

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Tarjányi Oktávia

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



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium

Pécs

2023

Összefoglalás

Neuroendokrin eredetének köszönhetően a PC12 (patkány feokromocitóma) sejtvonal széles körben elterjedt modellrendszere az idegsejt differenciáció, túlélés és apoptózis sejttenyészetben történő tanulmányozásának. A Parkinson-kór, vagy a stroke modellezésére, illetve a neuroszekréció és neurotoxicitás *in vitro* tanulmányozására is kiválóan alkalmas sejtvonal. Ezek a patkány mellékvesevelőből származó daganatsejtek lekerekített formájúak, és viszonylag gyorsan osztódnak. Néhány napos idegi növekedési faktor (NGF) kezelés hatására azonban proliferációjuk leáll, poligonálissá válnak, nyúlványokat növesztenek és szimpatikus neuronokhoz válnak hasonlónak. Ezt a folyamatot nevezzük a PC12 sejtek neuronális differenciációjának, melynek háttérében komplex jelátviteli változások húzódnak meg.

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 (névének 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). Az ERK időben elhúzódó foszforilációja és nukleáris transzlokációja előfeltétele a PC12 sejtek neuronális differenciációjának. E folyamat során a Src (névének eredete: sarcoma) tirozin kináz aktivációja is megfigyelhető, melynek szintjét az enzim proteaszómális degradációjának mértéke is befolyásol. A proteaszóma funkció gátlása ugyanakkor neuritnövekedést is előidézhet PC12 sejtekben. Mi ehhez az utóbbihoz kísérleteinkben a peptidil-aldehid típusú MG-132 proteaszóma gátló vegyületet használtuk.

Saját megfigyeléseink alapján az MG-132 2,5 μ M-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 (apoptózisa) során végbemenő jelátviteli változások feltérképezését tűztük ki célul. 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 kezelése 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.

Összefoglalásképpen 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 neuritogenezist 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 apoptózist mozdtítják 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 komplexek szerepe is felmerült ezekben a folyamatokban. Különböző neurodegeneratív betegségek hátterében leírták a proteaszómák csökkent működését, ami a nem-, vagy nem jól hajtogatott fehérjék sejten belüli felhalmozódásával járhat hozzá az idegsejtek pusztulásához. Az első proteaszóma gátlók myeloma multiplexben történő sikeres terápiás alkalmazásával fény derült arra is, hogy ezeknek a szereknek az egyik súlyos mellékhatása a perifériás neuropátia. Ugyanakkor régóta ismert az a tény is, hogy egyes proteaszóma gátlók neuritnövekedést képesek indukálni. Egy microarray elemzésen alapuló tanulmány nyilvánvalóvá tette, hogy a laktaciszttinnel végzett proteaszóma gátlás neuroprotektív- és pro-apoptotikus útvonalakat is képes aktiválni.

Ezek a megfigyelések nagy mértékben korrelálnak a PC12 sejtek MG-132-vel való kezelése kapcsán általunk tapasztalt kétfázisú morfológiai változásokkal, melynek során kezdetben a neuritogenezis, későbbiekben pedig az apoptózis jelenségei domináltak. Munkánk során az ezeknek a folyamatoknak a hátterében zajló molekuláris mechanizmusokat vizsgáltuk. Kísérleteinkhez PC12 sejtek tenyészetét használtunk, melyek felszínén jól kimutathatóan expresszálódik a TrkA receptor, ami a polipeptid típusú NGF nagy affinitású sejt felszíni kötőhelye. Ennek a 140 kDa molekulatömegű fehérjének köszönhetően ez a sejt típus kedvelt modellrendszere az NGF jelátvitel és a neuronális differenciáció tanulmányozásának. Tartós, több napos NGF kezelés hatására a kis kerek sejtek osztódása leáll, méretük megnő, és hosszú nyúlványokat növesztve mind megjelenésük, mind biológiai viselkedésük szimpatikus idegsejtekéhez válik hasonlóvá. Az NGF mellett más polipeptid típusú növekedési faktorok, és

akár egyéb hatások (pl. MG-132 kezelés) is kiválthatják ezeknek a sejteknek a neuronális irányú differenciációját.

PC12 sejteket használnak ezen kívül például az embrionális fejlődés során végbemenő, illetve neurotoxinok, vagy egyéb ágensek által kiváltott neuronális apoptózis *in vitro* modellezésére is.

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, sejtűlést 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.

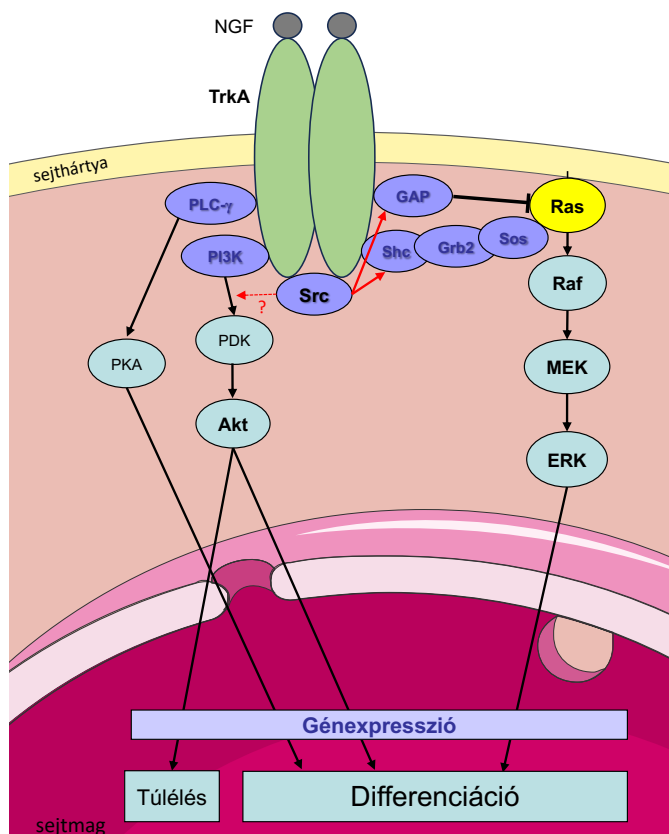
A MAP-Kinázok közé tartoznak az extracelluláris szignál-regulált kinázok (ERK1/2), a p38MAPK-ok (p38 α - δ), valamint a c-Jun N-terminális kinázok (JNK1-3). Aktivációjuk mindhárom esetben egy kinázokból álló kaszkád tagjainak egymást követő foszforilációja révén valósul meg. A kaszkád legproximálisabb 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. Az irodalomban található adatok a p38 MKK4 általi aktiválására is.

1. 3. A neuronális differenciáció (neuritogenezis) jelátvitelle

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. A receptor felszínén így létrejövő foszfo-tirozin oldalláncokhoz SH2 (Src homológia 2)-doménnel rendelkező citoplazmatikus fehérjék kötődnek, melyeket aztán a receptor szintén foszforilálni képes tirozin aminosav oldalláncaikon. Ilyen SH2-domént tartalmazó fehérjék például a Src, 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) (**1. ábra**), mely utóbbiak SH3 (Src homológia 3), effektor doménjükön keresztül további, prolin aminosavban gazdag fehérjéket képesek megkötni. 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 oldalláncon képes célmolekuláit 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 (**1. ábra**). Ennek eredményeként PC12 sejtekben a sejtciklus leállása, majd neuronális differenciációja figyelhető meg.

A nagy affinitású NGF-receptorról az ERK-út aktiválásán kívül számos egyéb jelátviteli folyamat is elindulhat (**1. ábra**). Az ERK kaszkád mellett ugyancsak a differenciációban vesz részt a PLC- γ enzim, 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.



1. ábra Az NGF által előidézett neuronális differenciáció jelátvitel

Magyarázat a szövegben. Az ábrán feltüntetett sejtalkotók a Servier Medical Art felhasználásával készültek, melyet a Servier biztosít egy „Creative Commons Attribution 3.0 unported license” alatt.

Az NGF-indukálta neuronális differenciációban a Src-nak is fontos szerep jut. 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. A teljes Src aktivációhoz szükséges a fehérje katalitikus doménjében (Tyr 416) bekövetkező aktiváló foszforiláció, valamint egyidejűleg a fehérje C-terminális végén

(Tyr 527) lévő inaktíváló foszfátcsoport eltávolítása. A Src inaktíválódása több úton keresztül is megvalósulhat. A Src C-terminális végén található tirozin oldalláncon történő gátló foszforilációt egy specifikus kináz, a Csk (C-terminális Src kináz) katalizálja. Az aktív Src azonban az ubiquitin-proteaszóma úton keresztül is degradálódhat. Munkánk során ezt az inaktívációs utat gátolva vizsgáltuk a Src jelátviteli molekula szerepét a PC12 sejtek szignalizációs folyamataiban.

A PI3K-út az Akt aktiválása révén elsősorban a sejtek túlélését 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. Feltételezik, hogy a Src szerepet játszhat az NGF-indukált, PI3K-függő neuritnövekedésben is (**1. ábra**).

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. 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, gyulladásos 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. 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 3 fő útvonalon keresztül valósulhat meg: (1) az extrinsic apoptotikus úton, ami sejtfelszíni halálreceptorokról indul, (2) az intrinsic, vagy mitokondriális úton, valamint (3) az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz által indukált apoptotikus útvonalon keresztül.

1. 4. 1. Az extrinsic út

Az extrinsic út (**2. 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. 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 (**2. ábra 2. rész**) aktiválódása a mitokondriumok külső membránjának permeabilizációjához (MOMP = mitochondrial outer membrane

permeabilization) vezet, 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 tumorszuppresszor 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. 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.

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 azáltal blokkolják az apoptózist, hogy a pro-apoptotikus társaikhoz kötődve gátolják azok aktivitását. 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. 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). 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.

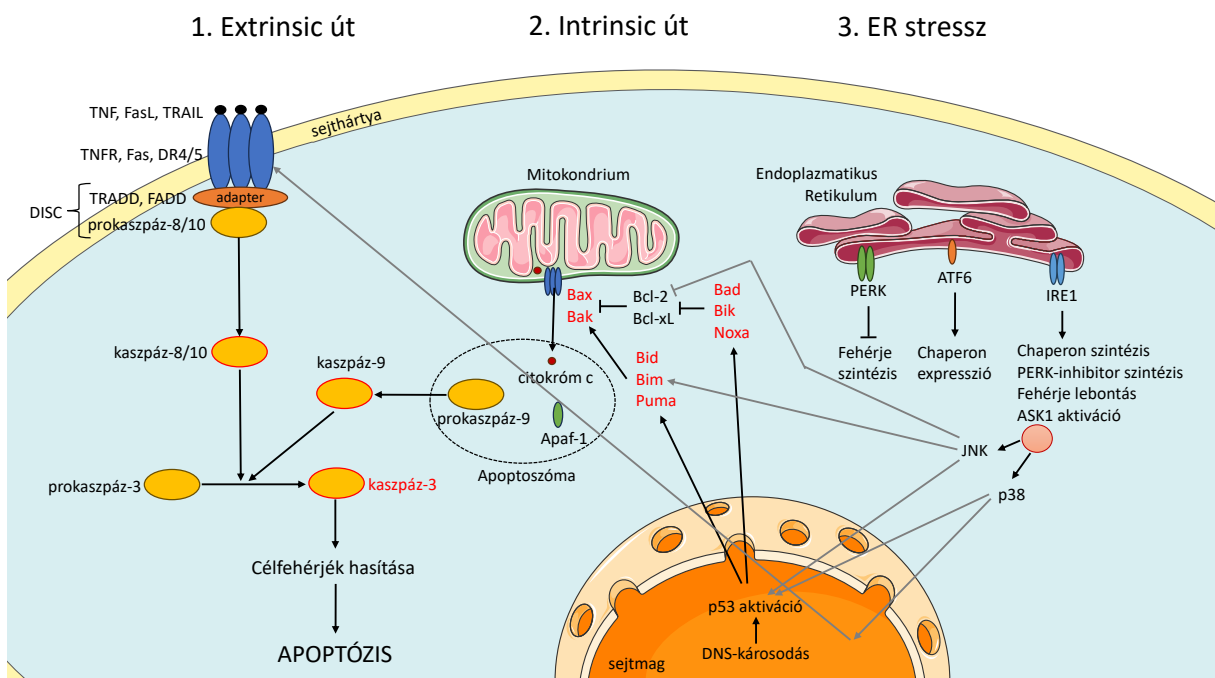
A mitokondriumok külső membránjának permeabilizálása -más molekulák mellett-citokróm c felszabaduláshoz vezet, ami pedig az Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) -gyel és prokaspáz-9 -cel együtt az apoptoszómák felépítésében vesz részt. A komplexben aktiválódó kaspáz-9 az effektor kaspáz-3-at, -6-ot és -7-et hasítja, és ezzel aktiválja, ami pár percen belül apoptózishoz vezet.

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 **(2. 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. 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 fehérjeinek expresszióját fokozza, majd a kombinált nukleáz és kináz IRE1 (inositol-requiring protein-1) által közvetített útvonalnak

köszönhetően további chaperonok, valamint a PERK-inhibitor szintéziséen 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, 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 leszályozását (down-regulációját), ugyanakkor a pro-apoptotikus Bim és Puma serkentését (up-regulációját), valamint a Bax és Bak aktivációját idézi elő. Ezek a változások mind az apoptózis folyamatához járulnak hozzá. ER stressz következtében a JNK tartós aktivációja is megfigyelhető. 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. Ugyanakkor a p38 egy pro-apoptotikus transzkripciós faktort aktivál, ami olyan gének expresszióját fokozza (pl. DR5), amelyek hozzájárulnak a sejthalálhoz. Ezekon a hatásokon kívül mindkét stressz kináz képes a p53-at aktiválni, aminek következtében beindul az apoptózis intrinsic útja is.



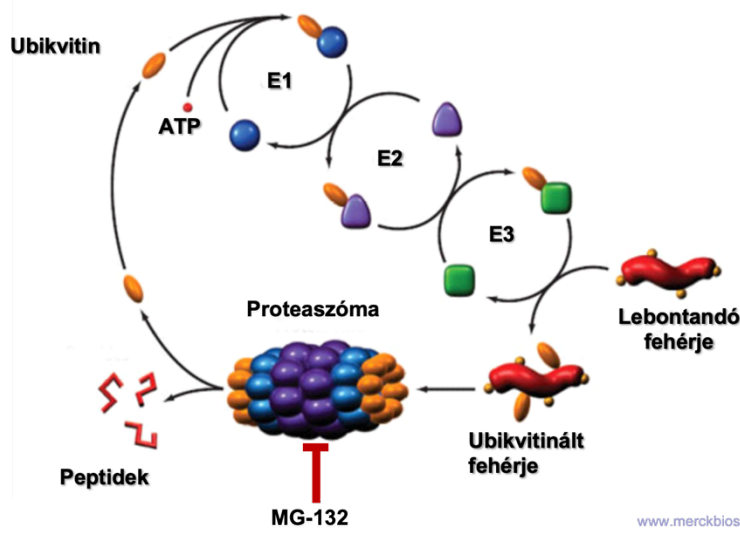
2. ábra Az apoptózis jelátvittele

Magyarázat a szövegben. 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 szükségtelenné vált, rosszul hajtogatott, vagy valamilyen módon károsodott fehérjék precízen szabályozott lebontására az ubikvitin-proteaszóma rendszer nyújt megoldást a sejtekben. A rendszer jelentőségét mutatja, hogy az intracelluláris fehérjék kb. 80 %-a ezen az útvonalon keresztül bomlik le. A poli-ubikvitinált fehérjéket a 26S proteaszóma komplex ismeri fel, majd ezt követően proteolitikus aktivitásánál fogva alkotóelemeire bontja őket. Az UPS működése (3. ábra) során első lépésként a célfehérjéhez kovalens kötésekkel ubikvitin molekulák kapcsolódnak. Az ubikvitin egy erősen konzervált, 76 aminosavat tartalmazó protein, amit egy 3 enzimből álló enzimszisztéma kapcsol a lebontandó fehérje lizin oldalláncaihoz. A poli-ubikvitinációt végző enzimszisztéma tagjai az ubikvitin-aktiváló (E1), az ubikvitin-konjugáló (E2) és az ubikvitin-ligáz (E3) enzimek.

A proteaszómák nagyméretű multienzim komplexek, melyek a sejtek magjában és a citoplazmában helyezkednek el. A komplex proteolitikus magja a 20 S proteaszómaként ismert, többszörös peptidáz aktivitással rendelkező katalitikus rész, amely 4 heptamer gyűrűbe ($\alpha 7$, $\beta 7$, $\beta 7$, $\alpha 7$) rendeződött henger alakú struktúrát hoz létre. 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. 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. 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. Az ubikvitin molekulákat deubikvitináló (DUB) enzimek vágják le a lebontandó fehérjéről, majd az így felszabaduló ubikvitin más proteinekhez kötődve újrahasznosul (3. ábra).



3. ábra Az ubikvitin-proteaszóma rendszer működése

Egy 3 enzimből álló enzimszisztéma (E1, E2 és E3) ATP felhasználásával ubikvitin molekulákat kapcsol a lebontandó fehérjéhez. A poli-ubikvitinált fehérjéket a proteaszóma bontja alkotórészeire, míg a felszabaduló ubikvitin molekulákat újra felhasználhatja a rendszer. Az MG-132 a proteaszóma proteolitikus funkcióját

gátolva képes megakadályozni bizonyos fehérjék specifikus lebontását.

Az ubikvitin-proteaszóma rendszer fontos szerepet tölt be a sejtciklust, sejtproliferációt, differenciációt, apoptózist és a gyulladást szabályozó fehérjék lebontásában, 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, neurodegeneratív kórképekben, vagy autoimmun/gyulladásos megbetegedésekben.

2. Célkitűzések

Munkánkat Hashimoto és munkatársai 2000-ben publikált tanulmánya inspirálta, amelyben a peptidil-aldehid, N-acetil-Leu-Leu-norleucinál és a laktaciszтин 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 hátterében milyen jelátviteli változásokat találunk? Kísérleteink során azonban azt tapasztaltuk, hogy az MG-132 kétfázisú választ vált ki ebben a sejtvonalon. 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 kiváltja a PC12 sejtek neuronális differenciációjához szükséges tartós ERK aktivációt és az aktív ERK nukleáris transzlokációját is (lásd Dr. Berta Gergely PhD dolgozata, PTE ÁOK, 2013/14).

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 neurit növekedés 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 sejtvonalon), valamint
- ezek alapján megpróbáltunk felvázolni egy jelátviteli hálózatot a vizsgált molekulák között.

3. Módszerek

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 sejtleletképeségi vizsálatokat végeztünk.

4. Eredmények

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

MG-132-vel végzett tartós proteaszóma gátló kezelést alkalmazva fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk a PC12 sejtek morfológiájának változásait az eltelt idő függvényében. Az észlelt megjelenésbeli változásokból kiindulva arra következtettünk, hogy az MG-132 kezelés kétfázisú választ vált ki PC12 sejtekben. Ezek után érdeklődésünk a háttérben rejlő lehetséges, sejten belüli mechanizmusok irányába fordult. Így munkánk során először a kezdeti neuritnövekedés (ehhez tartozó eredmények az „A. NEURITOGENEZIS” részben), majd az azt követő sejtpusztulás (ehhez tartozó eredmények a „B. APOPTÓZIS” részben) háttérében meghúzódó jelátviteli történéseket külön-külön vizsgáltuk.

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), viszont az itt tárgyalt jelenségek megértéséhez is szükséges megemlíteni, hogy az MG-132 kezelés, kb. 6 óránál tapasztalt maximális jelerősödéssel, 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.

A Src enzim differenciációban betöltött kulcsszerepe is ismert az irodalomból ebben a sejtvonalban, és a proteaszómális lebontás mechanizmusát is leírták ennek a tirozin-kináznak a szabályozásában. Ezért a következő lépésben a Src fehérje aktivációjának időkinetikáját vizsgáltuk MG-132 kezelése hatására ebben a sejttípusban. 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.

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

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

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

Ennek eldöntésére a MEK szerepét kémiai MEK-inhibitor (PD98059) 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 30 perccel a proteaszóma gátló kezelés megkezdése előtt, 20 μ M-os koncentrációban alkalmazva az MG-132 által indukált ERK aktiváció elmaradt. 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.

A Ras funkciójának vizsgálatához időkinetikai kísérleteket végeztünk az M-M17-26 sejtvonalat használva. Az ERK foszforiláció alapszintje eleve gyengébb volt ebben a sejtvonaltban mint a kontroll PC12-ben, és azt nem is lehetett fokozni egyetlen MG-132 kezelési időpontban sem.

Ezek alapján elmondhatjuk, hogy az ERK MG-132 által indukált foszforilációja 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 μ M PP2-t alkalmaztunk, amely a Src tirozinkinázok erős és szelektív inhibitora. 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.

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. A PP2 jelenléte nem gátolta teljesen az ERK foszforiláció növekedését, de csökkentette az MG-132 által kiváltott csúcsintenzitást. 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.

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.

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

Annak érdekében, hogy a Src és az ERK aktiválódása közötti lehetséges összefüggést megvizsgáljuk kísérletes rendszerünkben, úgy döntöttünk, hogy teszteljük a nagy affinitású NGF receptor (TrkA) szerepét az MG-132 által kiváltott jelátviteli eseményekben.

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

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-inhibitor 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, viszont meggátolta a TrkA foszforilációját. K252a jelenlétében az ERK aktiváció mérhető volt ugyan, de intenzitása elmaradt a TrkA-gátlóval nem kezelt mintákhoz képest. Ennek a mértéke ráadásul összevethető volt a korábban PP2 jelenlétében mért ERK aktivációs intenzitásokkal, melyeket a Src-gátlást követően mértünk.

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.

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 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. Kezelés nélkül a gyenge p-ERK jel is többnyire citoplazmatikus elhelyezkedésűnek bizonyult. 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.

Önmagában a Src PP2-vel való gátlása nem volt hatással a p-ERK jel intracelluláris eloszlására és szintjére PC12 tenyészetekben, de gyengítette az MG-132 kezelések által kiváltott maximális jelintenzitást. A p-ERK immunreaktivitás túlnyomórészt a Src-gátolt sejtek citoplazmájában maradt még 6 órás MG-132 kezelés után is.

A sejtek fenotípusos változásait vizsgálva a következő eredményekre jutottunk: kezelés nélkül a PC12 sejtek kerek, esetleg enyhén szögletes morfológiát mutattak. Az MG-132 kezelés előrehaladtával egyre hosszabb nyúlványokat növesztettek, amelyek az első nap végén voltak a leghosszabbak. 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, ugyanakkor 30 perces PP2 előkezelés hatására az MG-132 által kiváltott nyúlványnövekedés már nem volt megfigyelhető. Ebben az esetben a neuritok növekedése még 24 óra elteltével sem volt detektálható.

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 az apoptotikus sejtek arányát próbáltuk meghatározni különböző módszerek alkalmazásával. Első lépésként Hoechst 33342 festést végeztünk, és lézer pásztázó konfokális fluoreszcens mikroszkóppal elemeztük a sejtek magmorfológiáját. A PC12 sejtek magjai 24 órás MG-132 kezelés erejéig többnyire egészséges megjelenést mutattak, azonban 28 vagy 30 órás kezeléseket követően a kromatin kondenzációja és a magfragmentáció egyre hangsúlyosabbá vált a kezeletlen kontrollhoz képest. A kromatin kondenzációját és a magfragmentációt látva apoptotikus változásokat sejtettünk a történések háttérében. A nukleáris elváltozások számszerűsítéséhez mintánként 100 sejtet számoltunk meg, és meghatároztuk az apoptotikus morfológiájú sejtmagok arányát, ami a kezelési idő előreheladtával jelentősen emelkedett.

A fenti morfológiai elemzést áramlási citometriás mérésekkel egészítettük ki. Az Annexin V és propidium-jodid (PI) kombinált alkalmazása megbízható módszer az apoptotikus sejt szám áramlási citometriával történő meghatározására. A PC12 sejteket Annexin V-FITC/PI-vel festettük meg 0, 24, 30 és 48 órás MG-132-kezeléseket követően. Az Annexin V⁺PI⁺ kettős pozitív sejteket, az irodalommal összhangban, késői apoptotikusnak (nem életképesnek) tekintettük. 24, 30 vagy 48 órás MG-132 kezelés után szignifikánsan megnőtt az Annexin V⁺PI⁺ kettős pozitív sejtek aránya.

Végül, annak érdekében, hogy még teljesebbé tegyük a PC12 sejtek apoptotikus változásainak értékelését a hosszan tartó MG-132 kezelés során, sejtéletképességi tesztet is végeztünk a WST-1 sejtproliferációs esszé segítségével. Az élő sejtekben a WST-1 tetrazólium só a mitokondriális dehidrogenázok formazánná alakítják, amelynek mennyisége korrelál a tenyészetben lévő metabolikusan aktív sejtek számával. Megmértük a formazán optikai denzitását (OD) a 0, 24, 30 és 48 órán keresztül MG-132-vel kezelt mintákban. 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.

4. 9. Az MG-132 kezelés hatására bekövetkező Akt-, p38-, JNK-, c-Jun foszforiláció és a kaszpáz-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, közvetítik a sejtek stressz válaszát, vagy akár azok apoptózisához vezetnek. Először az Akt foszforiláció kinetikáját vizsgáltuk, melynek során az MG-132 jelerősödést indukált. A p-Akt jel maximuma 3 órás kezelést követően volt megfigyelhető, ezután intenzitása fokozatosan csökkenő tendenciát mutatott.

A stressz jelátviteli útvonalak szintén fontos szerepet játszanak a különböző sejtípusok, köztük a PC12 sejtek apoptózisának szabályozásában. Így következőnek a p38, valamint a JNK és szubsztrátja, a c-Jun foszforilációját vizsgáltuk MG-132 kezelés hatására. A p38 foszforiláció fokozódása 3-6 órás MG-132 kezelést követően mutatkozott a legkifejezettebbnek, majd 24 órás kezelést követően mérsékelt gyengülése volt megfigyelhető. A JNK aktiválódása már az első 30 perc után nyilvánvaló volt, és az MG-132 kezelés 24 órás időtartamáig még tovább növekedett. Hasonló mintázat volt kimutatható a c-Jun-nál is, aminek a foszforilálatlan változata is ugyanazt az erősödő jelkinetikát mutatta.

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

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy PC12 sejtekben tartós MG-132 kezelés hatására a túlélést közvetítő Akt aktiváció egy 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. 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, illetve annak hiányában. Immunfluoreszcens festést végeztünk ezeknek a fehérjéknek a foszforilált formáit specifikusan felismerő ellenanyagok használatával. Lézer pásztázó konfokális fluoreszcens mikroszkóppal gyakorlatilag nem volt kimutatható p-p38 és p-c-Jun jel a kezeletlen PC12 sejtekben, míg minimális foszforilált JNK immunreaktivitás kezelés nélkül is mutatkozott a citoplazmában. Ezután a jelátviteli fehérjék maximális aktivációjának kiváltására alkalmas MG-132 kezeléseket alkalmaztunk, amelyek 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. 24 órás MG-132 kezelést követően a kezeletlen kontrollhoz képest erősebb p-JNK jel volt megfigyelhető mind a sejtek citoplazmájában, mind pedig a sejtmagokban, míg a p-c-Jun

esetében a kezeletlen kontrollhoz képest jelentősen megnövekedett immun jel szinte kizárólag nukleáris lokalizációt mutatott.

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 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. 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 PC12 sejtekben, ugyanakkor némileg növekedett jelenlétében (bár statisztikailag nem szignifikáns mértékben) a p38 foszforilációja. A szer hatása a JNK és a c-Jun foszforilációjára nézve elhanyagolható volt. Az SB203580 jelzésű p38-inhibitorral végzett előkezelés érdekes módon megakadályozta az MG-132 által kiváltott Akt foszforilációt, és csökkentette az Akt alap aktivitását is, de némileg növelte a p38, JNK és c-Jun fehérjék MG-132 kezelés által kiváltott foszforilációját (igaz, hogy az utóbbi kettőt statisztikailag nem szignifikánsan). 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, de növelte (bár statisztikailag nem szignifikáns mértékben) a p38 alap szintű és MG-132 által indukált foszforilációját is.

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 sejt típusokban, beleértve a PC12 sejteket is, megvizsgáltuk az MG-132 által kiváltott foszforilációs eseményeket a domináns negatív H-Ras mutáns expresszáló PC12 sejt vonalban (M-M17-26) is. Ezek a sejtek MG-132 kezelés hatására nem mutatták a neuronális differenciáció jeleit, valamint bennük már rövidebb kezelést követően megfigyelhetők voltak az apoptotikus változások, mint a vad típusú PC12 sejtek esetében. A neuritogenezis elmaradása ebben a sejt vonalban magyarázható -legalábbis részben- ezen mutánsok gátolt ERK foszforilációjával. 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, a p38 és a JNK alap aktivitása valamivel alacsonyabbnak tűnt az M-M17-26 sejtekben, míg az MG-132 által indukált p38 foszforiláció hasonló mértékűnek bizonyult, mint a vad típusú PC12 sejt vonalban. Érdekes módon a Ras-funkció hiánya csökkentette a JNK, másrészt viszont növelte a c-Jun foszforilációt MG-132 kezelés hatására.

Tehát a Ras-funkció gátlása megváltoztatja egyes általunk vizsgált jelátviteli fehérje alapaktivitását amellet, hogy az MG-132 kezelés által indukált aktivitásfokozódás mértékét is befolyásolja.

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:

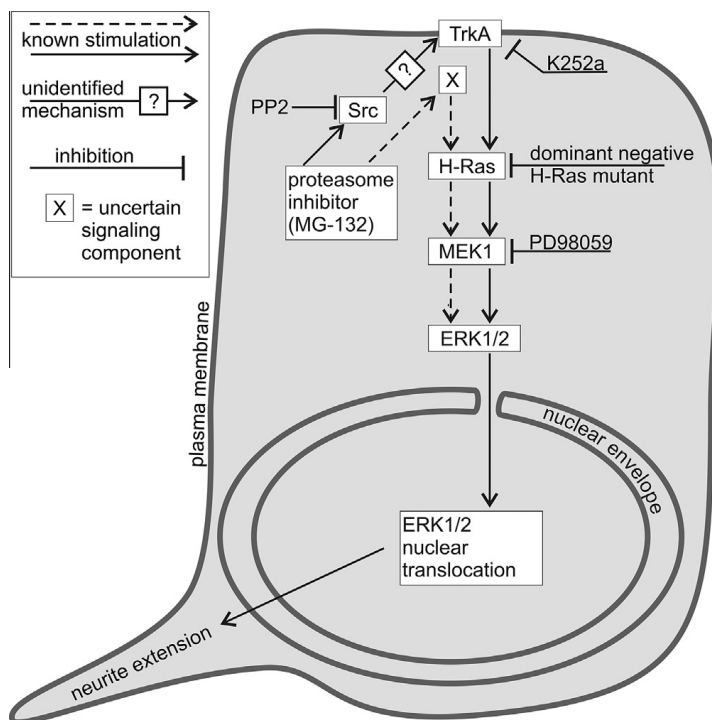
- Az MG-132 által előidézett -és a PC12 sejtek differenciációjában kulcsfontosságú-időben elhúzódó ERK aktiváció Ras és MEK függő folyamatok.
- Az MG-132 kezelés Src és TrkA aktivációt is előidéz PC12 sejtekben, amik szintén szükségesek a proteaszóma gátló által kiváltott neuritnövekedéshez.
- A PC12 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 **4. 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 expresszázó 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 (lásd később a **5. ábrát**).

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. Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy az MG-132 proteaszóma gátlóval végzett kezelés kétfázisú választ indukál PC12 sejtekben: kezdetben neuritogenezist vált ki, de a hosszabb kezelése 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-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. Hasonló változásokat észleltünk a K252a, TrkA-inhibítor előkezelés alkalmazása esetén is.

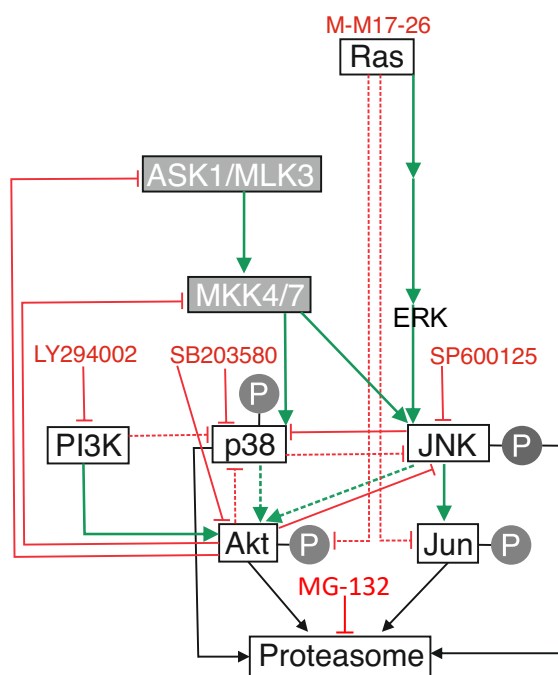
Különböző kináz gátló vegyületek (PP2, K252a, PD98059), valamint a domináns negatív Ras-t expresszáló PC12 (M-M17-26) sejt vonal használatával végzett kísérleteink eredményei alapján összeállítottunk egy jelátviteli modellt az MG-132 által indukált neuritogenezis mechanizmusára PC12 sejtekben (4. ábra).



4. 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 kémiai blokkol függ. A tartós ERK aktivációnak, az ERK nukleáris transzlokációjának és a neuritnövekedésnek is szükséges előfeltétele az ép Src-funkció (melyet a PP2 kémiai gátol), ami viszont a TrkA foszforilációja (ez a K252a vegyülettel gátolható) révén aktiválja az említett útvonalat.

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 (**4. 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 (**4. ábra, szaggatott nyilak**).

A proteaszóma gátló kezelés második szakaszában (24 óra után) inkább az apoptózis jelei domináltak, melynek háttérében a stressz-kinázok (JNK és p38) és a kaszpáz-3 fokozott, valamint a túlélést közvetítő Akt és ERK csökkent aktivitása volt megfigyelhető. A proteaszóma gátló és kináz inhibitor (LY294002, SB203580, SP600125) kezelések kombinálásával, valamint a domináns negatív Ras mutáns expresszáló PC12 (M-M17-26) sejtvonal alkalmazásával feltérképeztük egy komplex szabályozási hálózat részleteit a stressz-kinázok (p38 és JNK) és a túlélésben szerepet játszó jelátviteli molekulák (Akt és ERK) között. A bemutatott kísérleti eredményeink és a vonatkozó szakirodalomból vett további adatok alapján az **5. ábrán** foglaljuk össze ezeknek a kölcsönhatásoknak az általunk javasolt modelljét.



5. 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.

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 háttérének megértését illetően is. Az e téren egyre bővülő ismeretek remélhetőleg szelektivebb 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.

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., Szeberenyi 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., Boldizsar 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., **Tarjányi 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**
- Tarjányi 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., **Tarjányi 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., **Tarjányi O.**, Laszlo A., Lin S.M., Hutás G., Tryniszewska B., Mangold A., Nagyéri 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 (PP1, 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**, Sétáló György Jr and Szeberényi József: *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 (PP1, 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 (PP1, 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 Tarjanyi**, 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 Tarjanyi**, 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 Tarjanyi**, 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 Tarjanyi**, 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 Tarjanyi**, 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.