicated ($*P \leq 0.05$). **(D)** Flow cytometric analysis of MG-132 treatment-induced apoptosis in PC12 cells. Cells were stained with Annexin V-FITC/PI after 0 (**Da**), 24 (**Db**), 30 (**Dc**) and 48 (**Dd**) hours of MG-132 (2.5 μM) treatment. Annexin V⁺ Propidium-iodide (PI)⁺ double positive cells (upper right quadrant in the representative dot-plots) were considered late apoptotic (non-viable). Percentages of dead cells are indicated in the upper right corner of each sample. **(E)** Bar diagram showing the mean ratio \pm SD values calculated from the flow cytometric analysis (see **D**) of three independent experiments. Statistically significant differences are indicated ($*P \leq 0.05$). **(F)** Cell viability measured using WST-1 assay. At the end of the experiment the amount of formazan dye in the samples correlates with the number of living cells in the cultures. Bars show formazan optical density measured at 450 nm after various incubation periods with MG-132 (2.5 μM). Statistically significant differences are indicated ($^{\#}P \leq 0.05$).

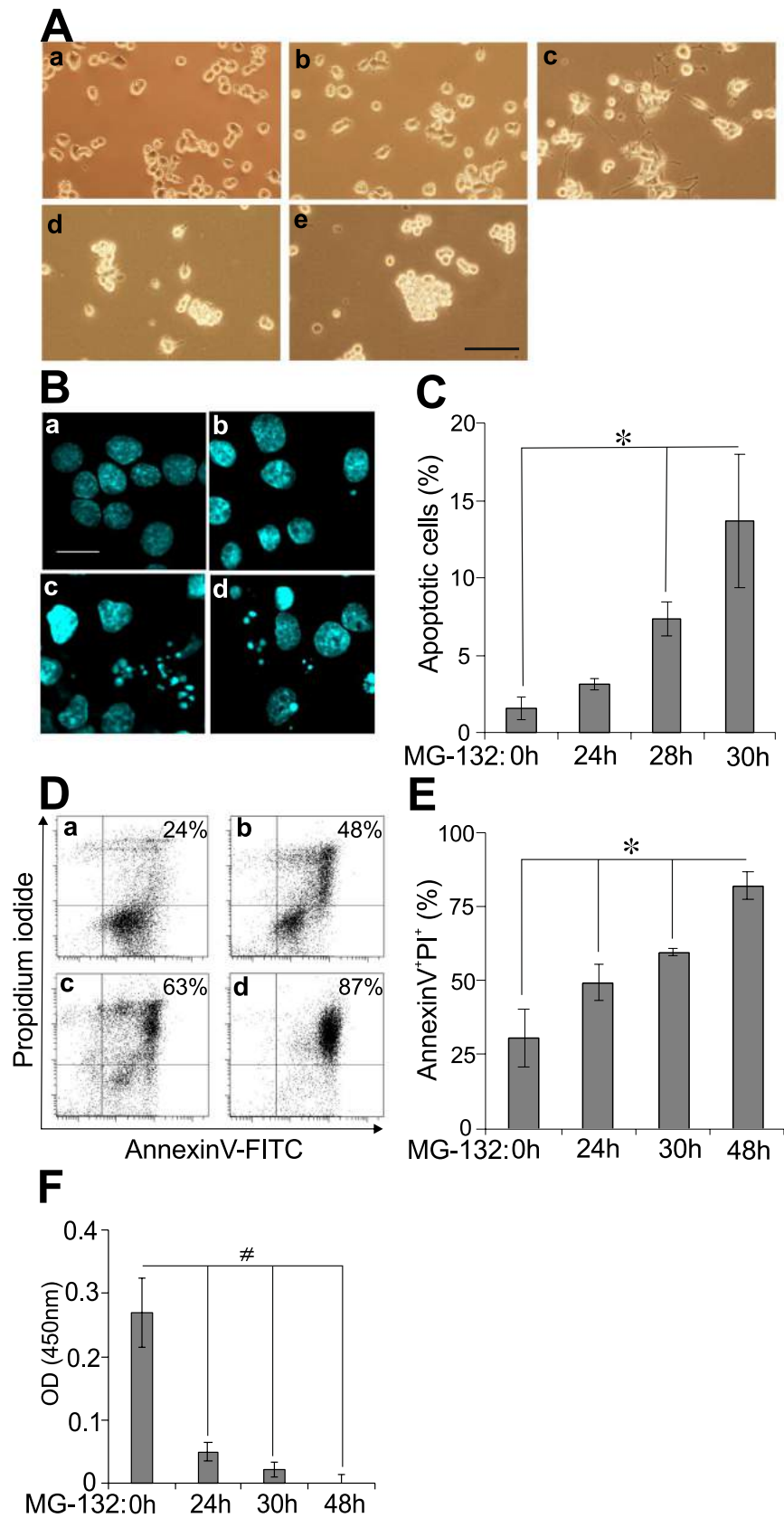
Nuclear staining. After fixation in 4% paraformaldehyde (see Reagents above) and permeabilization (in TBS-T) cells were incubated with Hoechst 33342 for 10 min at room temperature. Nuclear morphology was documented with an Olympus FluoView-1000 laser scanning confocal fluorescence microscope. Chromatin condensation and nuclear fragmentation were considered as signs of apoptosis. 100 cells were counted per sample and the percentage of apoptotic cells was calculated.

Flow cytometry. Adherent PC12 cells were collected using trypsin. After 2 washes with PBS Annexin V-FITC and PI staining was performed according to the manufacturer's instructions in order to distinguish apoptotic and living cells. Briefly, 10^5 cells were incubated with 5 μl Annexin V-FITC for 15 min in 100 μl Annexin-binding buffer. Then the samples were diluted with 400 μl Annexin-binding buffer and 1 μl PI was added to the samples immediately before the flow cytometric analysis. Samples were analyzed with a FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) flow cytometer using the Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) software. Annexin V⁻PI⁻, Annexin V⁺PI⁻ and Annexin V⁺PI⁺ cell populations were distinguished based on their FL1/FL2 fluorescence and annotated as living-, early apoptotic- and late apoptotic cells, respectively.

WST-1 cell viability assay. The WST-1 colorimetric assay for the quantification of cell viability was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, 2×10^4 cells after their MG-132 treatment were incubated further in the presence of WST-1 for 4 h at 37 °C. Living cells with their mitochondrial enzymes convert the tetrazolium salt into formazan, a colorful product. The amount of produced formazan correlates with the number of metabolically active/living cells in the cultures. The O.D. of samples were measured at 450 nm with a BMG Labtech Fluostar Optima microplate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany).

Western blot. For Western blots the cells were collected by scraping into the culturing media. After centrifugation for 5 min at 1000 rpm at 4 °C the medium was discarded and the pellet was lysed in 100 μl ice cold lysis buffer for 30 min. Samples were centrifuged at 13,500 rpm for 30 min at 4 °C to remove the insoluble cell fraction. The protein concentration of the supernatants was determined (Lowry's method, Detergent Compatible Protein Assay Kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and SDS-containing sample buffer was added to equal amounts of proteins then boiled for 5 min for denaturation. Samples were separated in SDS-containing 10% polyacrylamide gels, then transferred onto PVDF membranes with a BioRad Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System. Blotted membranes were blocked with 3% BSA or 5% milk (in case of Akt, cleaved caspase-3 and GAPDH) in TBS-Tween and incubated with the primary antibodies overnight at 4 °C in blocking solution, washed 3 times and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature in blocking solution again. Immune complexes were visualized using ECL reagent (Millipore Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate). Chemiluminescent signals were detected using the G:Box gel documentation system (Syngene, Cambridge, UK). To remove the bound antibodies, membranes were washed with hot stripping buffer for 2×20 min and were re-probed using the primary antibodies against the unphosphorylated forms of the signaling molecules or GAPDH to check for equal loading of the samples.

Immunofluorescence and confocal microscopy. Cells were cultured on plastic Thermanox cover slips (Nalgene Nunc International, Rochester, NY, USA). Treatments were stopped by rinsing in 37 °C PBS followed by fixation at room temperature for 1 h in 4% paraformaldehyde dissolved in PBS. Excess fixative was washed out $3 \times$ with PBS and $3 \times$ with TBS followed by 1 h permeabilization in TBS-T. The blocking of nonspecific binding sites was carried out by incubating the samples in 3% BSA dissolved in TBS-T. After incubation with the primary antibodies (overnight, at 4 °C) samples were washed $5 \times$ in TBS-T. Then the samples were incubated with the Cy3-conjugated secondary antibodies in dark for 1 h, at 4 °C. Five washes in TBS-T removed the unbound



antibodies. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342. Finally, preparations were covered with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Fluorescent signals were detected by laser scanning confocal microscopy using the Olympus FluoView-1000 system with a 40× phase objective.

Statistical analysis. To detect differences between the effects of treatments one-way ANOVA test was applied, to eliminate the type I error Bonferroni's post hoc tests were used in all cases. Data are represented as mean and standard deviation (SD). A p-value less than 0.05 was considered as significant. Statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics v 24.0 software package (IBM's Corporate, New York, USA).

Results

Apoptosis of PC12 cells treated with MG-132 for 24 h or longer. Previously we treated PC12 cells with the proteasome inhibitor MG-132 for various lengths of time up to one day and experienced neuronal differentiation¹. After 24 h, however, a decline in overall cell morphology was increasingly apparent. The observed phenomena inspired us to examine further what happens during prolonged proteasome inhibitor treatment of PC12 cells at the morphological level and regarding stress and apoptosis signaling. First, we monitored time-dependent changes of PC12 cells' morphology upon MG-132 treatment by means of phase contrast microscopy (Fig. 1A). Untreated PC12 cells are round-shaped (Fig. 1Aa). After 6 h of MG-132 treatment small projections were detectable as a sign of beginning neuritogenesis (Fig. 1Ab). At 24 h of treatment long neurites were visible (Fig. 1Ac), while after 24 h the signs of neuronal differentiation started to diminish (neurites became shorter) and the cells began to lose their adherence to the culturing plates. After 28 h in the presence of the proteasome inhibitor (Fig. 1Ad) the cells tended to float in groups in the culturing medium, which phenomenon became even more prominent after 30 h (Fig. 1Ae). Based on the observed morphological alterations we became intrigued in the possible mechanisms in their background.

We performed Hoechst 33342 staining and analyzed nuclear morphology of the cells using laser scanning confocal fluorescence microscopy (Fig. 1B). The nuclei of PC12 cells remained mostly intact up to 24 h of MG-132 treatment (Fig. 1Bb), however, chromatin condensation and nuclear fragmentation became more and more prominent after 28 or 30 h of treatment (Fig. 1Bc and Bd, respectively) when compared to the untreated control (Fig. 1Ba). We considered chromatin condensation and nuclear fragmentation as apoptotic morphological changes. To quantify these nuclear alterations 100 cells per sample were counted and the ratio of nuclei with apoptotic morphology was calculated (Fig. 1C). The proportion of dying cells increased significantly over time (Fig. 1C). In case of apoptotic cell nuclei (Fig. 1B,C), unfortunately, we couldn't evaluate the results after 48 h of MG-132 treatment, because almost all cells were severely affected by the treatment, hence floated off the slides during preparation of the microscopic samples. Consequently, only empty, or almost empty fields could be visualized in the microscope, this way not allowing a proper statistical analysis of the results. This is the reason why no image and no numerical ratio of apoptotic cells are indicated in Fig. 1B,C.

We complemented the above morphological analysis with flow cytometric measurements. The combined use of Annexin V and propidium-iodide (PI) is a reliable way of determining apoptotic cell rate by means of flow cytometry. We stained PC12 cells with Annexin V-FITC/PI after 0 (Fig. 1Da), 24 (Fig. 1Db), 30 (Fig. 1Dc) and 48 (Fig. 1Dd) hours of MG-132 treatment. We considered Annexin V⁺ PI⁺ double positive cells late apoptotic (non-viable). The percentage of dead cells were determined in individual dot-plots and we collected the data of 3 independent experiments (Fig. 1E). There was a significant increase in the ratio of Annexin V⁺ PI⁺ double positive cells after 24, 30 or 48 h of MG-132 treatment (Fig. 1E). As expected, with flow cytometry we measured a higher percentage of apoptotic cells than with confocal fluorescence microscopy (see above) because here not only the adherent cells were involved in the analysis but those already floating in the media as well. Additionally, since our experiments were carried out with adherent PC12 cells, for the flow cytometric analysis trypsin had to be used to collect them, which enhances phosphatidyl-serine (PS) externalization in the membrane^{13,14} and, as a result of it, can also elevate Annexin V staining of the cells.

Finally, in order to complete the evaluation of apoptotic changes in PC12 cells upon prolonged MG-132 treatment, we performed a cell viability test using the cell proliferation indicator WST-1 (Fig. 1F). Briefly, in living cells the tetrazolium salt WST-1 is converted by mitochondrial dehydrogenases into formazan, the amount of which correlates with the number of metabolically active/living cells in the cultures. It is worth mentioning that due to protocol requirements of the WST-1 assay, upon completion of the MG-132 treatments the media were removed. Then the cells had to be incubated for an additional 4 h with the tetrazolium salt in a newly added buffer which did not contain MG-132. Nevertheless, since MG-132 had already been taken up into the cells by this time, in these cases, due to the 4-h-long additional incubation requirement with the tetrazolium salt the total duration of the MG-132 effect was practically also extended by 4 h (see Supplementary Fig. 1). This circumstance explains very likely the dramatic drop in mitochondrial activity in the sample treated for 24 h with MG-132 compared to the untreated control. We measured the optical density (OD) of formazan in samples treated with MG-132 for 0, 24, 30 and 48 h (Fig. 1F). In accordance with our earlier findings with Hoechst and Annexin V/PI staining and perhaps even more prominently the proportion of metabolically active cells decreased significantly already after 24, then at 30 and 48 h of MG-132 treatment (Fig. 1F).

Before proceeding further, we wanted to confirm the effectiveness and kinetics of our MG-132 treatment. For this reason, we performed an additional proteasome activity assay (Supplementary Fig. 1). MG-132 treatment resulted almost in 80% decrease of the proteasome activity in PC12 cells (Supplementary Fig. 1). Proteasome inhibition was evident already after 3 h of treatment and remained at this suppressed level without significant alterations even during our longest incubation with the compound (48 h) (Supplementary Fig. 1).

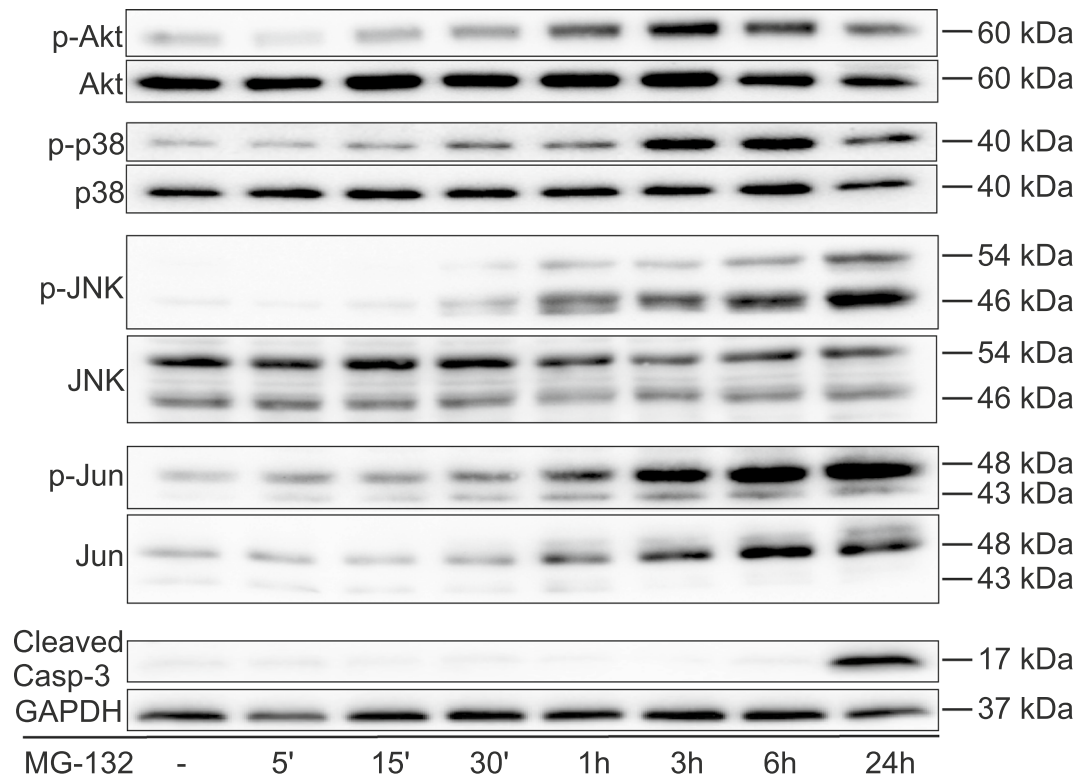


Figure 2. Time kinetics of MG-132-induced Akt, p38, JNK, c-Jun phosphorylation and caspase-3 cleavage. Representative Western blots show the phosphorylation changes of Akt, p38, JNK and c-Jun or the activating cleavage of caspase-3 after 0, 5, 15, 30 min or 1, 3, 6 and 24 h of MG-132 (2.5 μ M) treatment. Blots (except for caspase-3) were first probed with phospho-specific antibodies (upper panels), followed by stripping and re-probing with the antibodies specific for the non-phosphorylated forms of the proteins (lower panels). The GAPDH signal was loading reference for cleaved caspase-3. All blots were cropped, original membrane images are shown in Supplementary Fig. 4. All experiments were repeated with similar results.

Time kinetics of Akt phosphorylation, the activation of stress signaling molecules and caspase-3 cleavage induced by MG-132 treatment. Having seen that after 24 h of MG-132 treatment an increasing portion of PC12 cells started to enter apoptosis, we decided to examine the signaling background of this process. Since the proteasome is involved in the regulation of numerous signaling molecules, we analyzed some of the key pathways that influence survival, mediate stress or even apoptosis of cells. First, we analyzed the phosphorylation of Akt where MG-132 induced a phosphorylation peak at 3 h of treatment. Afterwards, the declining signal followed up to 48 h (Fig. 2 and Supplementary Fig. 2).

Stress signaling pathways also play a pivotal role in regulating the apoptosis of various cell types¹⁵, including PC12 cells¹⁶. So next, we examined the phosphorylation of p38 MAPK and that of JNK and its substrate, c-Jun upon MG-132 treatment (Fig. 2). The peak of p38 phosphorylation lasted from 3 to 6 h of MG-132 treatment. Then the signal became weaker but remained still higher than in the control sample up to 48 h (Fig. 2 and Supplementary Fig. 2). The activation of JNK was apparent after the first 30 min already and it continued to increase up to 48 h of MG-132 treatment (Fig. 2 and Supplementary Fig. 2). A similar pattern was detectable with c-Jun, moreover, its unphosphorylated version showed the same increasing signal kinetics (Fig. 2).

As for caspase-3, its activating cleavage could be detected in the sample after 24 h of MG-132 treatment (Fig. 2). The cleaved caspase-3 signal became even more pronounced after 30 and 48 h (Supplementary Fig. 2).

In summary, after these extended periods of MG-132 treatment the survival-mediating Akt activation declined permanently, whereas the apoptosis-inducing stress signaling pathways were becoming more and more active, and a robust elevation of cleaved caspase-3 was also observable in PC12 cells (Supplementary Fig. 2).

Subcellular distribution of stress signaling molecules upon MG-132 treatment. Having seen the phosphorylation changes of p38, JNK and c-Jun we performed immunofluorescence staining targeting the phosphorylated forms of p38, JNK and c-Jun. Using laser scanning confocal fluorescence microscopy no p-p38 and p-c-Jun signal could be detected in untreated PC12 cells (Fig. 3A,C, respectively) while some phosphorylated JNK could be captured in the cytoplasm even without treatment (Fig. 3B). Then we applied MG-132 treatments to provoke maximal activation of the kinases, which meant 6 h for p38 and 24 h for JNK and c-Jun (as shown above under 3.2). After 6 h of MG-132 treatment phosphorylated p38 was predominantly in the cytoplasm of PC12 cells with some additional signal in nuclei (Fig. 3D). After 24 h of MG-132 treatment a strong p-JNK signal

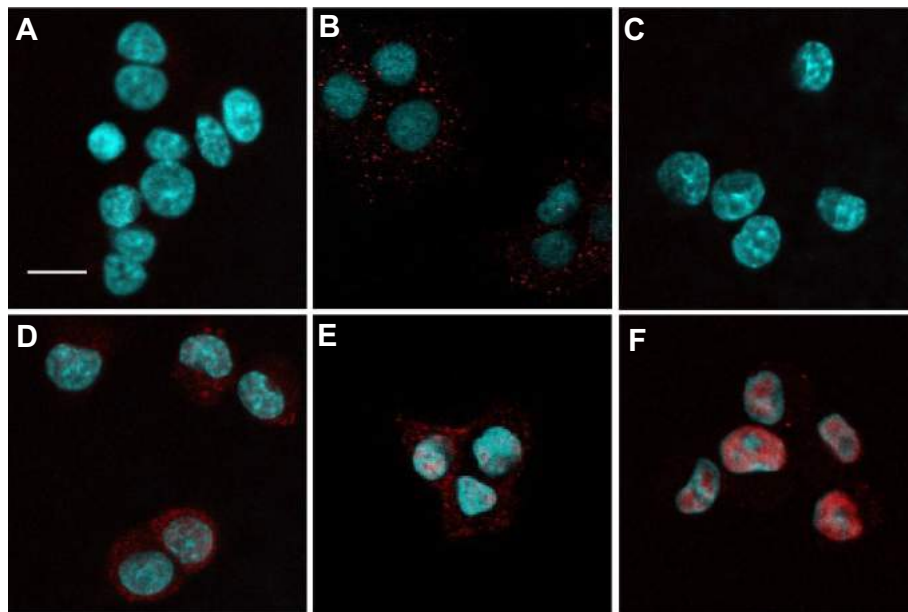


Figure 3. The effect of MG-132 treatment onto the intracellular localization of phosphorylated p38, JNK and c-Jun proteins in PC12 cells by means of confocal fluorescence laser scanning microscopy. Representative microscopic images show p-p38 (A,D), p-JNK (B,E) and p-c-Jun (C,F) signals in untreated (A–C) or 2.5 μ M MG-132-treated [6 h for (D) and 24 h for (E,F)] samples, respectively. The phosphorylated p38, JNK and c-Jun signals are shown in red and nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue) on all panels. The scalebar on panel (A) (10 μ m) applies to all (A–F) images.

was detectable both in the cytoplasm and in nuclei of the cells (Fig. 3E), while in the case of p-c-Jun its markedly increased immunoreactivity was almost exclusively nuclear (Fig. 3F).

Using kinase-inhibitors to block specific signaling pathways. In order to specify the role of the above examined kinases further, PC12 cells were cultured 1 h with a kinase inhibitor followed by MG-132 treatment for 3 h. LY294002 is a highly selective inhibitor of phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) that in turn blocks Akt phosphorylation indirectly. SB203580 is a selective inhibitor of p38 MAPK while SP600125 is a potent and selective JNK-1, -2, and -3 inhibitor. Pre-treatment with LY294002 effectively blocked both basal and MG-132-induced Akt phosphorylation (Fig. 4A,B) in PC12 cells but increased (although not significantly) the phosphorylation of p38 (Fig. 4A,C). At the same time it had negligible effects on JNK and c-Jun phosphorylation (Fig. 4A,D,E). Pre-treatment with the p38 inhibitor SB203580 abolished MG-132-induced Akt phosphorylation and also decreased the basal activity of Akt (Fig. 4A,B), but increased the phosphorylation of p38, JNK and c-Jun induced by MG-132 treatment (although the latter two were not significant) (Fig. 4A,C,D,E, respectively). Finally, pre-treatment with the JNK inhibitor SP600125 prevented MG-132-induced Akt, JNK and c-Jun phosphorylation and it also reduced basal Akt activity (Fig. 4A,B,D,E), but increased (although not significantly) both basal and MG-132-induced phosphorylation of p38 (Fig. 4A,C).

We also checked whether the kinase inhibitor treatments affected cell viability. Decreased cell viability was detectable in all samples. The lowest ratio of living cells was measured in samples treated with the combination of LY294002 or SP600125 and MG-132 (56% and 58%, respectively), whereas the SB203580- or SP600125-treated cells showed somewhat higher viability (68% and 66%, respectively). Interestingly, the combination of SB203580 and MG-132 resulted in a similar viability as the MG-132 single treatment (81% and 86%, respectively), while LY294002 treatment alone affected cell viability the least (92%) (Supplementary Fig. 3).

Phosphorylation of the examined cell signaling molecules in wild type PC12 cells and M-M17-26 mutants upon 3 h of MG-132 treatment.

Since Ras is a master regulator of signaling in various cell types, including PC12 cells, we investigated MG-132-induced phosphorylation events in a dominant negative mutant Ras-expressing PC12 cell line (M-M17-26) (Fig. 5). These cells undergo apoptosis earlier upon treatment with MG-132 (our own, unpublished data) compared to wild type PC12 cells and they show no signs of neuronal differentiation in the presence of this proteasome inhibitor. The latter phenomenon can be explained, at least in part, by the impaired ERK1/2 phosphorylation of these mutants⁴. In M-M17-26 cells upon MG-132 treatment we could detect no significant changes in the phosphorylation state of the same examined signaling molecules that we have tested in wild type PC12 cells. Although we could identify elevated p-Akt levels both in the untreated and in the MG-132-treated M-M17-26 cultures (Fig. 5A,B), the basal activity of p38 and JNK seemed to be somewhat lower in M-M17-26 cells (Fig. 5A,C,D), while the MG-132 induced p38 phosphorylation was the same as in wild type cells (Fig. 5A,C). Interestingly, the lack of Ras function decreased JNK and on the other hand increased c-Jun phosphorylation after MG-132 treatment (Fig. 5A,D,E).

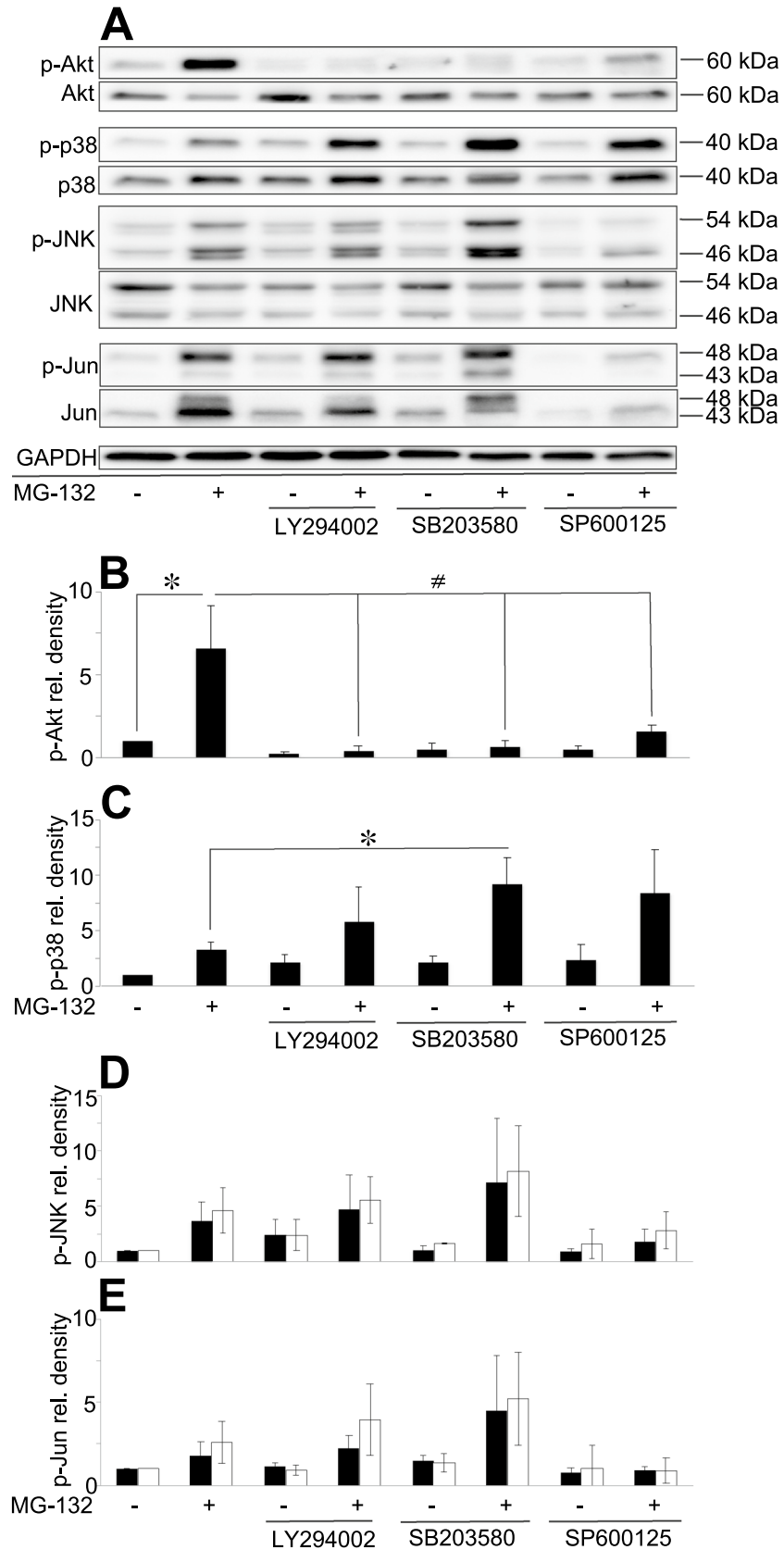


Figure 4. MG-132-induced phosphorylation of various signaling proteins using kinase-inhibitors. (A) Immunoblot analysis of Akt, p38, JNK and c-Jun phosphorylation in the presence of the PI3K inhibitor (LY294002) (20 μ M), p38 inhibitor (SB203580) (10 μ M) or JNK inhibitor (SP600125) (50 μ M) in PC12 cells. Cultures were left untreated or were treated for 3 h with MG-132 (2.5 μ M) and the inhibitors were added 1 h prior to the proteasome inhibitor treatment and remained present in the cultures until the end of the experiment (altogether 4 h). All blots were cropped, original membrane images are shown in Supplementary Fig. 4. Diagrams show the activation pattern of Akt (B), p38 (C), JNK (D) and c-Jun (E). Bars demonstrate the mean ratio \pm SD values calculated from the data of three independent experiments. Statistically significant differences are indicated ([#]P \leq 0.05).

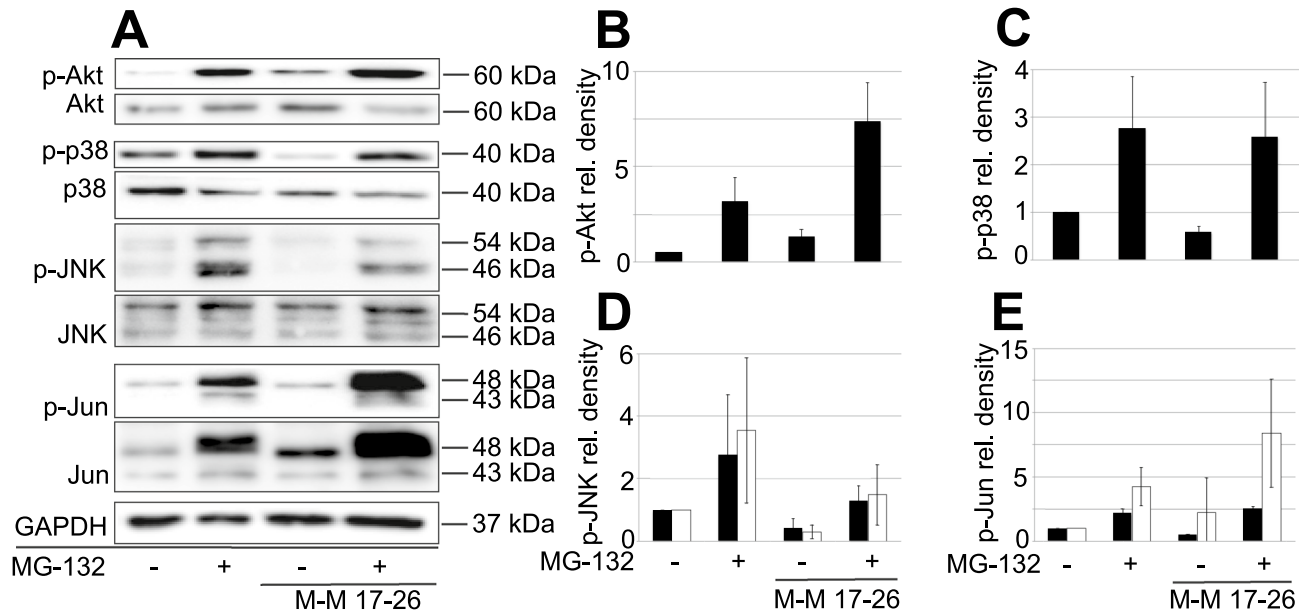


Figure 5. MG-132-induced phosphorylation of the previously examined cell signaling molecules in wild type and dominant negative H-Ras-expressing (M-M17-26) PC12 cell mutants. (A) Western blot analysis of Akt, p38, JNK and c-Jun phosphorylation in wild type and M-M17-26 PC12 cells. Cells were treated for 3 h with MG-132 (2.5 μ M). All blots were cropped, original membrane images are shown in Suppl. Figure 4. Diagrams show the activation of Akt (B), p38 (C), JNK (D) and c-Jun (E) with or without MG-132 treatment. Bars represent the mean ratio \pm SD values calculated from data of three independent experiments.

Discussion

Proteasome inhibitors are used to treat hematological malignancies, primarily, due to their apoptosis-inducing potential. In case of the agent Bortezomib, for example, four cellular processes were identified behind its apoptosis-inducing ability: (1) it inhibits the NF κ B pathway, (2) it directly induces apoptosis via JNK and p53, (3) it prevents the degradation of pro-apoptotic proteins (like that of Bim, Bid, Bik, NOXA) and (4) it provokes endoplasmic reticulum (ER) stress and unfolded protein response (UPR)¹⁷.

From this point of view it was an interesting observation that the proteasome inhibitor MG-132 treatment induced neuronal differentiation in PC12 cells¹⁸, an effect mediated by sustained ERK1/2 phosphorylation and nuclear translocation of active ERK1/2¹. The neuronal differentiation-inducing effect of MG-132, however, is only transient (up to the first 24 h). Upon prolonged (more than 24 h) exposure of PC12 cells to MG-132, events of differentiation are rapidly taken over by cellular deterioration, apparently as a result of apoptosis. A microarray analysis has also made it evident that proteasome inhibition with lactacystine activates neuroprotective and pro-apoptotic pathways as well¹⁹.

In the present study we examined the molecular background of the above biphasic response elicited by the proteasome inhibitor MG-132 in PC12 cells. Upon MG-132 treatment up to 24 h we could observe prolonged activation of Akt -the kinase mediating cell survival- and that of stress-mediating signaling components (p38, JNK, c-Jun). Around 24 h of MG-132 treatment ERK1/2¹ and Akt activation already declined and the signs of apoptosis were increasingly detectable in the cultures. After 24 h the stress signaling molecules p38, JNK and c-Jun were still highly active. Most importantly, in samples treated for 24 h with MG-132 the activating cleavage of caspase-3 was also evident. The results of Wu and colleagues²⁰ have previously confirmed that sustained -but not transient- activation of JNK contributes to apoptosis, which is in line with our above observation of sustained JNK phosphorylation upon MG-132 treatment in PC12 cells before and as they underwent apoptosis.

In addition, we examined the localization of activated stress signaling molecules: the MAPKs (p38 and JNK) were detected both in the cytoplasm and in the nucleus, while the transcription factor p-c-Jun was observed exclusively in nuclei of MG-132-treated PC12 cells.

An important point regarding mechanism of action is how proteasome inhibitor treatment can increase the expression level or activation of signaling molecules? In general, it can either prevent proteasomal degradation of the phosphorylated/active form of a signaling molecule itself and/or that of its upstream activator(s). All signaling molecules that we examined in this study (and even additional molecules involved in their activation or inactivation here not examined) can be broken down by the proteasome. Our current results indicate that the phosphorylated forms of Akt, p38, JNK and c-Jun are targets of regulation exerted by the proteasome in PC12 cells. The sustained blockade of the proteasome has led to the accumulation of activated p38, JNK and caspase-3, which, in turn, triggered apoptosis. Both p38 and JNK are involved in the activation of pro-apoptotic Bcl-2 family members (like Bax and Bim) and also in the inactivation of anti-apoptotic Bcl-2 isoforms (Bcl-2 itself, for example), eventually leading to cytochrome c release and caspase activation²¹.

Long term proteasome inhibitor-induced PC12 cell apoptosis demonstrated in our study could add to our understanding of the neurological side effects observable in proteasome inhibitor-treated patients. In some

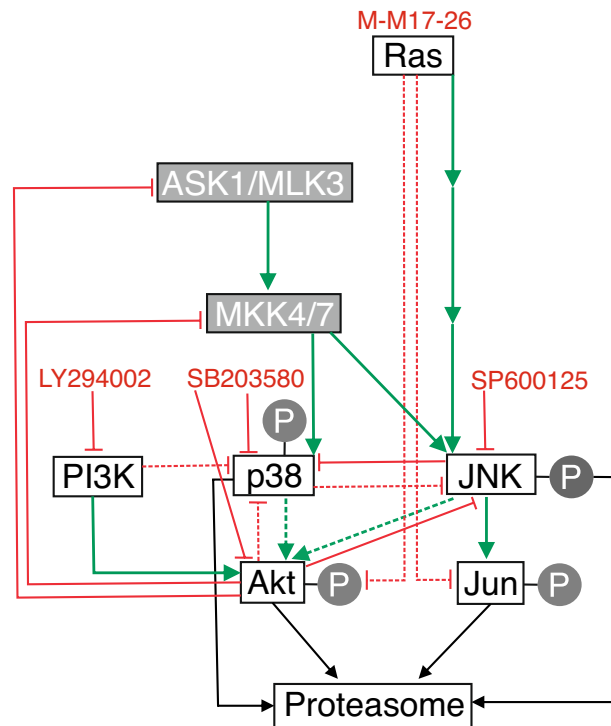


Figure 6. Proposed summary of proteasome inhibitor- and kinase inhibitor-induced signaling in PC12 cells. Activation is indicated by green arrows, inhibition by red lines. Dashed lines represent proposed connections based on our presented results, continuous lines show already confirmed connections. Signaling molecules studied in this work are indicated in white boxes with black captions, other components not studied by us are in grey boxes with white captions.

neurodegenerative diseases, like Parkinson's disease, a decreased function of the proteasome was observed resulting in the accumulation of mis-folded proteins and leading to neuronal degeneration²². The first proteasome inhibitor approved by the FDA in 2003 for the treatment of multiple myeloma was Bortezomib²³ that belongs to the group of peptide-boronates. Carfilzomib is an epoxyketon type proteasome inhibitor that has acquired FDA approval in 2012²⁴, while Ixazomib -which belongs to the same group as Bortezomib- was the first orally administered proteasome inhibitor approved in 2015 for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma²⁵, just like Carfilzomib. Bortezomib-induced peripheral neuropathy (BIPN), a well-documented complication, develops in 30–60% of treated patients²⁶. Earlier studies identified ER stress, mitochondrial dysfunction and trafficking problems, inflammatory response, DNA damage and microtubule-related changes as additional components in the background of BIPN²⁶. Based on our results neuronal apoptosis could also contribute to the development of neuropathy, however, further studies are needed to directly confirm this hypothesis.

Finally, by combining proteasome inhibition with kinase inhibitor treatments we could interfere with potentially critical connections between Akt, p38, JNK and c-Jun. We summarize our currently proposed network of these interactions based on our presented experimental data and on additional ones from the literature in Fig. 6.

As expected, the PI3K inhibitor LY294002 completely abolished Akt activation (Fig. 6). Interestingly, the inhibition of PI3K enhanced MG-132-induced p38 phosphorylation, suggesting that PI3K or Akt normally has an inhibitory effect on p38 activation (Fig. 6). Other studies have reported, for example, that Akt inhibits MKK4 (MAPK Kinase 4), ASK1 (Apoptosis Signal-regulated Kinase 1) and MLK3 (Mixed Lineage Kinase 3)²⁷, which kinases are the upstream activators of p38 and JNK as well. Although it has been documented that Akt has an inhibitory effect on JNK through upstream kinases²⁷, we could not detect a significant elevation of JNK- and c-Jun-activation upon the double treatment of LY294002 and MG-132, compared to proteasome inhibitor treatment alone (Fig. 6).

The ATP competitive p38 inhibitor, SB203580 on the other hand had a negative effect on Akt phosphorylation, suggesting that p38 plays a role in MG-132-induced Akt activation in PC12 cells (Fig. 6). The direct inhibition of Akt by SB203580 has also been reported²⁸. SB203580 binds the ATP binding site of p38 and hence, it can inhibit the kinase activity, but not the phosphorylation of the enzyme by upstream kinases. We observed significantly elevated p38 phosphorylation after combined SB203580 and MG-132 treatment compared to the sample treated with MG-132 alone. MG-132-induced JNK and c-Jun phosphorylations were also elevated upon SB203580 pretreatment, a phenomenon that can have several explanations (Fig. 6): (1) either p38 itself inhibits JNK phosphorylation (Fig. 6), or (2) Akt can inhibit JNK activation at various levels [e.g. at ASK1, MLK3 (MAPKKs), MKK4/7 (MAPKK) or JNK] and when Akt is inactivated by SB203580 directly or indirectly through p38 inactivation, Akt is not able to inhibit the JNK pathway (Fig. 6). (3) Furthermore, it has been shown that SB203580

increases JNK phosphorylation through the activation of MLK3, the MAPKKK involved in JNK activation²⁹. Finally, it is worth mentioning that SB203580-induced MLK3 phosphorylation can be a result of the previously mentioned Akt inactivation and the consequentially impaired Akt-induced MLK3 inhibition.

SP600125 is an ATP competitive pan-JNK inhibitor, that decreased the MG-132-induced Akt phosphorylation significantly, suggesting that the activity of JNK is required for MG-132-induced Akt activation in PC12 cells (Fig. 6). The MG-132 induced p38 phosphorylation was elevated upon JNK inhibitor pretreatment, indicating that JNK has a—direct or indirect—inhibitory effect on p38 activation (Fig. 6). For example JNK activates an E3 ubiquitin ligase, Itch, that is involved in MKK4 inactivation³⁰ and when this inhibitory pathway is blocked by SP600125, MKK4 can activate p38. Decreased c-Jun phosphorylation shows that JNK activity is blocked by SP600125 (Fig. 6), but JNK phosphorylation was also diminished, suggesting that there could either be a positive feedback loop in this pathway or autophosphorylation of JNK itself is responsible for it (Fig. 6). Fey and colleagues suggested a positive feedback in JNK signaling, through which JNK can activate its upstream kinases ASK and MLK²⁷. Furthermore, JNK2 autophosphorylation has been reported too³¹. In addition to these two abovementioned processes, there are other possibilities to explain how SP600125 pretreatment could decrease JNK phosphorylation (Fig. 6). Based on the previous conclusions that SP600125 increases p38 activity and p38 activates Akt, which in turn inactivates the upstream kinases of JNK (ASK/MLK, MKK4/7), this whole process could lead to decreased JNK phosphorylation as well (Fig. 6).

In the absence of functioning Ras, proteasome inhibitor treatment had substantially different consequences. In dominant negative Ras-mutant M-M17-26 PC12 cells MG-132-induced ERK phosphorylation is completely missing^{1,12} and neuronal differentiation of the cells is absent too (our own, unpublished data). However, even these mutant cells exhibit the signs of apoptosis after prolonged MG-132 treatment (in fact somewhat sooner than normal PC12 cells, data not shown). This observation supports that the functionality of the Ras-ERK pathway is required to experience the effects of MG-132 treatment's early phase, i.e. neuronal differentiation in PC12 cells. The later apoptosis-inducing events, however, remained unaffected by Ras inhibition.

In conclusion, we demonstrated the apoptosis-inducing ability of MG-132 in PC12 cells and identified that the phenomenon of programmed cell death is coupled to a gradual shift in MG-132-induced signaling towards increased activity of stress kinases (JNK and p38) and caspase-3 from the initial stimulation of pro-differentiation/survival molecules (ERK1/2 and Akt). Furthermore, we propose a complex regulatory network among signaling components like Akt, JNK and p38. Finally, we showed that some kinase inhibitors could potentiate the effects of the proteasome inhibitor MG-132. The latter observation and the proposed regulatory connections between the examined signaling components could even contribute to the establishment of novel therapeutic combinations in the future.

Received: 28 September 2021; Accepted: 29 March 2022

Published online: 06 April 2022

References

1. Tarjányi, O. *et al.* The role of Src protein in the process formation of PC12 cells induced by the proteasome inhibitor MG-132. *Neurochem. Int.* **63**, 413–422. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.07.008> (2013).
2. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425> (1998).
3. Hattori, K. *et al.* Molecular dissection of the interactions among IκBα, FWD1, and Skp1 required for ubiquitin-mediated proteolysis of IκBα. *J. Biol. Chem.* **274**, 29641–29647. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.29641> (1999).
4. Doherty, F. J., Dawson, S. & Mayer, R. J. The ubiquitin-proteasome pathway of intracellular proteolysis. *Essays Biochem.* **38**, 51–63. <https://doi.org/10.1042/bse0380051> (2002).
5. Pickart, C. M. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol. Cell* **8**, 499–504. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00347-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00347-1) (2001).
6. Goldberg, A. L. Functions of the proteasome: From protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 12–17. <https://doi.org/10.1042/BST0350012> (2007).
7. Mohty, M., Brissot, E., Savani, B. N. & Gaugler, B. Effects of bortezomib on the immune system: A focus on immune regulation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **19**, 1416–1420. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2013.05.011> (2013).
8. Petroski, M. D. The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC Biochem.* **9**, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-S1-S7> (2008).
9. Ciechanover, A. & Brundin, P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: Sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* **40**, 427–446. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00606-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00606-8) (2003).
10. Tsukamoto, S. & Yokosawa, H. Targeting the proteasome pathway. *Expert Opin. Ther. Targets* **13**, 605–621. <https://doi.org/10.1517/14728220902866851> (2009).
11. Thibaudeau, T. A. & Smith, D. M. A practical review of proteasome pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **71**, 170–197. <https://doi.org/10.1124/pr.117.015370> (2019).
12. Szeberényi, J., Cai, H. & Cooper, G. M. Effect of a dominant inhibitory Ha-ras mutation on neuronal differentiation of PC12 cells. *Mol. Cell Biol.* **10**, 5324–5332. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.10.5324-5332.1990> (1990).
13. Hu, T. *et al.* Measurement of annexin V uptake and lactadherin labeling for the quantification of apoptosis in adherent Tca8113 and ACC-2 cells. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras Pesqui medicas e Biol.* **41**, 750–757. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x200800900002> (2008).
14. Punchoo, R., Zhou, E. & Bhoora, S. Flow cytometric analysis of apoptotic biomarkers in actinomycin D-treated SiHa cervical cancer cells. *JoVE* <https://doi.org/10.3791/62663> (2021).
15. Chuang, C. Y. *et al.* Licochalcone A induces apoptotic cell death via JNK/p38 activation in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Environ. Toxicol.* **34**, 853–860. <https://doi.org/10.1002/tox.22753> (2019).
16. Aminzadeh, A. Protective effect of tropisetron on high glucose induced apoptosis and oxidative stress in PC12 cells: roles of JNK, P38 MAPKs, and mitochondria pathway. *Metab. Brain Dis.* **32**, 819–826. <https://doi.org/10.1007/s11011-017-9976-5> (2017).
17. Nunes, A. T. & Annunziata, C. M. Proteasome inhibitors: Structure and function. *Semin. Oncol.* **44**, 377–380. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2018.01.004> (2017).

18. Hashimoto, K., Guroff, G. & Katagiri, Y. Delayed and sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase induced by proteasome inhibitors through p21(ras) in PC12 cells. *J. Neurochem.* **74**, 92–98. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740092.x> (2000).
19. Yew, E. H. J. *et al.* Proteasome inhibition by lactacystin in primary neuronal cells induces both potentially neuroprotective and pro-apoptotic transcriptional responses: A microarray analysis. *J. Neurochem.* **94**, 943–956. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03220.x> (2005).
20. Wu, Q. *et al.* Selective inhibitors for JNK signalling: A potential targeted therapy in cancer. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **35**, 574–583. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1720013> (2020).
21. Nguyen, H. T. *et al.* JNK/SAPK and p38 SAPK-2 mediate mechanical stretch-induced apoptosis via caspase-3 and -9 in NRK-52E renal epithelial cells. *Nephron Exp. Nephrol.* <https://doi.org/10.1159/000088401> (2006).
22. Cao, Y. *et al.* Proteasome, a promising therapeutic target for multiple diseases beyond cancer. *Drug Des. Dev. Ther.* **14**, 4327–4342. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S265793> (2020).
23. Kane, R. C., Bross, P. F., Farrell, A. T. & Pazdur, R. Velcade®: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist* **8**, 508–513. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.8-6-508> (2003).
24. Steele, J. M. Carfilzomib: A new proteasome inhibitor for relapsed or refractory multiple myeloma. *J. Oncol. Pharm. Pract.* **19**, 348–354. <https://doi.org/10.1177/1078155212470388> (2013).
25. Moreau, P. *et al.* Oral ixazomib, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1621–1634. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1516282> (2016).
26. Velasco, R. *et al.* Bortezomib and other proteasome inhibitors-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **24**(Suppl 2), S52–S62. <https://doi.org/10.1111/jns.12338> (2019).
27. Fey, D., Croucher, D. R., Kolch, W. & Kholodenko, B. N. Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. *Front. Physiol.* <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00355> (2012).
28. Lali, F. V., Hunt, A. E., Turner, S. J. & Foxwell, B. M. J. The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated pro. *J. Biol. Chem.* **275**, 7395–7402. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.7395> (2000).
29. Muniyappa, H. & Das, K. C. Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580: A MLK-3-MKK7-dependent mechanism. *Cell Signal* **20**, 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.12.003> (2008).
30. Ahn, Y. & Kurie, J. M. MKK4/SEK1 is negatively regulated through a feedback loop involving the E3 ubiquitin ligase itch. *J. Biol. Chem.* **284**, 29399–29404. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.044958> (2009).
31. Cui, J. *et al.* Identification of a specific domain responsible for JNK2a2 autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* **280**, 9913–9920. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412165200> (2005).

Author contributions

O.T.: writing original draft, investigation using Western blots, phase contrast microscopy, flow cytometry and WST-1 assay, statistical analysis. J.H.: investigation using Western blots and immunocytochemistry, writing of the initial draft. M.V.: investigation using Western blots, immunocytochemistry and WST-1 assay. G.B.: investigation using confocal microscopy, data analysis. A.S.-H.: design of experiments with inhibitors. B.B.: technical experimental advising and critical review of the manuscript. K.F.: statistical analysis. F.B.: investigation using flow cytometry, writing original draft. J.S.: resources, funding acquisition, critical review of the manuscript. G.S.Jr.: conceptualization, resources, methodology, supervision, project administration, funding acquisition, investigation using confocal microscopy, reviewing and editing text.

Funding

Open access funding provided by University of Pécs. This work was supported by EFOP-3.6.1.-16-2016-00004, Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs and by project no. TKP2020-IKA-08 that has been implemented with the support provided from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme. Additional support was provided by ÁOK-KA-2021-31 to G. Setalo, Jr. The purchase of the Olympus FV-1000 laser scanning confocal system was supported by grant GVOP-3.2.1-2004-04-0172/3.0 to the University of Pécs. The funding sources had no involvement in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09763-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to G.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022