

# **Az extracelluláris szignál-regulált kináz aktivációja differenciálódó idegsejtekben.**

PhD előbírálati anyag

Készítette: Ifj. Sétáló György

Témavezető: Szeberényi József

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Orvosi Biológiai Intézet

Pécs, 2002

**Tartalom**

<b>Használt rövidítések jegyzéke.....</b>	<b>3</b>
<b>Tudományos háttér.....</b>	<b>5</b>
<b>A témával kapcsolatban felvetett kérdéseink.....</b>	<b>10</b>
<b>Kísérleti anyagok és módszerek.....</b>	<b>11</b>
<b>Eredmények és következtetések.....</b>	<b>13</b>
<b>Az eredmények összefoglalása.....</b>	<b>29</b>
<b>A munka jelentősége.....</b>	<b>30</b>
<b>A munkához felhasznált közlemények.....</b>	<b>32</b>
<b>Az értekezéshez kapcsolódó saját közlemények melléklete megjelenési sorrendben.....</b>	<b>40</b>

### Használt rövidítések jegyzéke

AC, adenilát cikláz

BDNF, agyi eredetű neurotrofikus faktor

B-Raf = a B izoformája a Raf nevű fehérjekináznak

CaMK, kalcium/kalmodulin-függő fehérje kináz

cAMP, ciklikus adenzin monofoszfát

CHX, cikloheximid, egy fehérjeszintézis gátlószer

C-Raf-1 = a c izoformája a Raf nevű fehérjekináznak, melyet Raf-1-nek is neveznek, vagy a két nevet összevonva c-Raf-1-nek

CREB, ciklikus adenzin monofoszfát-érzékeny válasz elem-kötő fehérje

EGF, hám eredetű növekedési faktor

ERK, extracelluláris szignál-regulált kináz

FGF, fibroblaszt növekedési faktor

GA, geldanamycin, a Hsp90-hez kötődő antibiotikum

GAP, GTP-ase activating protein = GTP-áz aktivátor fehérje

GEF, guanine-nucleotide exchange factor = guanin nukleotid kicserélő faktor

Hank's BSS, Hank's balanced salt solution = sóoldat Hank receptje szerint keverve

Hsp90, egy 90 kilodalton molekulatömegű hősokkfehérje

MAP2B, mikrotubulus-asszociált protein 2B

MAPK mitogén-aktivált protein kináz

MBP, mielin bázikus protein, fehérje kinázok aktivitásának mérésére alkalmas, *in vitro* foszforilálható szubsztrát

MEK, mitogen-activated/extracellular signal-regulated kinase kinase = mitogén aktivált/extracelluláris szignál-regulált kináz kináz

NGF, idegsejt növekedési faktor

NT, neurotrofin = idegsejt növekedési faktorok gyűjtőneve

NT-3, egy neurotrofin féleség

NT-4/5, egy neurotrofin féleség

PC12, phaeochromocytoma 12 = patkány mellékvesevelő eredetű sejtvonal 12-es számú klónja

PKA, proteinkináz A

PKC, proteinkináz C

Raf = egy fehérjekináz

Ras = egy GTP-kötő fehérje

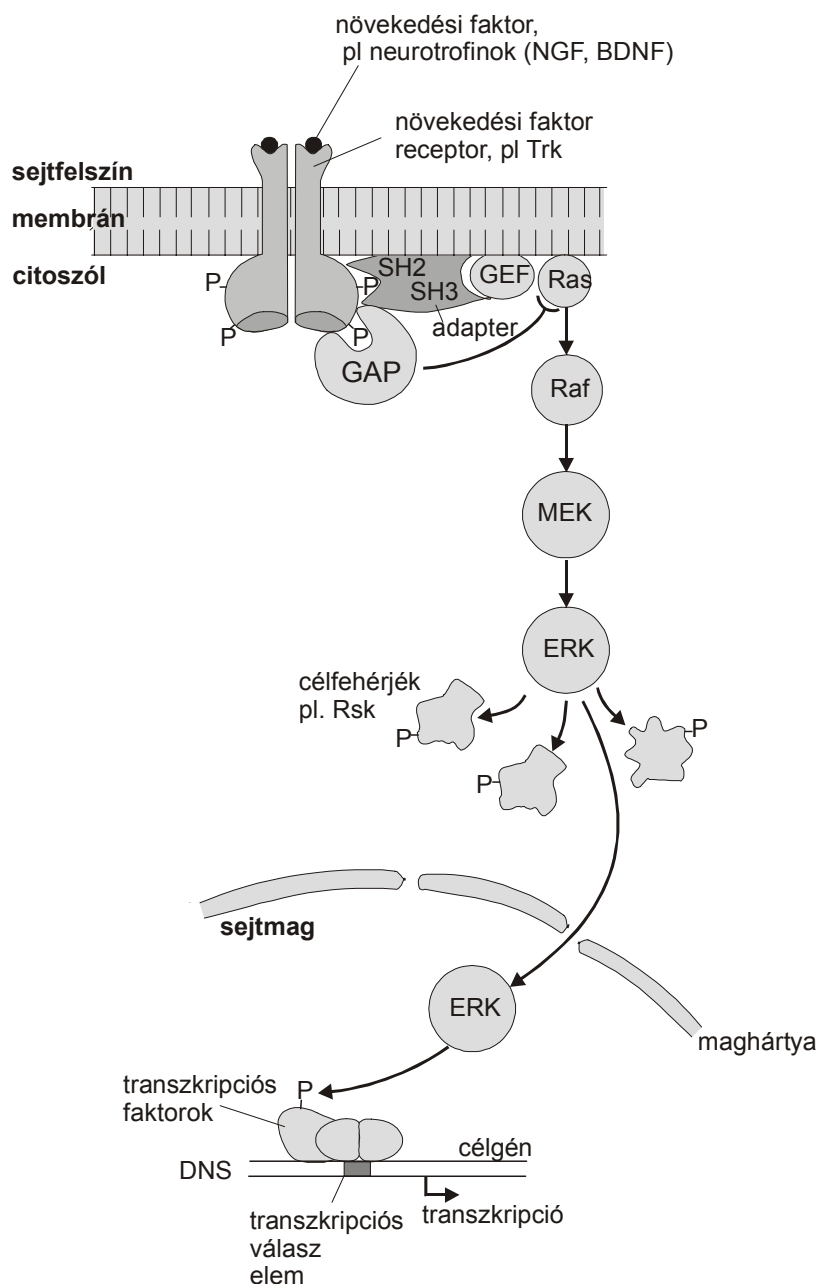
Rsk, riboszómális S6 kináz

SH2 és 3, Src homology 2 és 3 = a Src nevű fehérjekináz 2-es és 3-as doménjeivel homológ szerkezetű fehérjerészek

## Tudományos háttér

### Az extracelluláris szignál-regulált fehérjekináz kaszkád és működése

Az extracelluláris szignál-regulált kinázok (ERK) a mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) családjába tartozó fehérjék. Eukarióta sejtekben megtalálható izoformáik közül a legtöbb figyelmet az 1-es és 2-es izoformák kapták (ERK1 és 2). Ezek az enzimek tipikusan sejtfelszíni, katalitikus aktivitással bíró receptorok ingerületét közvetítik a citoplazma különböző fehérjéi, illetve megfelelő körülmények között a sejtmag felé, egy többlépcsős kaszkád folyamat végrehajtóiként (Szeberényi és Erhardt, 1994) (1. ábra).



1. ábra. A MAPK kaszkád általános sémája

A sejtfelszíni receptorokról a jel először adapter és guanin nukleotid-kötő fehérjéken keresztül, mint például a Ras fehérjék, a Raf fehérjekináz család tagjaihoz jut el. A Raf fehérjék közül a c-Raf-1 izoforma általánosan expresszálódik a legtöbb sejtfeleségben, míg a B-Raf előfordulása korlátozottabb, de az idegrendszer sejtjeiben megtalálható. Működését tekintve a Raf egy szerin/treonin kináz, mely a kaszkádban, az egy szinttel alatta elhelyezkedő mitogén-aktivált/extracelluláris szignál-regulált kináz kináz (MEK) enzimes család tagjait foszforilálja és aktiválja. A MEK-ek számos képviselője közül szintén az 1 és 2 izoforma a legjobban ismertek. Aktivitásukat illetően kettős specificitású kinázok, melyek szubsztrátjukat, az ERK1 és 2-t, treonin és tirozin aminósavakon foszforilálják. Az így aktivált ERK1/2 ezután citoplazmatikus vagy magfehérjéket foszforilál szerinen és treoninon. Ezek közül az egyik a riboszómális S6 kináz (Rsk) fehérje, mely az ERK1/2-általi foszforiláció-/aktivációját követően bejuthat a sejtmagba, s ott transzkripciós faktorok működésének módosításával szólhat bele a génaktivitás szabályozásába (Frodin és Gammeltoft, 1999, Sgambato és mtsai, 1998). A génextpresszió hasonló szabályozására az ERK1/2 közvetlenül is képes, ehhez azonban ezeknek a kinázoknak is át kell helyeződniük a sejtmagba (Davis, 1995, Szeberényi, 1996). Ennek a nukleáris transzlokációként is ismert folyamatnak a pontos mechanizmusa az ERK1/2 esetében még ismeretlen. Különösen érdekes, hogy ezeken az enzimeken nem sikerült azonosítani nukleáris lokalizációs szignált, ami egyéb, sejtmagba bejutni képes fehérjéken jelen van, s azok magba jutását irányítja. Az ERK1/2 sejtmagba jutásának az egyik feltétele az enzim megfelelően elnyújtott időkinetikával történő aktivációja (Qui és Green, 1992, Traverse és mtsai, 1992, Nguyen és mtsai, 1993, Marshall, 1995). A fibroblaszt eredetű (FGF) és idegsejt növekedési faktorok (NGF) képesek az ERK1/2 ilyen jellegű aktiválására, és nukleáris transzlokációjának előidézésére patkány feokromocitóma, PC12 sejtekben. A csak rövidebb ideig tartó, átmeneti ERK-aktivációt előidéző három eredetű növekedési faktorról (EGF) történő kezelést követően az ERK1/2 ugyanebben a sejt típusban a citoplazmában marad. Érdekes módon a kezelések végső kimenetele is teljesen eltérő a kétféle aktivációs kinetikát követően. FGF és NGF hatására a PC12 sejtek szaporodása megáll, majd nyúlványnövekedéssel kísért differenciálódással szimpatikus idegsejtekhez hasonlóvá válnak, míg EGF adására ellenkezőleg, az osztódás fokozódásával reagál, és nem differenciálódik ez a sejt vonal.

A MAPK kaszkád hagyományos, polipeptid növekedési faktorok általi aktivációja mellett az utóbbi időben az enzimpláncolat alternatív serkentési lehetőségeiről is jelentek meg közlemények. Így a munkánk egyik központi témáját képező ösztrogén általi ERK aktivációt is leírták különféle rendszerekben (Endoh és mtsai, 1997, Migliaccio és mtsai, 1996, Singh és mtsai, 1999, 2000, Zhou és mtsai, 1996).

### *A 90 kilodalton molekulatömegű hőszokkfehérje szerepe a szteroid receptor és fehérje kináz jelátvitelben*

A 90 kilodalton molekulatömegű hőszokkfehérje, a Hsp90 egy ubikviter, magas expressziójú, a sejt teljes fehérjekészletének akár 0,5-1%-át is kitevő protein. Funkcióját tekintve a molekuláris "chaperone"-ok közé tartozik, azaz egyéb fehérjemolekulákhoz kapcsolódva, azok normális működőképességéhez az előnyös

térszerkezet fenntartásában segédkezik (Pratt, 1997, Pratt és Toft, 1997, Segnitz és Gehring, 1995).

Szinte valamennyi szteroid receptor működéséhez nélkülözhetelen a receptorhoz asszociált Hsp90. A hősokk fehérje meghatározhatja a receptor sejten belüli elhelyezkedését (Czar és mtsai, 1997, Prima és mtsai, 2000), és azt a ligand fogadására kész konformációban tartja (Bamberger és mtsai, 1997, Picard és mtsai, 1990, Segnitz és Gehring, 1997, Smith és mtsai, 1995, Whitesell és Cook, 1996).

Ezen kívül számos fehérje kinázról is ismert, hogy Hsp90-hez kapcsolt állapotban fordul elő a sejtben (Brugge és mtsai, 1981, Grammatikakis és mtsai, 1999, Hutchinson és mtsai, 1992, Jaiswal és mtsai, 1996, Oppermann és mtsai, 1981, Stancato és mtsai, 1993, Wartmann és Davis, 1994, Whitesell és mtsai, 1994). Ez esetben a Hsp90 a kináz partner stabilitását, illetve helyes többedleges szerkezetének kialakulását és megtartását hivatott biztosítani (Sakagami és mtsai, 1999, Schulte és mtsai, 1995, 1996 és 1997, Stancato és mtsai, 1997).

### *Az ösztrogén neuritogén hatása*

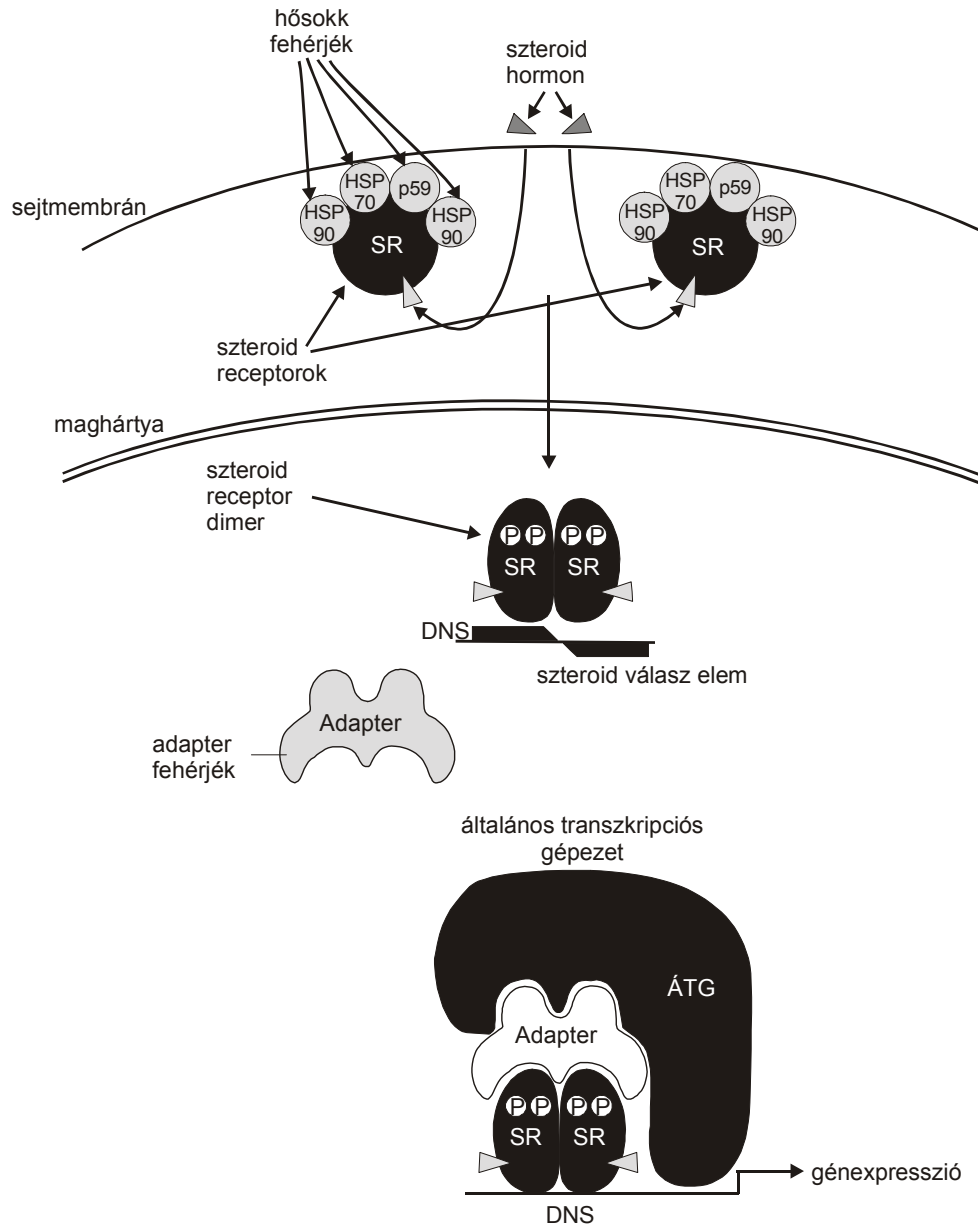
Egér és patkány különféle agyterületeiből, a születést követő korai időszakban készített organotipikus (szelet szerű) idegszövet tenyészetek erősebb nyúlványnövekedést és gazdagabb nyúlványelágazódást mutatnak, ha tenyésztőfolyadékuk 17- $\beta$ -ösztradiolt tartalmaz (Toran-Allerand, 1976, 1980). Az ösztrogén e neuritogén hatása a hetvenes évek vége óta ismert, de a jelenség mögött húzódó molekuláris mechanizmus ma sem teljesen tisztázott. Több, a nyúlványnövekedésben struktúrális szereppel bíró fehérjéről kimutatták, hogy génje ösztrogén érzékeny szabályozó szekvenciát tartalmaz. E transzkripciót módosító hatáson kívül az ösztrogén képes fehérjekinázok működését is befolyásolni (lásd később), melyeknek lehet a neuritogenezissel kapcsolatos szerepe.

### *Az ösztrogén és receptorai a nagyagykéregben*

Több központi idegrendszeri területről tudott, hogy sejtjei ösztrogén receptorokat tartalmaznak (Gerlach és mtsai, 1983, Miranda és mtsai, 1993). Az ösztrogén a szervezetben több formában is jelen van, leghatásosabb változata a 17- $\beta$ -ösztradiol. Bár a nőkben az ösztrogén fő termelődési helye a petefészek, a hormonnak idegsejtekben történő receptorokhoz kötődése és *in vitro* neuritogén hatása nem mutat nemi specificitást. Kisebb mennyiségű ösztrogén hím állatokban is termelődik, ezen felül a szervezetben keringő tesztoszteront az idegsejtek a bennük jelenlevő aromatáz enzim segítségével ösztrogénné képesek alakítani, ami ezt követően a célsejteken belüli ösztrogén receptorokhoz kötődve fejti ki hatását. A klasszikus értelmezés szerint az aktivált, ösztrogént már kötő receptor célpontja a transzkripció szabályozása. E mechanizmus viszonylag lassú, latenciája 20-30 perc, valamint új RNS és fehérje molekulák szintézisét igényli (2. ábra).

Hosszú ideig csak egy ösztrogén receptor volt ismert, néhány éve azonban azonosítottak egy újabb izoformát. A klasszikus, 67 kilodaltonos receptor az alfa, az új, kb. 54 kilodalton molekulásúlyú változat pedig a béta nevet kapta (Kuiper és mtsai, 1996, Mosselman és mtsai, 1996, Ogawa és mtsai, 1998). A két receptor meglehetősen nagy (95%) szekvencia homológiát mutat a DNS-kötő régióban,

kisebb (58%) a hasonlóság a ligand-kötő régióban, a legnagyobb eltérés pedig a transzkripciós apparátussal legközvetlenebb kapcsolatban lévő transzaktivációs doménben van. A két receptor szerkezeti eltérései jól párhuzamba állíthatók azoknak, a különböző ösztrogén származékokra adott, a transzkripció szabályozására kifejtett eltérő hatásaival (Kuiper és mtsai, 1997, Paech és mtsai, 1997).



2. ábra. A szteroidok hatásmechanizmusának általános modellje

Az agykéregben az ösztrogén receptor mRNA expresszió szintjén a béta izoforma dominál a klasszikus, alfa változat felett, ahogy azt in situ hibridizációs vizsgálatok mutatják (Shughrue és mtsai, 1997). Magáról a receptor fehérjéről kevesebbet tudunk megállapítani, főleg az alfa receptor expresszió alacsony foka, és a béta izoformára specifikus, megbízható antitest hiánya miatt. Mindezek ellenére a nagyagykéreg neuronjainak ösztrogénkötő képességét az egyedfejlődés meghatározott, korai fázisában radioaktív liganddal végzett autoradiográfias vizsgálatok egyértelműen igazolták. (Gerlach és mtsai 1983).



### *Ösztrogén-aktivált fehérje kinázok*

Az ösztrogén a transzkripció módosításán felül képes egyéb utakon is kifejteni hatását. A hormon számos ilyen alternatív effektusa fehérje kináz enzimek aktivációján keresztül valósul meg.

Az adenilát cikláz (AC)-ptotein kináz A (PKA), illetve a kalcium/kalmodulin-függő protein kináz (CaMK) rendszer szerepére utalnak azok a megfigyelések, miszerint ovariektomizált állatok bizonyos agyterületein ösztrogén szisztémás adását követően a ciklikus adenosin monofoszfát (cAMP)-érzékeny válasz elem-kötő fehérje (CREB) gyorsan, mintegy 15-30 percen belül foszforilálódik (Zhou és mtsai, 1996, Gu és mtsai, 1996, Murphy és mtsai, 1997).

A protein kináz C (PKC) izoformáinak részvételét támasztja alá a hasonló körülmények közti ösztrogén adását követően észlelt PKC aktivitás növekedés ösztrogén érzékeny agyterületek fehérjekivonatában (Ansonoff és Etgen, 1998).

## A témával kapcsolatban felvetett kérdéseink

Ismerve az ösztrogén fenti, fehérjekinázokat aktiváló, illetve neurit növekedést serkentő képességét, és az ERK idegsejt differenciációban betöltött szerepét, kézenfekvőnek tűnt, hogy megvizsgáljuk, létrejön-e ösztrogén hatására ERK aktiváció az ösztrogénérzékeny agyszövetből készített primer kultúrákban.

Pozitív eredmény esetén:

a.: milyen jelátviteli úton vezet az ösztrogén kezelés ERK aktivációhoz

b.: milyen ösztrogén, vagy egyéb receptor(-ok)-on keresztül hatva fejt ki a hormon ezt a hatását

c.: milyen az organotipikus tenyészetekben ösztrogén kezelésre ERK foszforilációval reagáló sejtek fenotípusa és ezekben a foszforilált ERK nukleocitoplazmatikus eloszlása

## Kísérleti anyagok és módszerek

### *Szövettenyésztés*

A kísérleti állatok (egér vagy patkány) nagyagykérgéből a születésüket követő napon, az agyburkok eltávolítása után 360  $\mu\text{m}$  vastagságú koronális szeleteket készítettünk. Az agy frontális pólusától számított első hat szeletet használtuk kísérleteinkhez. A szeletek bal és jobb felét szétválasztottuk, a nagyagykérgi részeket izoláltuk, majd a frontális pólustól számított 1-3-5, vagy 2-4-6 sorrendben azokat hármassával, kollagénnel bevont fedőlemezekre ültettük ki. Ezt követően a szövetet egy hétig, forgó csőkhálóban tartottuk, 5%  $\text{CO}_2$  légkörben. A szteroid és fenol vörös-mentes tenyésztő médiumot (25% herélt lószérum, 22,5% Hank's BSS, 50% BME, 7.5mg/ml glukóz, 2mM L-glutamin és 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aszkorbinsav) 2 nM 17- $\beta$ -ösztradiollal (Sigma) komplettáltuk a tenyészetek növekedésének optimalizálása végett. A 6. naptól a tenyésztést ösztrogén mentes médiumban folytattuk, majd 24 óra elteltével a tenyészetek áttestek a megfelelő kezeléseken (10nM 17- $\beta$ -ösztradiol, neurotrofinok, mint NGF, BDNF, NT-3, vagy NT-4/5 egymagukban, vagy keverve, komponensenként 100 ng/ml (Intergen), 100 $\mu\text{M}$  PD98059, 5 órás előkezelés (New England Biolabs), 16- $\alpha$ -jodo-17- $\beta$ -ösztradiol (R.B. Hochberg ajándéka, Yale University), genistein (Upstate Biotechnology), 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$  cikloheximid, 1 órás előkezelés (Sigma), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  geldanamycin, 24 órás előkezelés (Calbiochem). Antibiotikumokat a tenyésztési periódusban sosem használtunk. Az összes használt egyéb vegyszer az elérhető legtisztább finomsági fokozatú volt (Fisher, vagy Sigma).

### *Immunprecipitáció és Western blot*

A kultúrákat jéghideg PBS-sel történő öblítést követően lízis pufferben (50mM Tris bázis, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1mM EGTA, 1mM Na-ortovanadát, 5mM  $\text{ZnCl}_2$ , 100mM NaF, 10mg/ml aprotinin, 1mg/ml leupeptin, 1mM PMSF, 1% Triton X-100) homogenizáltuk, vékony (21 G) injekciós tűn történő hússzori áthúzással. Koimmunprecipitációs kísérletek során a detergenst elhagytuk a lízis pufferből. A homogenátumokat 100'000g-vel 4°C-on 15 percig ultracentrifugáltuk, majd meghatároztuk a felülúszó fehérjekoncentrációját (BioRad, detergens kompatibilis esszé kit). A minták kísérletenkénti egyenlő fehérjemennyiségeit azonos (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) koncentrációra állítottuk be, majd immunprecipitáltuk a megfelelő antitesttel (nyúl, nem immun IgG kontroll, B-Raf, MEK 2, ERK 1, ERK 2, Santa Cruz Biotechnology, MEK 1, Upstate Biotechnology, pan-Trk antitest dr. David Kaplan-tól, ER- $\alpha$  antitest az NIH-től (ER715), illetve dr. Margaret Shupnik-től) 1  $\mu\text{g}$ -jával. A precipitátumokat protein A-szefaróz, vagy Dynal immuno-mágneses gyöngyök segítségével gyűjtöttük össze, majd háromszor mostuk lízis pufferben, végül ugyanebben még egyszer, de 0.05% Tween-20 detergens jelenlétében. A precipitátumokat ezt követően Laemmli pufferben felforraltuk, alkotóikat poliakrilamid gélelektroforézissel szétválasztottuk, majd PVDF membránra elektroblottoltuk.

A használt ellenanyagok esetleges nem specifikus kötődését TBS-Tween-ben (10 mM Tris-bázis, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20) oldott 5% zsírmentes tejjel, vagy foszfo-tirozin detektálásakor 3% marha szérum albuminnal blokkoltuk, majd az így előkezelt membránt a megfelelő elsődleges antitesttel (fent említettek, illetve foszfo- ERK, New England Biolabs, Hsp90, Santa Cruz Biotechnology, MEK 1 és MEK 2, Transduction Laboratories, foszfo-tirozin, 4G10-es klón, Upstate Biotechnology), melyet a blokkoló oldatban hígítottunk 1:1000, illetve a MEK 2 ellenanyagot 1: 2500 arányban. A nem specifikusan kötődött antitesttől 5-ször 15 perc TBS-Tween-es mosással szabadultunk meg. A másodlagos, tormagyökér peroxidázzal kapcsolt antitestet (Pierce) blokkoló oldatban, 1:50000 hígításban tettük a membránra, majd TBS-Tween-es mosásokat követően autoradiográfiával detektáltuk a kemilumineszcens (ECL, Amersham) jelet.

A Western blotok hasonlóképp készültek, azonos mennyiségű fehérje lizátumoknak a géltre történő közvetlen töltését követően.

### *Immun kináz esszé*

A B-Raf és MEK esszé kiteket a gyártó (Upstate Biotechnology) utasítása szerint használtuk, a vizsgálandó fehérje fentiek szerinti immunprecipitációját követően. A végső szubsztátként szolgáló mielin bázikus fehérjébe épült foszfor radioaktivitását folyadék szcintillációs számlálással mértük (Searle Model Delta 300)

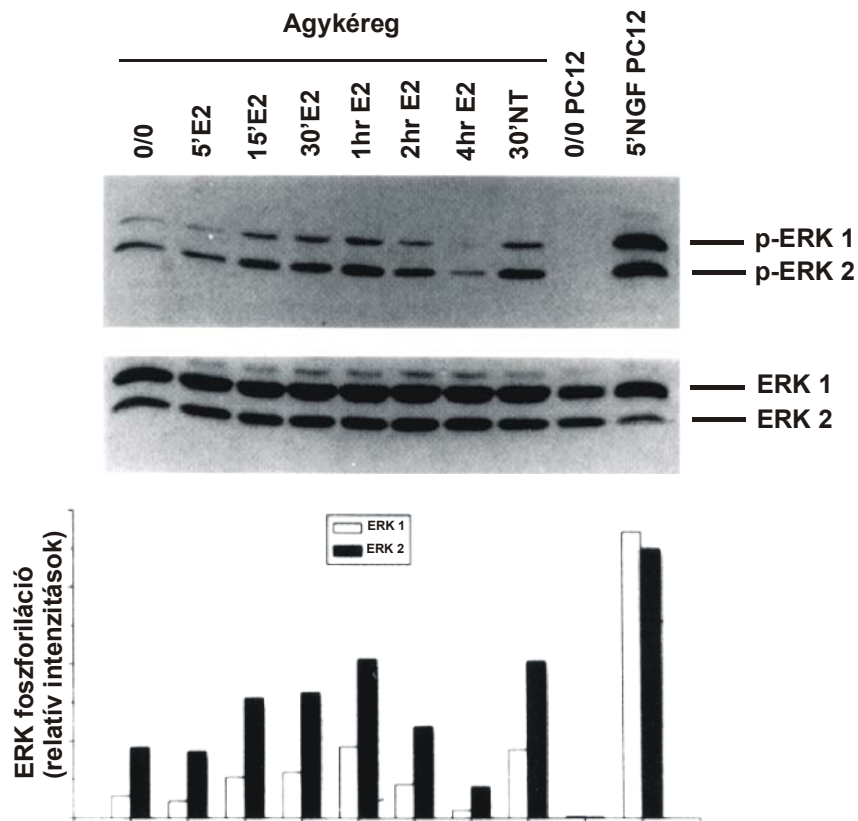
### *Immunhisztofluoreszcens detektálás konfokális mikroszkóppal*

A kezelt tenyészeteket 37 °C-os, pH 7.4-es PBS-sel öblítettük, majd fixáltuk ugyanilyen PBS-ben oldott, és még 2,5% DMSO-t tartalmazó 4%-os paraformaldehiddel. A felesleges fixálószer 3-szori PBS-es, majd 3-szori TBS-es mosással távolítottuk el. A szövet blokkolása 5% zsírmentes tejjel és 10% normál szarv szérum TBS-Triton-os (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 0.5% Triton X-100) oldatában történt, 2,5% DMSO jelenlétében. Az elsődleges antitesteket (foszfo-ERK, New England Biolabs, MAP2B, Transduction Laboratories, ERK 1, ERK 2 és Hsp90, Santa Cruz Biotechnology) a blokkoló oldatban hígítva tartottuk a mintákon 48-72 óráig, 4°C-on, enyhe mozgathatás mellett. A nem specifikus antitestektől 5-szöri TBS-Triton-os mosással szabadultunk meg, majd a blokkoló oldatban hígított másodlagos, antitesttel (Jackson Immunochemicals) történő inkubáció következett. Ismételt TBS-Triton-os mosások után a fluoreszcens festékekkel konjugált antitest(ek)et (Jackson Immunochemicals) adtuk a mintákhoz blokkoló oldatban. TBS-Triton-os mosásokat követően a magokat zöld fluoreszcens festékkel (Sytox, Molecular Probes) jelöltük, majd egy Zeiss Axiovert lézer konfokális rendszerrel gyűjtöttük a minták optikai metszeteit 63x-os vizes immerziós objektívvel.

## Eredmények és következtetések

### Az ösztrogén képes aktiválni az ERK 1/2-t ösztrogén érzékeny agyszövetben

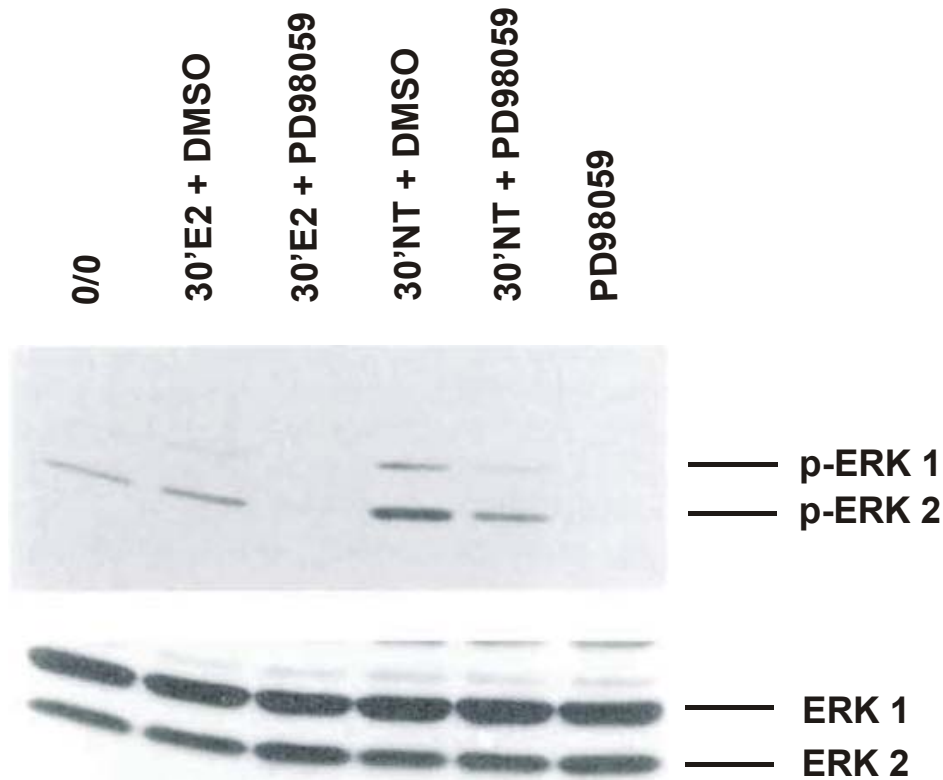
Az agykérgi területekből kiültetett szövetszeleteket 10nM 17- $\beta$ -ösztradiollal kezelve az ERK 1 és 2 aktivitása 15 perc elteltével már jól láthatóan emelkedett a nyugalmi állapothoz képest, egy órával a kezelés után érte el maximális értékét és csak 2 óra elteltével állt vissza az alap szintre (3. ábra). Aktivációja során az ERK 1/2 kettős, treonin és tirozin aminosavakon egyaránt létrejövő foszforiláción esik át, minek következtében az enzim foszfát csoport beépítő kináz aktivitása fokozódik. Az ERK 1/2 aktivitásának mérését célzó, gélben végzett kináz esszé és a foszfo-specifikus ERK 1/2 antitesttel végzett Western blotok eredményei egyaránt az ERK 1/2 gyors és elnyújtott időkinetikájú aktiválódását mutatták. Az ilyen kinetikájú ERK aktiváció a neuronális differenciáción áteső sejtekre jellemző.



3. ábra. Western blot. Az ERK foszforiláció időbeli lefutása 10nM ösztrogén (E2) expozíciót követően, az ERK 1/2 foszforilált/aktív alakjára specifikus antitesttel detektálva. Komponensenként 100ng/ml NGF, BDNF, NT-3, és NT-4/5 keverékével (NT) történt kezelés szolgált rendszerazonos kontrollként, kezeletlen, illetve 100ng/ml NGF- fel kezelt PC12 sejtek pedig módszertani standardként. Az oszlopdiaagram az ERK 1 és 2 aktivitások denzitometriás értékeinek eredményét tükrözi. A középső panel a blot teljes ERK 1/2 tartalmát mutatja, foszforilációtól függetlenül.

### Az ösztrogén általi ERK aktiváció MEK függő

A 17- $\beta$ -ösztradiol fenti hatásának mechanizmusát vizsgálva először az ERK 1/2 enzimek közvetlen aktivátorát, a MEK-et vizsgáltuk közelebbről. A PD98059 nevű, a MEK működését gátló vegyülettel sikerült kivédnünk az ösztrogén által okozott ERK foszforilációt. A szer ugyancsak csökkentette a kontroll neurotrofinok által indukált ERK aktivációt és az ERK alapaktivitását is (4. ábra).

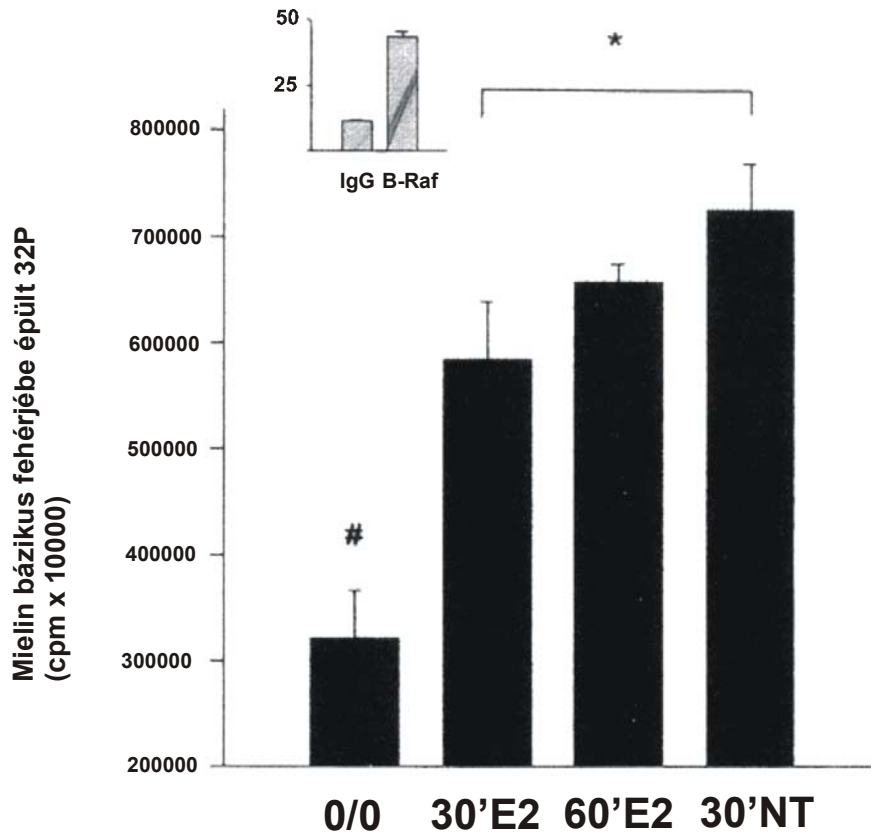


4. ábra. Western blot. 100 $\mu$ M PD98059 MEK- gátló hatása 5 órás előkezelést követően a 10nM ösztrogén (E2) és a neurotrofin kontroll (NT=NGF, BDNF, NT-3 és NT-4/5 keveréke, 100ng/ml komponensenként) által indukált ERK foszforilációra agykérgi tenyészetekben. A blotok az ERK 1/2 foszforilált alakjára specifikus antitesttel (felső panel), majd a teljes ERK 1/2 tartalmat detektálva (alsó panel) készültek.

### Az ösztrogén aktiválja a B-Raf enzimet

Logikus lépésnek látszott a MEK felett elhelyezkedő Raf enzimes család szerepének vizsgálata is az ösztrogén általi ERK aktiváció folyamatában. Az elvégzett immun-kináz esszé tanúsága szerint a B-Raf izoforma aktivitása jelentősen emelkedett az egyórás ösztrogén kezelés hatására (5. ábra). Ez a Raf izoforma a fontosabb az idegsejtek differenciálódásához, szemben a c-Raf-1-gyel, melynek általánosabbak a funkciói, s mely alak nem is aktiválódott az ösztrogén, csak a kontroll neurotrofin kezelés hatására (Toran-Allerand, 2000).

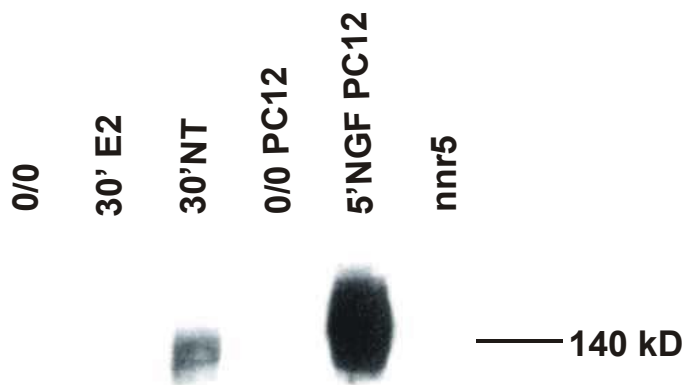
## B-Raf kináz aktivitás



5. ábra. B-Raf immunkináz esszé. 10nM ösztradiol (E2), illetve a neurotrofin (NT=NGF, BDNF, NT-3 és NT-4/5 keveréke, 100ng/ml komponensenként) kontroll hatása a B-Raf kináz aktivitására agykérgi tenyészetekben. A diagram az esszé során a mielin bázikus proteinbe, mint végső foszfát akceptorba beépült foszfor radioaktivitását tükrözi. Az inszet a normál IgG-vel, illetve a B-Raf specifikus antitesttel végzett precipitációt követően nyert aktivitásokat mutatja. A statisztikai analízis során ezt a nem specifikus aktivitást levontuk a fajlagos savóval kapott értékekből (#, valamennyi kezelt mintától különbözik,  $p < 0,05$ ; \*, a 30'E2 és 30'NT minták közti különbség,  $p < 0,05$ ).

### *Ösztrogén hatására nem foszforilálódik a Trk neurotrofin receptor*

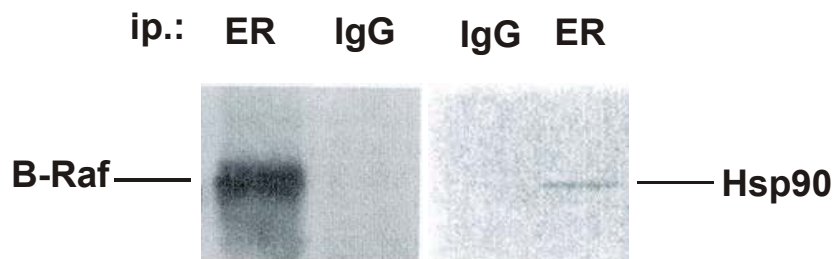
Ezeknek a típusosan neurotrofin-aktivált jelátviteli elemeknek az ösztrogén általi stimulációja láttán felvetődött a kérdés, vajon lehetséges-e, hogy az ösztrogén hatására endogén neurotrofinok szabadulnak fel a kultúrából, s ennek eredményeként aktiválódik az ERK kaszkád. Ha ez így történne, akkor a felszabaduló neurotrofinoknak először aktiválniuk kellene receptorukat a Trk fehérjét. E folyamat során a Trk tirozin oldalláncokon foszforilálódik. A kezeléseken átesett tenyészetekből immunprecipitáltuk a Trk receptort, és a precipitátumot foszfortirozinra specifikus antitesttel teszteltük. Az alapszintet meghaladó tirozin foszforilációt csak a kontroll, neurotrofinnal kezelt tenyészetekben láttunk, az ösztrogénnel kezelt mintákban nem (6. ábra). Ezzel kizárhattuk az endogén neurotrofinokat az ösztrogén általi ERK aktiváció hátterében.



6. ábra. A Trk receptor foszforilációjának vizsgálata 10nM ösztrogén, illetve a neurotrofin (NT=NGF, BDNF, NT-3 és NT-4/5 keveréke, 100ng/ml komponensenként) kontroll hatására agykérgi kultúrákban (balról 1-3 sávok). Kezeletlen, vagy 100ng/ml NGF-fel kezelt (balról 4-5 sávok), illetve a Trk receptort nem tartalmazó nnr-5 nevű variáns (jobb szélső sáv), PC12 sejtek szolgáltak további módszertani kontrollokként. A módszer a Trk receptor immunprecipitációját követő Western blot volt foszfortirozinra specifikus antitesttel.

#### *A B-Raf komplexet alkot az ösztrogén receptor $\alpha$ -val és a Hsp 90-nel*

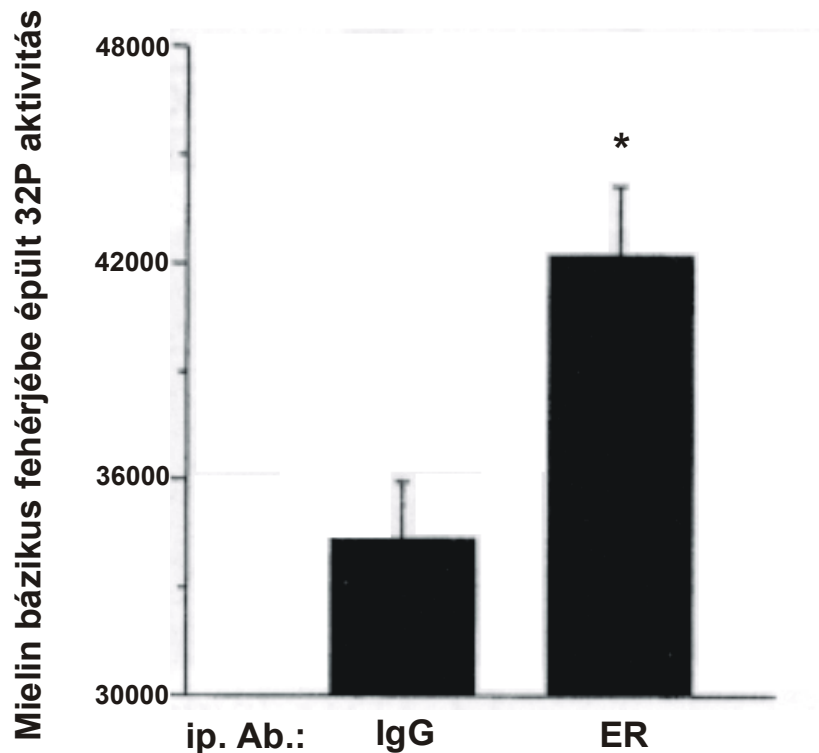
A továbbiakban azt kutattuk, mely ponton kapcsolódhat be az ösztrogén által beindított jelátvitel az ERK kaszkád láncolatába. Egymást aktiváló molekulák gyakran alkotnak preformált komplexeket a sejtben. Megfelelő módszerekkel fizikai kapcsolatuk kísérletesen is kimutatható. Ko-immunprecipitációs technikával azt vizsgáltuk, hogy az ERK kaszkád mely elemei alkotnak esetleg komplexet az ösztrogén receptorral. Vizsgálataink idején az ösztrogén receptorok közül még csak a klasszikus, alfa változat elleni antitest volt kereskedelmileg elérhető. Ezzel az ellenanyaggal sikerült ko-immunprecipitálnunk az ösztrogén receptor  $\alpha$ -t és a B-Raf-ot, valamint a Hsp90-et, mely utóbbiról már korábban kimutatták, hogy külön-külön a komplex mindkét másik tagjához kapcsolódva található a sejtben (7. ábra).



7. ábra. Az  $\alpha$ -ösztrogén receptor sejtben belüli kapcsolódása a B-Raf-fal és a Hsp90-nel agykérgi tenyészetekben. Az  $\alpha$ -ösztrogén receptorra specifikus ER715 antitesttel (ip. :ER) gyűjtött precipitátumokban detektálni tudtuk a B-Raf, és Hsp90 fehérjéket, míg a normál IgG antisavó használata esetén (ip. :IgG) egyik fehérje sem volt jelen az immuncsapadékban. Az alkalmazott technika ko-immunprecipitációt követő Western blot volt a jelzett antitestekkel.



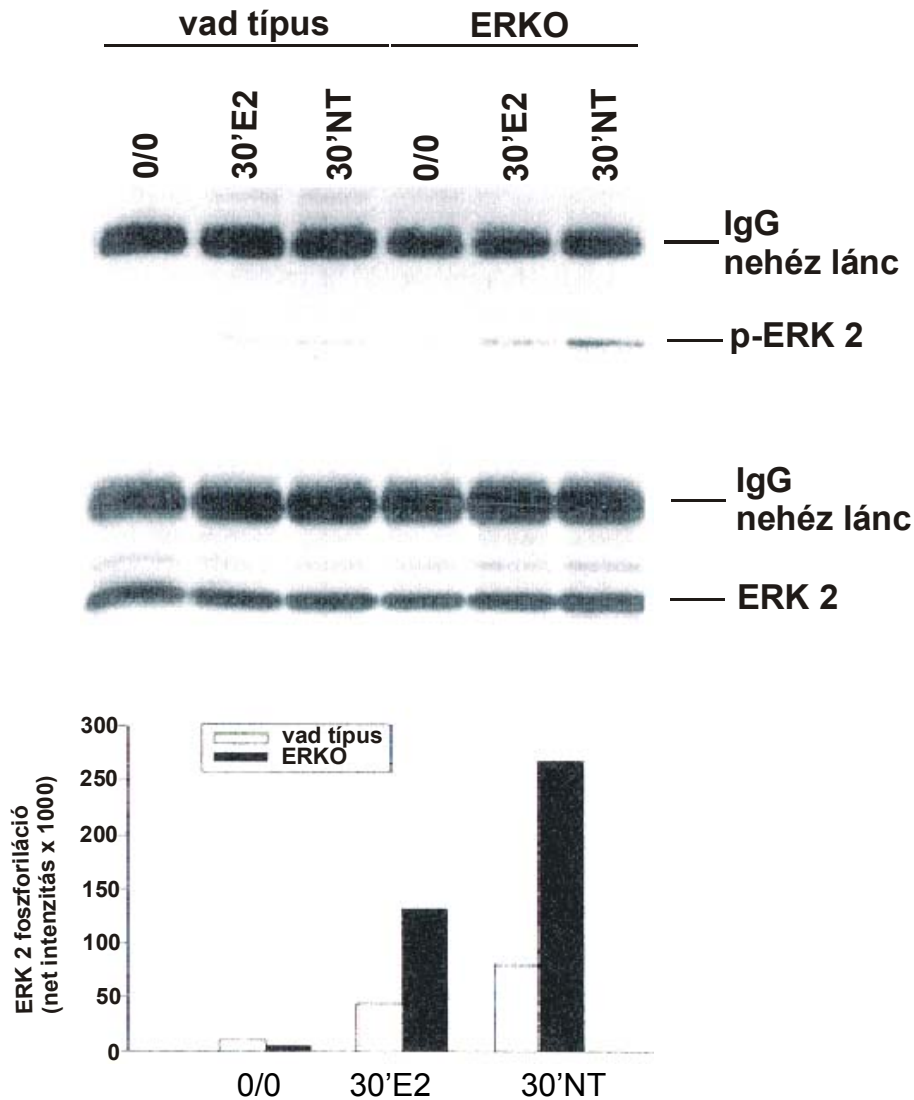
Ez a molekuláris "csomópont" tetszetős lehetőségként kínálta magát az ösztrogén jelátvitel és az ERK kaszkád kapcsolódására. Az  $\alpha$ -ösztrogén receptor és a B-Raf kapcsolódásának tényét megerősítette az a megfigyelés is, miszerint az  $\alpha$ -ösztrogén receptorra specifikus antitesttel gyűjtött precipitátumok B-Raf aktivitása szignifikánsan magasabb volt, mint ugyanez az aktivitás nem immun savó használata esetén (8. ábra).



8. ábra. Immun kináz esszé. Az  $\alpha$ -ösztrogén receptorra specifikus antitesttel (ip. Ab.: ER) agykérgi szövettenyészetekből gyűjtött precipitátumok B-Raf aktivitása szignifikánsan magasabb volt, mint ugyanez az aktivitás normál savó használata (ip.Ab.: IgG) esetén.

#### *Ösztrogén általi ERK aktiváció ösztrogén receptor- $\alpha$ kiütéses mutáns egér szövetben*

Az ösztrogén általi ERK aktivációért felelős szteroid receptor azonosítása céljából megismételtük az ERK aktivációs esszéket olyan egér agykéreg kultúrákon is, melyek a klasszikus, alfa ösztrogén receptor génje nem működött. Nagy meglepetésünkre az ösztrogén ezekben a tenyészetekben is aktiválta az ERK-et, s az aktiváció mértéke még jelentősen meg is haladta a vad típusú kultúrákban tapasztaltat. (9. ábra) Ez az eredmény megkérdőjelezte azt, a ko-immunprecipitációs kísérletekből merített elméletünket, mi szerint az alfa ösztrogén receptor B-Raf-fal alkotott komplexe közvetítené az ösztrogén-általi ERK aktivációt.

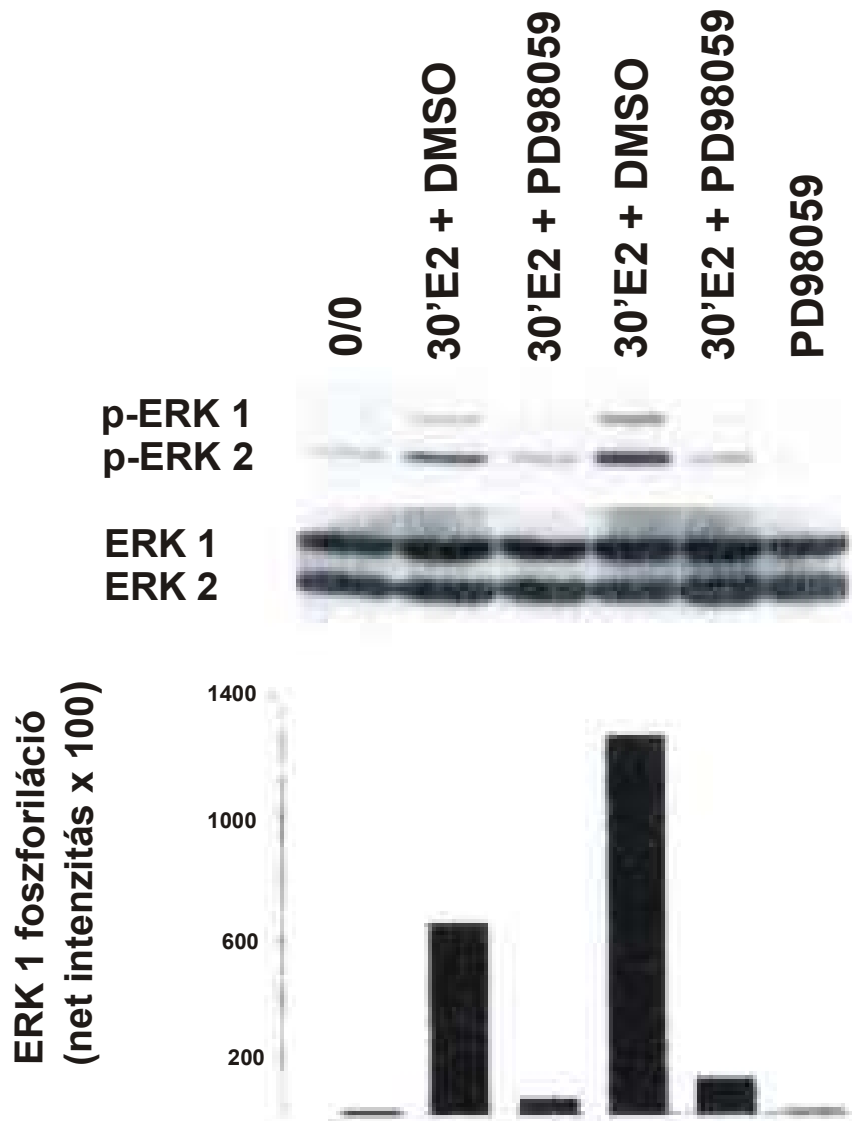


9. ábra. Ösztrogén (E2) általi ERK foszforiláció az  $\alpha$ -ösztrogén receptor génjüktől megfosztott mutáns egerekből (ERKO) készült agykérgi tenyészetekben. Bár mind a mutáns, mind a vad típusú szövetben észleltük az ERK aktivációját jelző foszforilációt, annak mértéke a mutáns szövetben jelentősen erősebb volt. Kontrollként mindkét szövetfeleségből neurotrofin keverékkel (NT=összetevőkként 100ng/ml NGF, BDNF, NT-3 és NT-4) kezelt minták szolgáltak. A sávok erősségének intenzitásbeli különbségeit az alsó oszlopdiaagram szemlélteti. Módszertani kontrollként a blottok teljes ERK tartalmát is megvizsgáltuk (középső panel). Az alkalmazott eljárás az ERK2 immunprecipitációját követő Western blot volt a jelzett antitestekkel.

*Az ösztrogén receptor- $\alpha$  hiányos szövetben lezajló ERK aktiváció is a B-Raf-MEK útvonalon halad*

Egyéb vonatkozásaiban a vad típusú szövetben tapasztaltakhoz hasonlított az  $\alpha$ -ösztrogén receptor génjüktől megfosztott mutáns egerekben mérhető ERK aktiváció is. Ebben a rendszerben szintén gátolni tudtuk a folyamatot a MEK kémiai inhibitorának alkalmazásával (10. ábra), és a B-Raf aktivációja is jól megfigyelhető volt ösztrogén hatására a hiányzó alfa receptor ellenére (11. ábra)

# ERKO

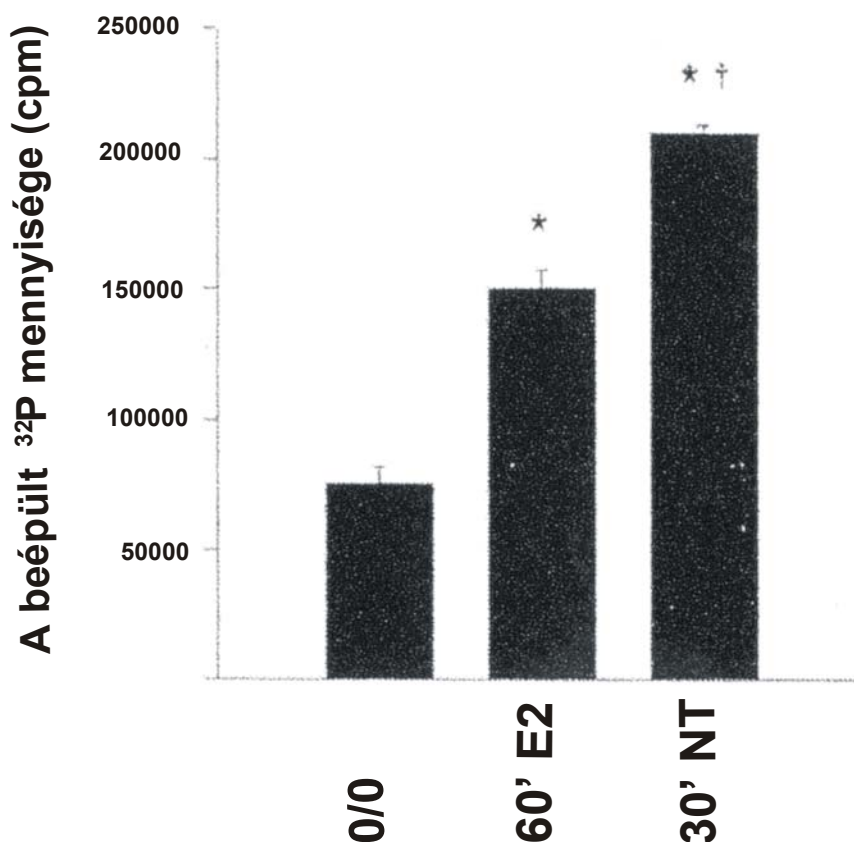


10. ábra. A 10nM ösztrogén (E2) általi ERK aktivációt az  $\alpha$ -ösztrogén receptor génjüktől megfosztott mutáns (ERKO) egerekből készült agykérgi tenyészetekben is gátolta a PD98059 MEK inhibitor (5 órás előkezelés, 100 $\mu$ M inhibítorral). A sávok erősségének intenzitásbeli különbségeit az alsó oszlopdiagram szemlélteti. Módszertani kontrollként a blottok teljes ERK tartalmát is megvizsgáltuk (középső panel). Az alkalmazott módszer Western blot volt, az ábrán jelzett fehérjékre specifikus antitestekkel.

Az ERK aktiváció vizsgálata alfa, illetve béta ösztrogén receptor specifikus ligandokkal

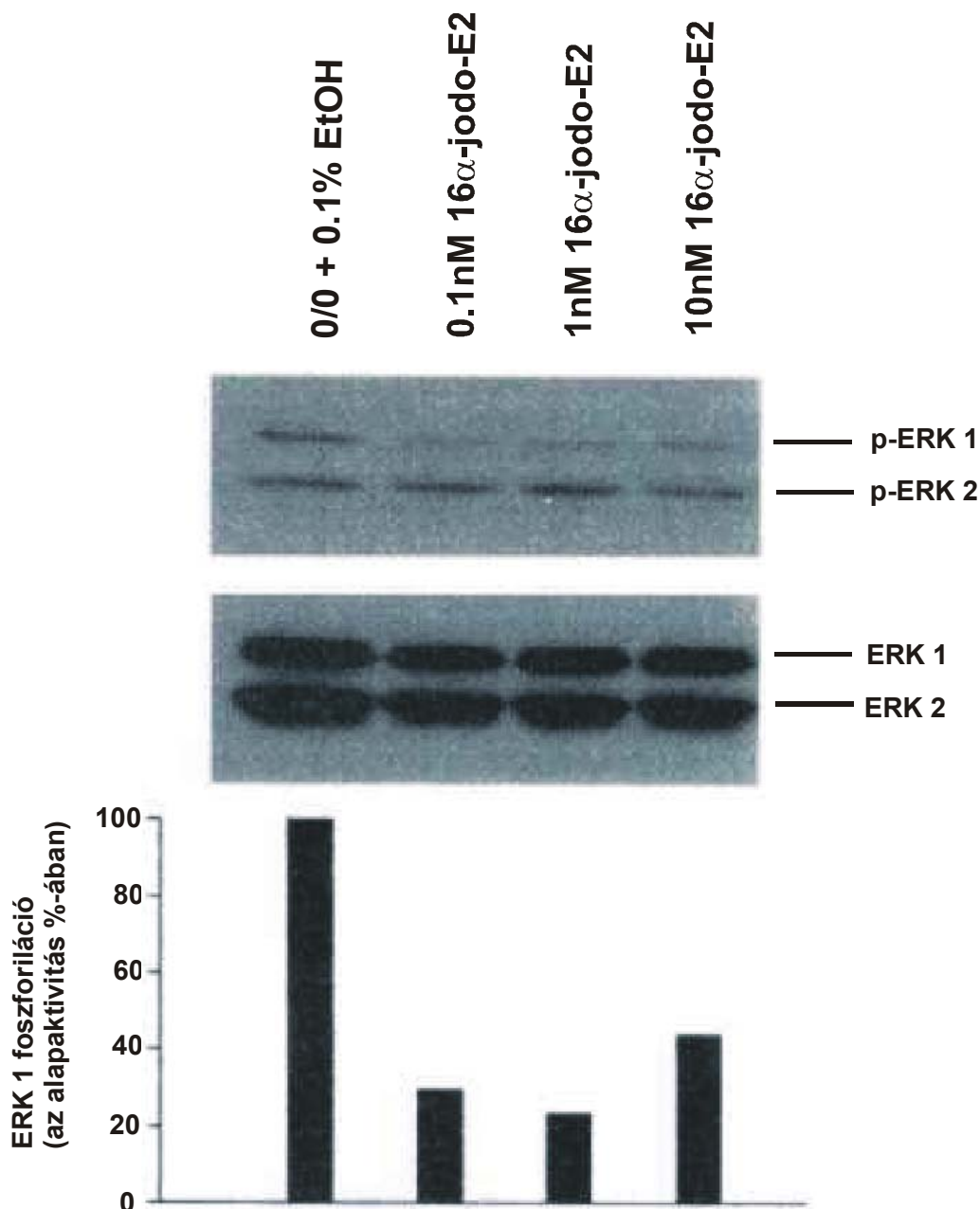
Az alfa és béta ösztrogén receptorok szerepének további elemzése céljából olyan ösztrogén származékokkal is megvizsgáltuk az ERK aktiválhatóságát, melyek specifikusan csak az egyik ösztrogén receptor típusához kötődnek.

# ERKO



11. ábra. Immun kináz esszé. A B-Raf kináz aktivációja az  $\alpha$ -ösztrógen receptor génjüktől megfosztott mutáns (ERKO) egerekből készült agykérgi tenyésztékben 10nM ösztrogén (E2), illetve neutrofin keverék (NT= összetevőnként 100 ng/ml NGF, BDNF, NT-3 és NT-4) adását követően 60 perccel (\* $p \leq 0.05$ , # $p \leq 0.05$ ).

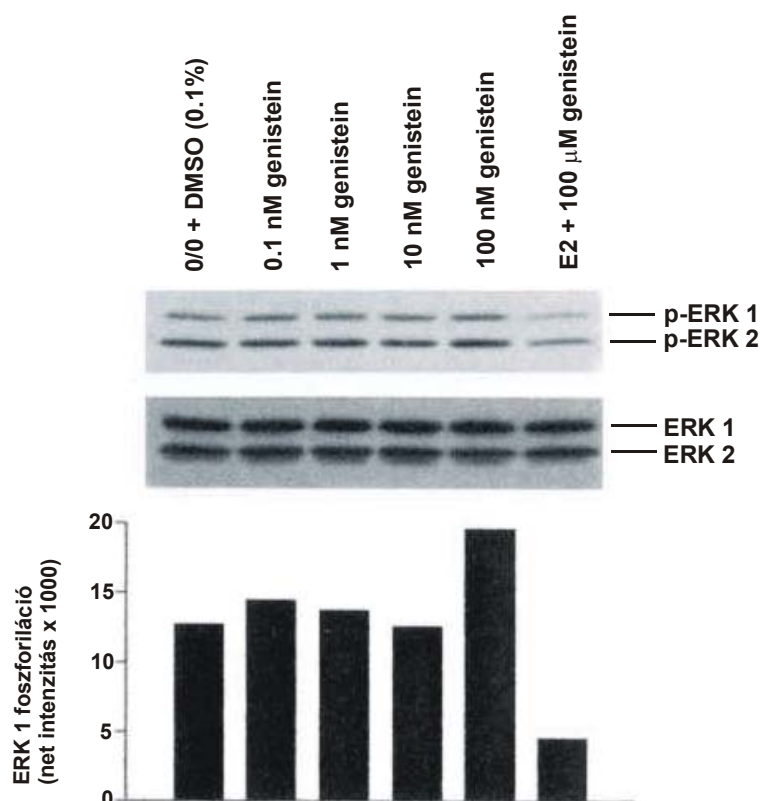
A 16-alfa-jodo-17-béta ösztradiol kellően alacsony koncentrációban (10nM, vagy az alatt) adva csak az alfa ösztrogén receptorhoz kötődik (Shughrue és mtsai,1999). Ilyen feltételek mellett nem tapasztaltunk ERK aktivációt a vad típusú agyszövetből készített explantátumokban. Mi több, az alfa receptor szelektív stimulációját követően az ERK foszforiláció enyhe csökkenését kaptuk (12. ábra). Ez a megfigyelés, az alfa ösztrogén receptor-hiányos egerekben látott erőteljesebb, ösztrogén-indukált ERK foszforilációval együtt, érdekes módon azt sugallja, hogy a klasszikus ösztrogén receptor szerepe az ösztrogén általi ERK aktiváció során inkább gátló jellegű.



12. ábra. ERK foszforiláció vad típusú egerekből készült agyszövetben 16α-jodo-17β-ösztadiol adását követően, a vivőanyagként használt etanollal (EtOH) kezelt kontrollhoz képest. A sávok erősségének intenzitásbeli különbségeit az alsó oszlopdiagram szemlélteti. Módszertani kontrollként a blottok teljes ERK tartalmát is megvizsgáltuk (középső panel). Az ábra Western blot eredményét mutatja, a jelzett fehérjékre specifikus antitestekkel történt detektálás után.

Hasonlóan kis koncentrációban (10nM, vagy az alatt) alkalmazva egy másik ligand, a genistein csak a béta ösztrogén receptor változathoz kötődik (Witkowska és mtsai, 1997). Ilyen feltételek mellett genistein hatására azonban ERK foszforiláció változást vad típusú agyszövetből készített kultúráinkban nem tapasztaltunk. A genistein nagyobb koncentrációját (100μM) ösztrogénnel együtt adva a genistein közismert, foszforilációt gátló hatása érvényesült (13. ábra). Ez a

megfigyelés ellene mond annak a lehetőségnek, miszerint az ösztrogén általi ERK foszforiláció serkentését a béta ösztrogén receptor közvetítené.



13. ábra. ERK foszforiláció vad típusú egerekből készült agyszövetben genistein adását követően, a vivőanyagként használt DMSO-val kezelt kontrollhoz képest. Az ábra Western blot eredményét mutatja, a jelzett A sávok erősségének intenzitásbeli különbségeit az alsó oszlopdiagram szemlélteti. Módszertani kontrollként a blottok teljes ERK tartalmát is megvizsgáltuk (középső panel).

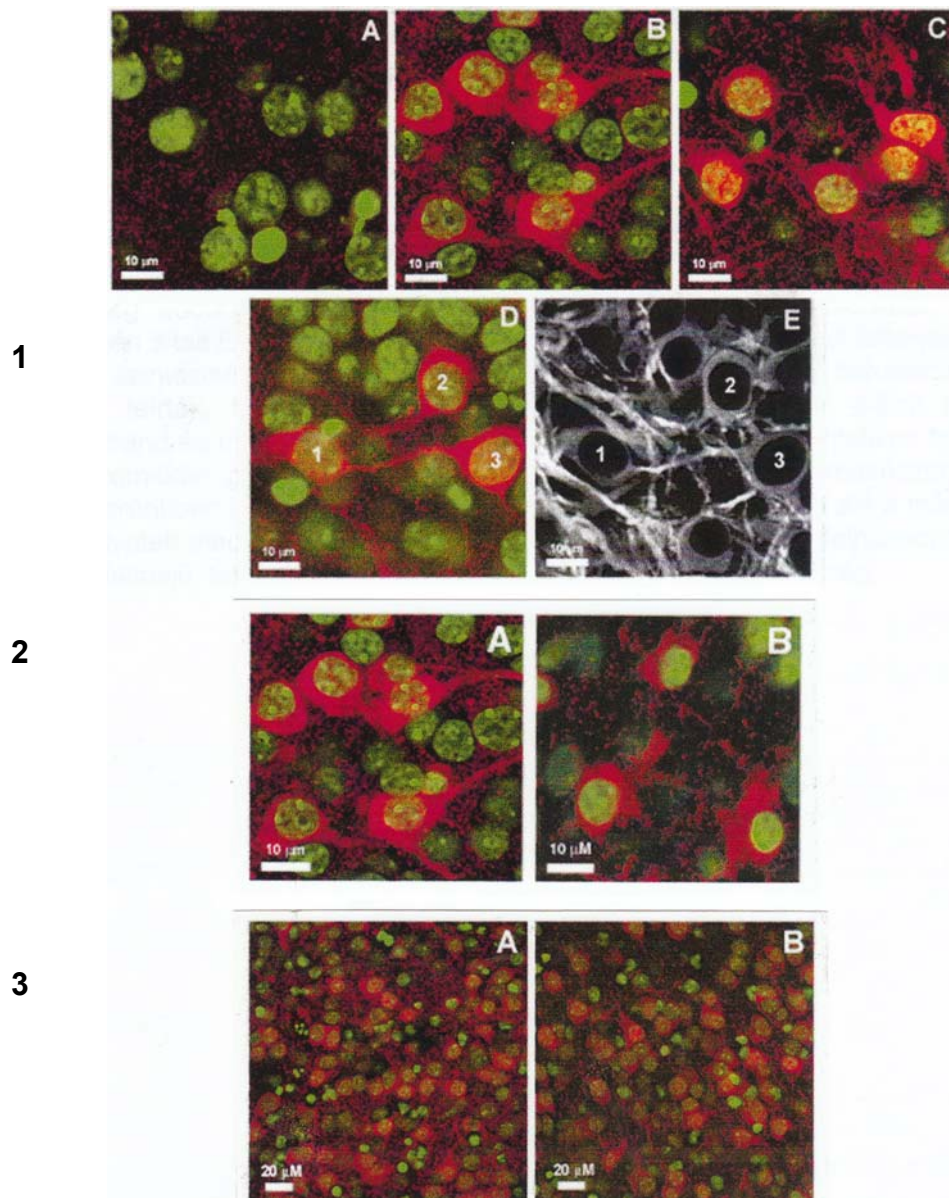
A fenti eredmények tükrében nem mondhatunk bizonyosat az ösztrogén által kiváltott ERK foszforilációt közvetítő receptor azonosságát illetően. Eddig még azonosítatlan receptor, vagy alternatív mechanizmus, esetleg direkt, membrán hatás tűnik a legvalószínűbb lehetőségnek.

#### *Az ösztrogén-indukált foszfo-ERK sejten belüli megoszlása*

Eddigi vizsgálataink során a kapott eredmények mindegyikét csak az organotipikus tenyészetek egészére vonatkoztatva írtuk le. A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a foszforilált ERK milyen eloszlásban található a kultúrák egyes reagáló sejtjeiben az ösztrogén kezelést követően. A foszforilált ERK sejten belüli megoszlásának ugyanis meghatározó jelentősége lehet az ERK aktiváció végső következményeit illetően. A PC12 sejtvonalon az ERK aktív alakjának citoplazmatikus felhalmozódását a sejtosztódás fokozódása követi, míg ugyanebben a rendszerben a nukleárisan megjelenő foszfo-ERK szignált a neuronális differenciáció fontos kezdeti lépésének tekintik.



Az agykérgi eredetű szelet kultúrákban, ösztrogén kezelést követően, a foszfo-ERK jelet a reagáló sejtek citoplazmájában, nyúlványaiban és magjában egyaránt megtaláltuk (14. ábra, 1B és D). A kontroll neurotrofin kezelés hatására a foszfo-ERK ugyanilyen eloszlásban volt észlelhető ebben a sejttypusban (14. ábra, 1C).

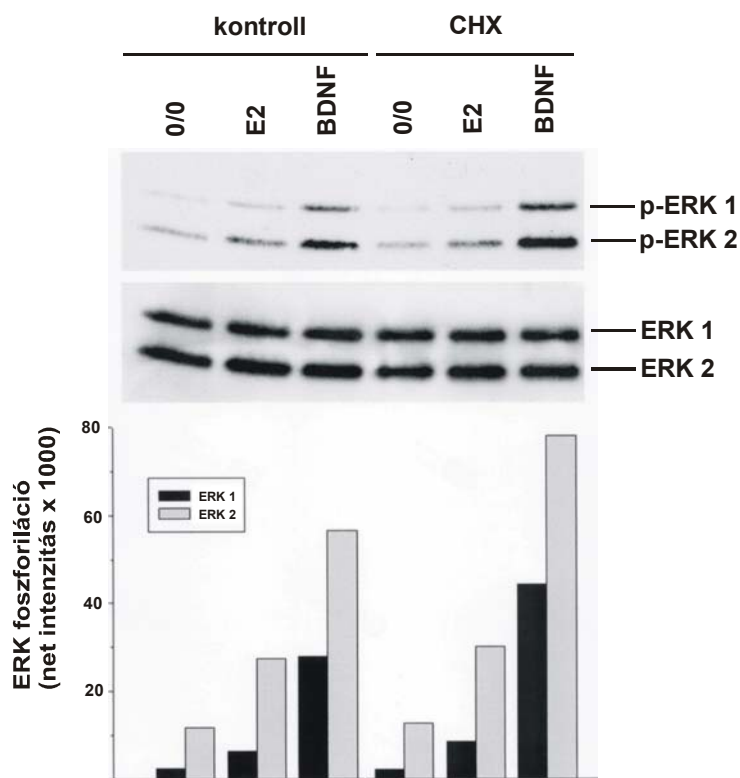


14. ábra. Immunfluoreszcens mikroszkópiával a foszfo-ERK (vörös) sejtben belüli megoszlása kezeletlen kultúrákban (1A), valamint ösztradiol (E2, 10nM, 60 percig, 1B, 1D és 2A), neurotrofin (BDNF, 100 ng/ml, 60 percig, 1C és 3A), cikloheximid (CHX, 30 μg/ml, 2 óráig) és ösztradiol (2B), valamint geldanamycin (GA, 1μg/ml, 24 óráig) és BDNF (3B) kombinált adását követően. A foszfo-ERK-et tartalmazó sejtek neuronális eredetéről a sejtek MAP2B pozitivitása (1E) útján győződünk meg (vö. 1D-vel, 1D és 1E számozott sejtjei azonosak). A magok zöld színnel jelöltek, a vörös és a zöld együttes jelenléte narancssárgának látszik.

Az ösztrogén adására ERK foszforilációval reagáló sejtek neuronális eredetét a Mikrotubulus-Asszociált Protein 2B-vel történő festődésük igazolta (14. ábra, 1D és E). Az a tény, hogy ösztrogén hatására ugyanolyan sejten belüli eloszlásban jelentkezett a foszforilált ERK, mint egy ismertén idegsejt differenciációt előmozdító neurotrofin hatására, az ösztrogén neurotrofikus potenciálját látszik alátámasztani az általunk vizsgált ösztrogénre érzékeny idegsejttípusokban.

Az egyedi sejt szintjén a foszfo-ERK jelek erőssége összemérhető volt az ösztrogén, illetve neurotrofin kezelést követően. A fő különbség a reagáló idegsejtek számában mutatkozott, mely sokkal nagyobb volt a neurotrofin kezelést követően. Ez a megfigyelés egybevág azzal a korábban már észlelt jelenséggel, miszerint a Western blottokon is rendre erősebb foszfo-ERK jelet kaptunk a neurotrofinnal kezelt pozitív kontrollban, mint az ösztradiollal kezelt mintában.

Az aktív ERK sejten belüli megoszlásával kapcsolatban újabb érdekes lehetőség adódott abból a Western blottokon tett megfigyelésünkből, hogy az ösztrogén általi ERK foszforiláció folyamata függetlennek bizonyult fehérjék újonnan történő szintézisétől (15. ábra). Az aktív ERK sejtmagban történő felhalmozódásáról viszont leírták, hogy az nem jön létre fehérje szintézisükben gátolt sejtekben (Lenormand és mtsai, 1998). Ha a szelet tenyészetek fehérjeszintetikus folyamatait cikloheximiddel gátoltuk, a sejtmagban történő foszfo-ERK felhalmozódás a mi rendszerünkben is elmaradt (14. ábra, 2A és B). Ez alátámasztja azt a más szerzők által felvetett mechanizmust, miszerint az ERK sejtmagon belüli felhalmozódásához rövid életidejű, fehérje természetű rögzítő faktorokra lenne szükség.



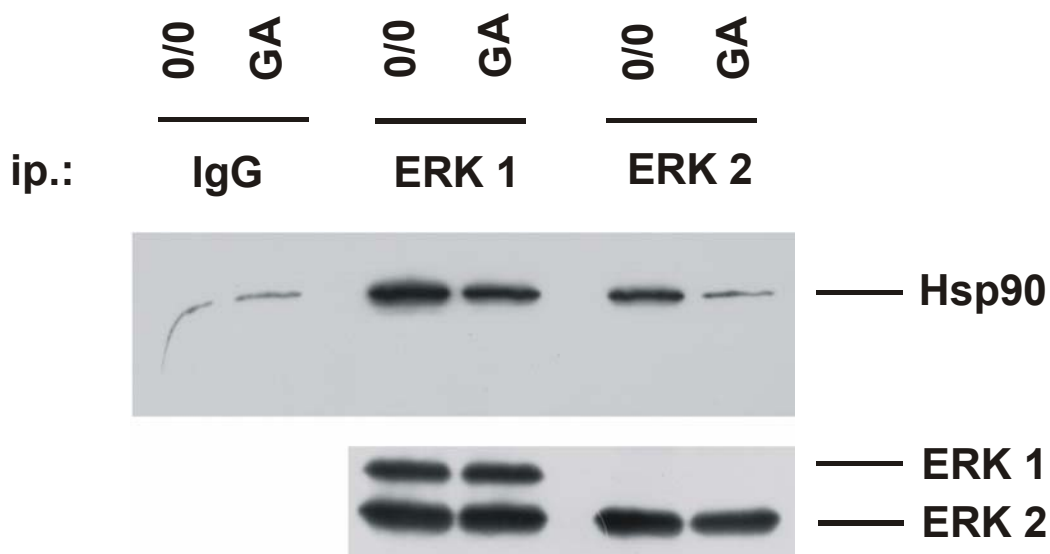
15. ábra. Western blot, a jelzett fehérjékre specifikus antitestekkel detektálva. Ösztrogén (E2, 10nM, 60 percig) és neurotrofin (BDNF, 100 ng/ml, 60 percig) kezelést követő ERK foszforiláció a fehérjeszintézis cikloheximiddel (CHX, 30 µg-ml, 2 óráig) történt gátlása után, vad típusú egér agykérgi tenyészetekben. A sávok erősségének intenzitásbeli különbségeit az oszlopdiagram szemlélteti. Módszertani kontrollként a blottok teljes ERK tartalmát is megvizsgáltuk (középső panel).



### Az ERK komplexet képez a Hsp90-nel

Azon kísérleteink során, melyekkel egy ösztrogén általi ERK aktivációt közvetíteni képes makromolekuláris komplexet próbáltunk azonosítani, megfigyeltük, hogy az ERK 1 és 2 is ko-immunprecipitálódtak a Hsp90-nel. Az ERK 1, illetve 2-re specifikus antitesttel gyűjtött csapadékok lényegesen több Hsp90-et tartalmaztak, mint az azonos fajú, nem-immun savóval kicsapott kontroll (16. ábra). Ez a megfigyelés az ERK1/2 és a Hsp90 sejten belüli kapcsolódására utal.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy az ezzel a chaperone-nal való kapcsolatnak milyen szerepe lehet az ERK sejten belüli funkcióira nézve.



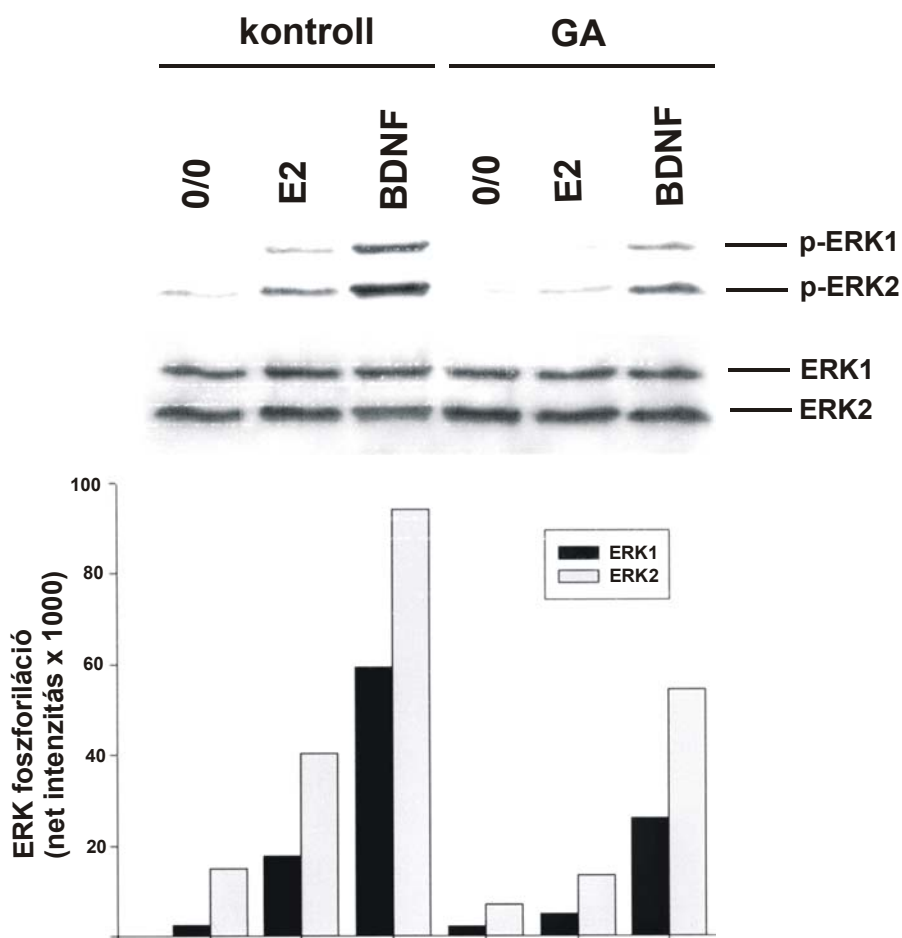
16. ábra. Ko-immunprecipitációt követő Western blot. Az ERK 1 és 2 ko-immunprecipitálódnak a Hsp90-nel. A kezeltlen (0/0) mintákból az ERK 1 és 2-re specifikus antitestekkel gyűjtött csapadék lényegesen több Hsp90-et tartalmazott, mint az azonos fajú, normál savó használata esetén. A minták geldanamycin előkezelését követően (GA, 1µg/ml, 24 óráig) az ERK 1 és 2-vel együtt precipitálódó Hsp90 mennyisége a nem-immun, kontroll savóval gyűjtött mennyiségre esett vissza. A Hsp90-nek a nem-immun IgG-hez való aspecifikus kapcsolódását a geldanamycin kezelés egyébként nem befolyásolta.

### Az ERK-Hsp90 kapcsolatot a geldanamycin antibiotikummal felbontható.

A tenyészetek 24 órás, 1µg/ml-es geldanamycin kezelését követően az ERK1/2-vel ko-precipitálódó Hsp90 mennyisége kontroll szintre esett vissza (16. ábra). A geldanamycin tehát alkalmasnak tűnt az ERK-Hsp90 asszociáció felbontására.

### A geldanamycin gátolja az ERK foszforilációját.

Geldanamycin hatására az ösztrogénnel kiváltható ERK foszforiláció megszűnt, s a kontroll neurotrofin hatása is jelentősen gyengült (17. ábra). Ez az eredmény a Hsp90-nek az ERK aktivációjában betöltött szerepére utal.



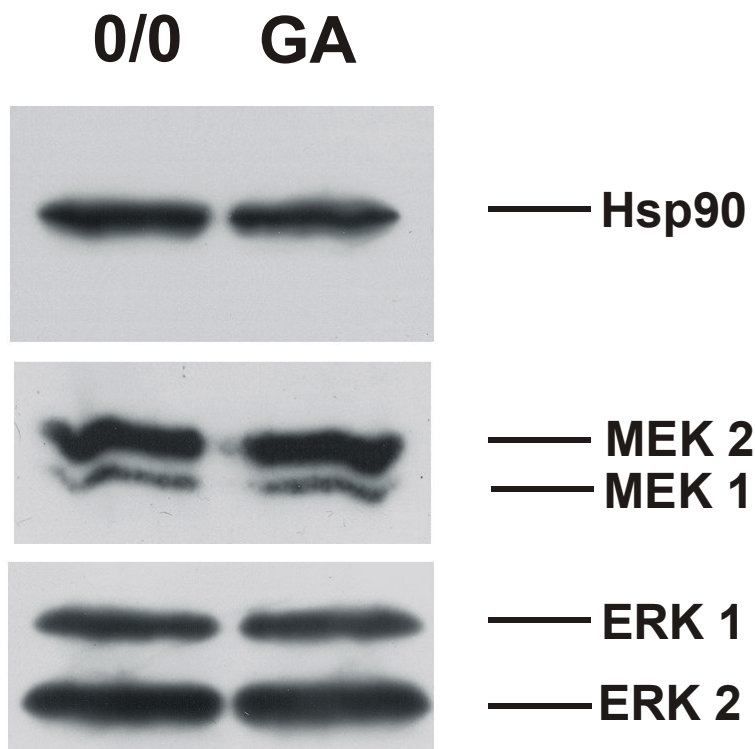
17. ábra. Western blot, a jelzett fehérjékre specifikus ellenanyagokkal detektálva. Geldanamycin kezelést követően (GA, 1 $\mu$ g/ml, 24 óráig) ösztrogén (E2, 10nM, 60 percig) hatására már nem jött létre ERK foszforiláció fokozódás, s a kontroll neurotrofin (BDNF, 100 ng/ml 60 percig) ilyen hatása, s az ERK alapaktivitás is gyengült. A sávok erősségének intenzitásbeli különbségeit az alsó oszlopdiagram szemlélteti. Módszertani kontrollként a blottok teljes ERK tartalmát is megvizsgáltuk (középső panel).

#### *A geldanamycin nem befolyásolja az ERK és a Hsp 90 sejten belüli elhelyezkedését*

Kezeletlen tenyészetekben az ERK1 és 2 dominánsan a citoplazmában volt található, s a Hsp90 is erre a sejt-kompartmentre szorított. Geldanamycin adására e fehérjéknek a sejten belüli elhelyezkedése nem változott (ezekről az eredményekről itt nem látható ábra). Geldanamycin adását követően az ERK foszforiláció alap szintje csökkent, ösztrogén hatására ERK foszforiláció fokozódást nem észleltünk, a neurotrofin kezelt kontrollban viszont továbbra is volt némi ERK foszforiláció növekedés, melyet detektálni tudtunk az egyes sejtek szintjén is. Bár a jel erőssége gyengébb volt a geldanamycinnel elő nem kezelt ugyanilyen mintához képest, az észlelt foszfo-ERK nukleocitoplazmatikus megoszlása nem tért el a geldanamycin kezelés nélküli esetektől (14. ábra, 3A és B). Ezekből az eredményekből arra következtettünk, hogy az ERK-hez kapcsolódó Hsp90-nek nincs szerepe az ERK és a foszfo-ERK sejten belüli elhelyezkedésében.

*A geldanamycin nem befolyásolja a MEK, ERK és a Hsp 90 fehérjék sejten belüli szintjét*

Kísérleti eredményeink értelmezéséhez fontos információ volt, hogy geldanamycin hatására nem történt észrevehető változás a MEK1/2, ERK 1/2 és Hsp90 fehérjék sejten belüli mennyiségében (18.ábra).

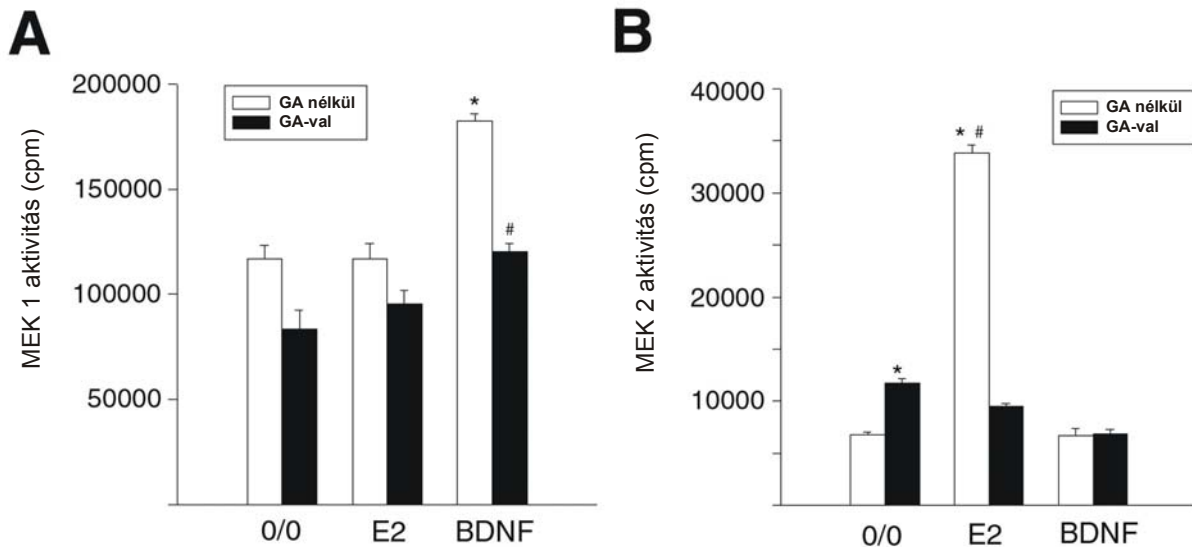


**18. ábra.** Western blot, a jelzett fehérjékre specifikus ellenanyagokkal detektálva. Geldanamycin (GA, 1µg/ml, 24 óráig) kezelés hatására nem változott az általunk vizsgált MEK 1 és 2, ERK 1 és 2 és Hsp90 fehérjék szintje a kezeletlen (0/0) kontrollhoz képest.

*Az ösztrogén hatását a MEK 2 közvetíti*

A geldanamycin ERK foszforilációt gátló hatásának értékeléséhez meg kellett vizsgálnunk, hogy a geldanamycin kezelésnek van-e következménye a jelátviteli láncolatban az ERK felett elhelyezkedő MEK enzim aktivitására nézve. Ennek eldöntésére immun kináz esszét végeztünk. A MEK 1-re specifikus esszé során a neurotrofin kontroll hatására erős MEK 1 aktivációt láttunk, az ösztrogénnel kezelt mintában viszont nem volt szignifikáns eltérés az alapaktiváshoz képest (19. ábra, A). Ez meglepő eredmény volt, különösen annak ismeretében, hogy korábban a MEK kémiai gátlószerét alkalmazva az ösztrogén általi ERK aktiváció MEK függőnek bizonyult (4. és 10. ábrák). E korábbi kísérletek során viszont a MEK gátlószerének olyan dózisát alkalmaztuk, mely mind a MEK 1-et, mind pedig a MEK 2-t gátolta. Minthogy az egyedfejlődés korai szakasza során a 2-es MEK izoforma expressziója dominálhat az 1-esé felett (Alessandrini és mtsai, 1997, Brott és mtsai, 1993), egy másik esszében a MEK 2 esetleges szerepét vizsgáltuk meg. Ebben a kísérletben a MEK 2-t az ösztrogén aktiválta erőteljesen, s a neurotrofin kontroll volt hatástalan

(19. ábra, B). Itt tehát a jelátviteli utak egy érdekes elágazódását látjuk, amennyiben a BDNF a MEK1-en, míg az ösztrogén a MEK 2-n keresztül vezet ERK aktivációhoz.



19. ábra. (A) A MEK-1-re specifikus immun kináz esszé az alapszinthez viszonyított jelentős aktivitás növekedést csak a neurotrofinnal (BDNF, 100ng/ml, 60 percig) történő kezelést követően mutatott (fehér oszlopok). (B) A MEK-2 aktivitása viszont az ösztrogén (E2, 10nM, 60 percig) adására emelkedett (fehér oszlopok). A geldanamycin (GA, 1µg/ml, 24 óráig) általában gátló hatást fejtett ki, kivéve a MEK-2 alapaktivitást, mely emelkedett a szer hatására (A és B ábrák fekete oszlopai) (\* $p \leq 0.05$ , # $p \leq 0.05$ ).

A geldanamycin kezelés gátolta mind az ösztrogén, mind a neurotrofin általi MEK aktivációt, s a MEK 1 alapaktivitást is. Érdekes módon a MEK 2 alapaktivitás viszont szignifikáns emelkedést mutatott a geldanamycinnel nem kezelt mintához képest (19. ábra, A és B). Ennek ellenére ugyanilyen körülmények között az ERK alap szintű foszforilációja némileg csökkent (17. ábra). Az a megfigyelés, miszerint geldanamycin kezelést követően a MEK 2 alapaktivitás emelkedett, az ERK foszforiláció alapszintje viszont ennek ellenére csökkent, aláhúzza az ERK-hez kapcsolódó Hsp90 esetleges kulcsfontosságú szerepét a MEK aktivitásnak az ERK-re történő sikeres áttevődésében.

## Az eredmények összefoglalása

10nM ösztrogén kezelés hatására a fejlődő patkány és egér nagyagykéreg organotipikus tenyészeiben már néhány (15) percen belül kimutatható, időben elnyújtott kinetikájú (legalább 2 órán át tartó) ERK foszforiláció fokozódást észleltünk, mind az egész tenyészet, mind a tenyészetek egyes sejtjeinek szintjén.

E reakció elmaradása a PD98059 nevű MEK-gátló alkalmazását követően, illetve a MEK immunkináz esszé eredményei is azt jelzik, hogy a fenti folyamatot a MEK 2-es izoformája közvetíti az ERK 1/2 felé. A BDNF hatása ugyanezekhez a kinázokhoz viszont a MEK 1-en át jut el.

A kétféle ágens a Raf enzim vonatkozásában is eltérő preferenciát mutat, amennyiben az ösztrogén hatására csak a B-Raf, a c-Raf-1 izoforma viszont nem aktiválódott. A neutrofin kontrollok ugyanakkor mindkét Raf működésfokozódását indukálták.

Az ösztrogén ERK aktiváló hatását közvetítő receptor azonosítása az ösztrogén receptor izoformáira specifikus ligandokkal, vagy az alfa receptor változatot nem tartalmazó genetikai mutáns szövet használatával sem sikerült. A Trk receptor ösztrogénhatásra elmaradó foszforilációja viszont kizárja, hogy az ösztrogén a szövetekből neutrofinokat felszabadítva váltaná ki ERK kaszkád működésfokozódását.

A tenyészetek ösztrogén hatására ERK foszforilációval reagáló sejtjei morfológiai megjelenésük, méretük és a MAP2B fehérjére mutatott immunpozitivitásuk alapján is neuronoknak tűnnek.

A foszfo-ERK az egyes ösztrogénre reagáló sejteken belül kimutatható volt a citoplazmában, a sejtnyúlványokban és a sejtmagban is, a fehérjeszintézis gátlását követően azonban már csak a citoplazmára korlátozódott.

Az ERK 1 és 2 enzimeket koprecipitációs módszerrel a Hsp90 hősokk fehérjével asszociált formában találtuk kísérleti rendszerünkben. E kapcsolatot a geldanamycin antibiotikummal felbontva arra a következtetésre jutottunk, hogy a Hsp90 nem befolyásolja az ERK 1/2 stabilitását, vagy sejten belüli megoszlását, de szükséges az ERK 1/2 -nek a MEK-2-általi aktiválásához.

## A munka jelentősége

Munkánk során elsőként mutattuk ki egy típusosan polipeptid növekedési faktorok (mint például a neurotrofinok) által használt jelátviteli láncolat elemeinek (B-Raf-MEK2-ERK 1/2) ösztrogén általi aktivációját fejlődő idegszövetből készült primer nagyagykérgi kultúrákban (20. ábra).

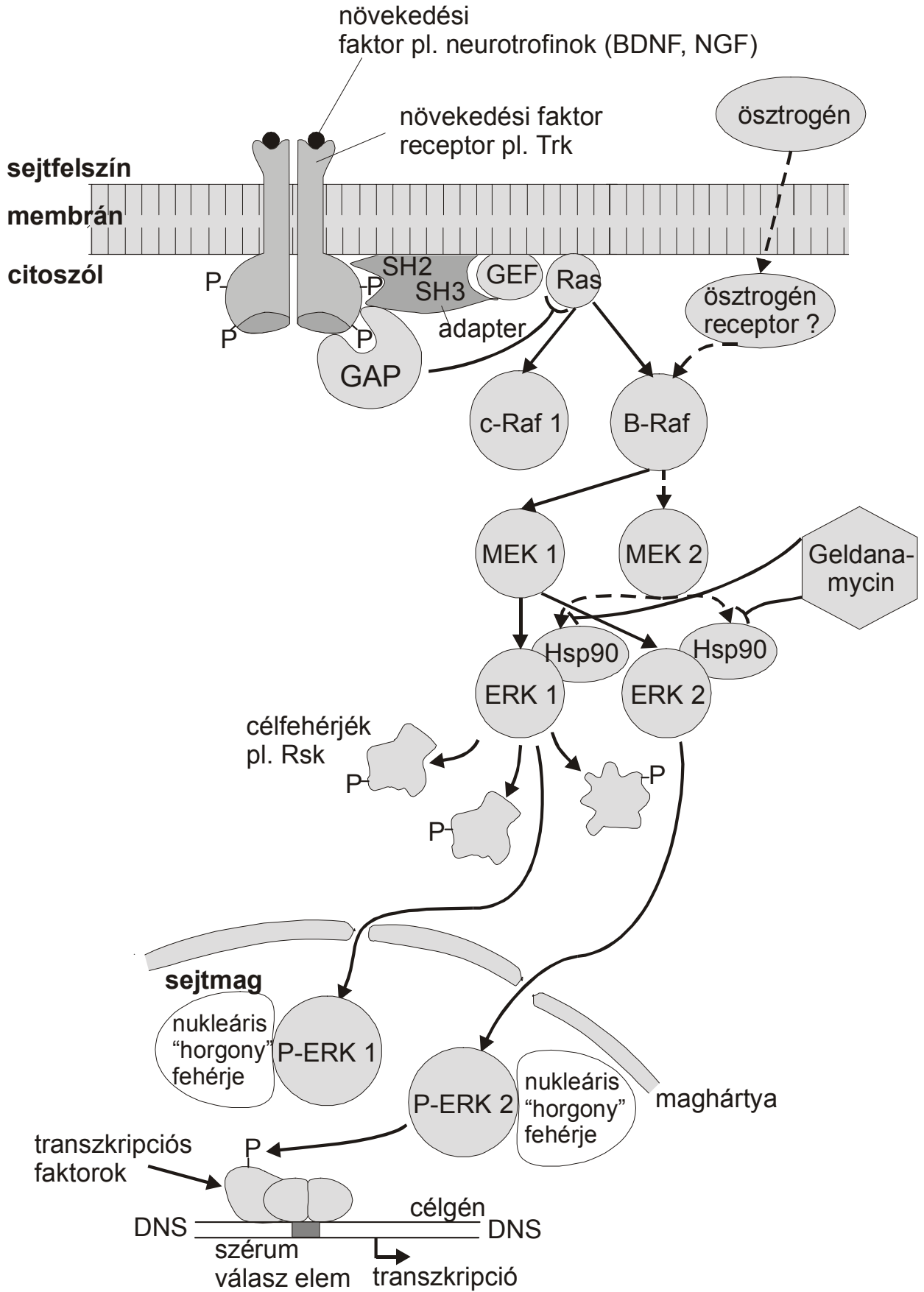
A hasonlóságok mellett a neurotrofin, illetve ösztrogén által kiváltott jelátviteli történések specifikus jellemzőiből is azonosítanunk sikerült néhányat (a neurotrofinok B-Raf és c-Raf-1, valamint MEK 1 aktivációja szemben az ösztrogén B-Raf-, illetve MEK 2 preferenciájával).

Az ERK1/2-Hsp90 kapcsolat megfigyelésével tovább bővültek ismereteink e chaperone fehérje makromolekuláris kapcsolatok szervezésében betöltött szerepét illetően.

Az ösztrogén-indukált foszfo-ERK nukleáris felhalmozódásának kimutatásával pedig rávilágítottunk, hogy e hormonnak nagyobb lehet a jelentősége az idegrendszer korai differenciációs és génexpressziós folyamataiban, mint eddig gondoltuk.

Az ösztrogén leírt hatásait közvetítő receptor azonosságának kétsége ugyanakkor felveti további, eddig még azonosítatlan receptorok létezésének, illetve fontos, alternatív hatásmechanizmusok működésének lehetőségét.

Eredményeink segíthetnek az idegrendszer korai, komplex neuroendokrin hatások alatt zajló bonyolult fejlődésének jobb megértésében. Bár a felnőtt idegrendszer ösztrogén érzékenysége jóval mérsékeltebb a fejlődőhöz képest, sérülést követően (trauma, neurit szakadás, hormonális depriváció menopauzát, vagy gonadektómiát követően) gyakran tér vissza a fejlődés korai stádiumaiban tapasztalt hormonális érzékenység. Terápiás oldalról így a napjainkban egyre gyakoribb ösztrogén szubsztitúció összetett hatásrendszerének központi idegrendszeri vonatkozásai válhatnak érthetőbbé megfigyeléseink tükrében.



20. ábra. A MAPK kaszkád és az ösztrogén jelátvitel párbeszéde kísérleti rendszerünkben.

## A munkához felhasznált közlemények

### Saját közlemények:

Singh, M, **Sétáló, G, Jr**, Guan, XP, Warren, M, and Toran-Allerand, CD. (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J. Neurosci* **19**: 1179-1188.

Singh, M, **Sétáló, G, Jr**, Guan, XP, Frail, DE, Toran-Allerand, CD. (2000) Estrogen-induced activation of the mitogen activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor- $\alpha$  knock-out mice. *J. Neurosci* **20**: 1694-1700.

Toran-Allerand, CD, Singh, M, **Sétáló, G, Jr**. (1999) Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol* **20**: 97-121.

**Sétáló, G, Jr**, Singh, M, Guan, XP, Toran-Allerand, CD. Estradiol-induced phosphorylation of ERK1/2 in explants of the mouse cerebral cortex: the roles of heat shock protein 90 and MEK2. *J Neurobiol*, közlésre elfogadva.

### Hazai konferenciák:

Boglári G., **ifj. Sétáló Gy.**, Pap M., Nusser N., Szeberényi J.: Ras fehérjék szerepe az NGF-indukálta korai-gén expresszióban. Pószter bemutató, Magyar Genetikusok Harmadik Konferenciája, 1994 December, Debrecen.

Pap M., Boglári G., **ifj. Sétáló Gy.**, Nusser N., Szeberényi J.: A korai válasz-gén expresszió és a korai válasz-gén termékek foszforilációjának Ras-függő és -független szabályozása NGF-kezelt PC12 sejtekben. Pószter bemutató, Harmadik Sejt- és Fejlődésbiológiai Szimpózium, 1995 Január, Pécs.

**Ifj. Sétáló Gy.**, Singh M., Guan XP. és Toran-Allerand CD. Újszerű ösztrogén jelátviteli mechanizmus egér agyszelet kultúrában. Előadás, VIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, 2000, január 17-19

### Nemzetközi konferenciák:

**Sétáló, G, Jr**, Boglári, G, Pap, M, Nusser, N, Szeberényi, J. Differential role of H-Ras in the expression of early-response genes induced by NGF in PC12 cells. Pószter bemutató, FEBS Advanced Course: Single Cell Techniques in Signal Transduction Research, 1995 április 29-május 5, Leiden, Hollandia.



**Sétáló, G, Jr**, Singh, M, Warren, M, Toran-Allerand, CD. Direct association of heat shock protein Hsp90 and the extracellular signal regulated kinases ERK1/2. A possible link between estrogen and neurotrophin signaling. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1997; **23**: 1710

Singh, M, Warren, M, **Sétáló, G, Jr**, Toran-Allerand, CD. The estrogen receptor exists in a multimeric complex consisting of at least B-Raf, Mek and Hsp90 in explants of the cerebral cortex. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1997; **23**: 1709

**Sétáló, G, Jr**, Singh, M, Warren, M, Toran-Allerand, CD. The role of heat shock protein 90 in estrogen-neurotrophin crosstalk within cerebral cortical explants of the mouse. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1998; **24**: 1295

Singh, M, **Sétáló, G, Jr**, Guan, XP, Warren, M, Toran-Allerand, CD. Estrogen-induced ERK phosphorylation in the cerebral cortex of estrogen receptor- $\alpha$  knockout (ERKO) mice. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1998; **24**: 1295

Guan, XP, Singh, M, **Sétáló, G, Jr**, Toran-Allerand, CD. The cortical estrogen receptor as part of a caveolar complex. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1999; **25**: 508

Singh, M, Guan, XP, **Sétáló, G, Jr**, Toran-Allerand, CD. Evidence of a novel estrogen receptor in the developing cerebral cortex. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1999; **25**: 508

**Sétáló, G, Jr**, Singh, M, Warren, M, Toran-Allerand, CD. Regional and intracellular distribution of phosphorylated ERKs following estradiol and neurotrophin treatment in the cerebral cortex. Pószter bemutató, *Soc Neurosci Abstr* 1999; **25**: 508

**Sétáló, G, Jr**, Singh, M, Guan, XP, Toran-Allerand, CD. Novel and unique aspects of estrogen signaling in the developing brain. Pószter bemutató, International Congress on Schizophrenia Research, Neuroplasticity and Schizophrenia, 2000, szeptember 9-12, Zinal, Svájc.

**Sétáló, G, Jr**, Singh, M, Guan, XP, Toran-Allerand, CD. Estrogen-induced phosphorylation of ERK in explants of the developing mouse cerebral cortex: the roles of Hsp90 and MEK2. Előadás, Pannon Symposium, 2000, szeptember 28-29, Pécs, Magyarország.

*Egyéb saját közlemények:*

Szeberényi, J, Boglári, G, Komáromy, L, Nusser, N, Pap, M, Sebők, Á, **Sétáló, G, Jr**, Tigyi, A. (1996) Problem-oriented teaching of molecular cell biology at the University Medical School of Pécs, Hungary. *Medical Education* **30**: 232-234.

Szeberényi, J, Boglári, G, Komáromy, L, Nusser, N, Pap, M, Sebők, Á, **Sétáló, G, Jr**, Tigyi, A. (1996) The way we teach molecular cell biology at the University Medical School of Pécs, Hungary. *Medical Teacher* **18**: 213-218.

*A dolgozatban található hivatkozások irodalomjegyzéke*

Alessandrini, A, Brott, BK, and Erikson, RL. (1997). Differential expression of MEK1 and MEK2 during mouse development. *Cell Growth Differ* **8**: 505-11.

Ansonoff, MA, Etgen, AM. (1998). Estradiol elevates protein kinase C catalytic activity in the preoptic area of female rats. *Endocrinology* **139**: 3050-3056.

Bamberger, CM, Wald, M, Bamberger, AM, and Schulte, HM. (1997). Inhibition of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor function by the heat shock protein 90-binding agent geldanamycin. *Mol Cell Endocrinol* **131**: 233-40.

Brott, BK, Alessandrini, A, Largaespada, DA, Copeland, NG, Jenkins, NA, Crews, CM, and Erikson, RL. (1993). MEK2 is a kinase related to MEK1 and is differentially expressed in murine tissues. *Cell Growth Differ* **4**: 921-9.

Brugge, JS, Erikson, E, and Erikson, RL. (1981). The specific interaction of the Rous sarcoma virus transforming protein, pp60src, with two cellular proteins. *Cell* **25**: 363-72.

Czar, MJ, Galigniana, MD, Silverstein, AM, and Pratt, WB. (1997). Geldanamycin, a heat shock protein 90-binding benzoquinone ansamycin, inhibits steroid-dependent translocation of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Biochemistry* **36**: 7776-85.

Davis, RJ. (1995). Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev* **42**: 459-67.

Endoh, H, Sasaki, H, Maruyama, K, Takeyama, K, Waga, I, Shimizu, T, Kato, S, and Kawashima, H. (1997). Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 99-102.

Frodin, M, and Gammeltoft, S. (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* **151**: 65-77.

Gerlach, JL, McEwen, BS, Toran-Allerand, CD, and Friedman, WJ. (1983). Perinatal development of estrogen receptors in mouse brain assessed by radioautography, nuclear isolation and receptor assay. *Brain Res* **313**: 7-18.

Grammatikakis, N, Lin, JH, Grammatikakis, A, Tschlis, PN, and Cochran, BH. (1999). p50(cdc37) acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function. *Mol Cell Biol* **19**: 1661-72.

Gu, G, Rojo, AA, Zee, MC, Yu, J, Simerly, RB. (1996). Hormonal regulation of CREB phosphorylation in the anteroventral periventricular nucleus. *J Neurosci* **16**: 3035-3044.

Guan, XP, Singh, M, **Sétáló, G, Jr**, and Toran-Allerand, CD. (1999). The Cortical Estrogen Receptor as Part of a Caveolar Complex. *Soc. Neurosci. Abstr.* **25**: 508.

Hutchison, KA, Brott, BK, De Leon, JH, Perdew, GH, Jove, R, and Pratt, WB. (1992). Reconstitution of the multiprotein complex of pp60src, hsp90, and p50 in a cell-free system. *J Biol Chem* **267**: 2902-8.

Jaiswal, RK, Weissinger, E, Kolch, W, and Landreth, GE. (1996). Nerve growth factor-mediated activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade involves a signaling complex containing B- Raf and HSP90. *J Biol Chem* **271**: 23626- 9.

Kuiper, GG, Enmark, E, Peltö-Huikko, M, Nilsson, S, Gustafsson, JA. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 5925-30.

Kuiper, GG, Carlsson, B, Grandien, K, Enmark, E, Haggblad, J, Nilsson, S, Gustafsson, JA. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**: 863-70.

Lenormand, P, Brondello, JM, Brunet, A, and Pouyssegur, J. (1998). Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J Cell Biol* **142**: 625-33.

Marshall, C. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**: 179-85.

Migliaccio, A, Di, DM, Castoria, G, de, FA, Bontempo, P, Nola, E, and Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* **15**: 1292-300.

Miranda, RC, Sohrabji, F, and Toran-Allerand, CD. (1993). Neuronal colocalization of mRNAs for neurotrophins and their receptors in the developing central nervous system suggests a potential for autocrine interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6439-43.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* **392**: 49-53.

Murphy, DD, Segal, M, (1997). Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 1482-1487.

Nguyen, TT, Scimeca, JC, Filloux, C, Peraldi, P, carpentier, JL, and Van Obberghen, E. (1993). Co-regulation of the mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1 and the 90-kDa ribosomal S6 kinase in PC12 cells. Distinct effects of the neurotrophic factor, nerve growth factor, and the mitogenic factor, epidermal growth factor. *J Biol Chem* **268**: 9803-10.

Ogawa, S, Inoue, S, Watanabe, T, Hiroi, H, Orimo, A, Hosoi, T, Ouchi, Y, Muramatsu, M. (1998). The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **243**:122-6.

Oppermann, H, Levinson, W, and Bishop, JM. (1981). A cellular protein that associates with the transforming protein of Rous sarcoma virus is also a heat-shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 1067-71.

Paech, K, Webb, P, Kuiper, GG, Nilsson, S, Gustafsson, J, Kushner, PJ, Scanlan, TS. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* **277**: 1508-10.

Picard, D, Khursheed, B, Garabedian, MJ, Fortin, MG, Lindquist, S, Yamamoto, KR. (1990). Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* **348**: 166-8.

Pratt, WB. (1997). The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 297-326.

Pratt, WB and Toft, DO. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* **18**: 306-60.

Prima, V, Depoix, C, Masselot, B, Formstecher, P, Lefebvre, P. (2000). Alteration of the glucocorticoid receptor subcellular localization by non steroidal compounds. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **72**: 1-12.

Qui, MS, and Green, SH. (1992). PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21 ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron* **9**: 705-17.

Sakagami, M, Morrison, P, and Welch, WJ. (1999). Benzoquinoid ansamycins (herbimycin A and geldanamycin) interfere with the maturation of growth factor receptor tyrosine kinases. *Cell Stress Chaperones* **4**: 19-28.

Schulte, TW, An, WG and Neckers, LM. (1997). Geldanamycin-induced destabilization of Raf 1 involves the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **239**: 655-9.

Schulte, TW, Blagosklonny, MV, Ingui, C and Neckers, L. (1995). Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf 1 Ras association. *J Biol Chem* **270**: 24585-8.

Schulte, TW, Blagosklonny, MV, Romanova, L, Mushinski, JF, Monia, BP, Johnston, JF, Nguyen, P, Trepel, J and Neckers, LM. (1996). Destabilization of Raf 1 by geldanamycin leads to disruption of the Raf 1-MEK-mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Mol Cell Biol* **16**: 5839-45.

Segnitz, B and Gehring, U. (1995). Subunit structure of the nonactivated human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2179-83.

Segnitz, B and Gehring, U. (1997). The function of steroid hormone receptors is inhibited by the hsp90- specific compound geldanamycin. *J Biol Chem* **272**: 18694-701.

**Sétáló, G, Jr**, Singh, M, Guan, XP, Toran-Allerand, CD. Estradiol-induced phosphorylation of ERK1/2 in explants of the mouse cerebral cortex: the roles of heat shock protein 90 and MEK2. *J Neurobiol*, közlésre elfogadva.

Sgambato, V, Pages, C, Rogard, M, Besson, MJ, and Caboche, J. (1998). Extracellular Signal regulated Kinase (ERK) controls immediate-early gene induction on corticostriatal stimulation. *J Neurosci* **18**: 8814-25.

Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. **388**: 507-25.

Singh, M, **Sétáló, G, Jr**, Guan, XP, Warren, M and Toran-Allerand, CD. (1999). Estrogen-induced Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase in Cerebral Cortical Explants: Convergence of Estrogen and Neurotrophin Signaling Pathways. *J Neurosci* **19**: 1179-1188.

Singh, M, **Sétáló, G, Jr**, Guan, XP, Frail, DE and Toran-Allerand, CD. (2000). Estrogen-induced Activation of the MAP Kinase Cascade in the Cerebral Cortex of Estrogen Receptor- $\alpha$  Knockout (ERKO) Mice. *J Neurosci* **20**: 1694-1700.

Smith, DF, Whitesell, L, Nair, SC, Chen, S, Prapapanich, V and Rimerman, RA. (1995). Progesterone receptor structure and function altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol Cell Biol* **15**: 6804-12.

Stancato, LF, Chow, YH, Hutchison, KA, Perdew, GH, Jove, R and Pratt, WB. (1993). Raf exists in a native heterocomplex with hsp90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system. *J Biol Chem* **268**: 21711-6.

Stancato, LF, Silverstein, AM, Owens-Grillo, JK, Chow, YH, Jove, R and Pratt, WB. (1997). The hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase. *J Biol Chem* **272**: 4013-20.

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

Szeberenyi, J and Erhardt, P. (1994). Cellular components of nerve growth factor signaling. *Biochim Biophys Acta* **1222**: 187-202.

Toran-Allerand, CD. (1976). Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: implications for sexual differentiation. *Brain Res* **106**: 407-12.

Toran-Allerand, CD. (1980). Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro. II. Morphological correlates and hormonal specificity. *Brain Res* **189**: 413-27.

Toran-Allerand, CD. (2000). Novel sites and mechanisms of estrogen action in the brain. In: *Neuronal and Cognitive Effects of Oestrogens*. Wiley, Chichester (Novartis Foundation Symposium 230), 56-73.

Toran-Allerand, CD., Singh, M, and **Sétáló, G, Jr.** (1999). Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front Neuroendocrinol* **20**: 97-121.

Traverse, S, Gomez, N, Paterson, H, Marshall, C, and Cohen, P. (1992). Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC 12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor. *Biochem J* **288**: 351-5.

Wartmann, M, and Davis, RJ. (1994). The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane- bound multi-subunit complex. *J Biol Chem* **269**: 6695-701.

Witkowska HE, Carlquist M, Engstrom O, Carlsson B, Bonn T, Gustafsson JA, Shackleton CH. (1997) Characterization of bacterially expressed rat estrogen receptor beta ligand binding domain by mass spectrometry: structural comparison with estrogen receptor alpha. *Steroids* **62**:621-31

Whitesell, L and Cook, P. (1996). Stable and specific binding of heat shock protein

90 by geldanamycin disrupts glucocorticoid receptor function in intact cells. *Mol Endocrinol* **10**: 705-12.

Whitesell, L, Mimnaugh, EG, De Costa, B, Myers, CE and Neckers, LM. (1994). Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8324-8.

Zhou, Y, Watters, JJ, Dorsa, DM. (1996). Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology* **137**: 2163-2166.