

**Nitrogén-oxid által indukált intracelluláris jelátviteli folyamatok  
vizsgálata PC12 patkány phaeochromocytoma sejtek apoptózisában**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Varga Judit

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs

Témavezető és programvezető: Prof. Dr. Szeberényi József



Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Orvosi Biológiai Intézet

Pécs

2016

# I. Bevezetés

## 1. Nitrogén-oxid

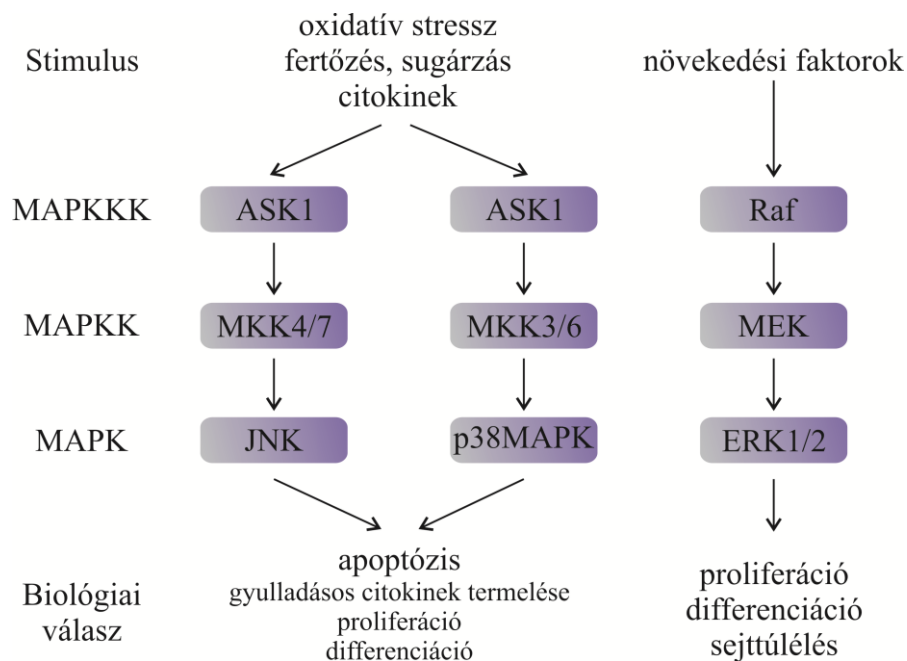
A gáz halmazállapotú nitrogén-oxid (nitrogén-monoxid; NO) neurotranszmitterként és jelátviteli molekulaként számos fiziológiás és patológiás folyamatot befolyásolhat a sejtben, termeléséért *in vivo* a nitrogén-oxid-szintáz (NOS) családba tartozó enzimek felelősek. Az intracellulárisan képződött NO egyszerű diffúzióval képes átjutni a sejthártyán, majd a sejtből kijutva autokrin és parakrin módon fejti ki hatását.

A NO intracellulárisan többféleképpen befolyásolhatja a sejtek életét/működését. Egyrészt képes fehérjék poszttranszlációs módosítására, melynek két típusa van: a reverzibilis S-nitroziláció és az irreverzibilis nitráció. S-nitroziláció esetén a NO cisztein aminosav(ak)hoz kötődik, ezáltal megváltoztatva az érintett fehérje aktivitását; ez gátló (például kaszpáz-3; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein) és aktiváló (például Ras fehérjék) hatású is lehet. A nitrozilált cisztein aminosavakról a NO denitrozilációval (esetleg transznitrozilációval, melynek során a NO egy másik fehérje cisztein aminosavára kerül át), enzimatis úton távolítható el; ennek végrehajtásáért többféle enzim is felelős lehet, például a tioredoxin és a protein-diszulfid-izomeráz (PDI). A denitroziláció nem-enzimatis úton is végbemehet. Nitráció esetén a NO tirozinhoz kapcsolódik. Másrészt a NO átmeneti fémeket tartalmazó fehérjékhez (például hemoglobin, mioglobin, szolubilis guanilat-cikláz) is kapcsolódhat. Továbbá, a NO aktiválhatja a szolubilis guanilat-cikláz enzimet, az ennek következtében képződő másodlagos messenger ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) pedig a protein kináz G (PKG) enzimeken keresztül érvényesíti hatását. A PKG-aktiváció következménye lehet többek között az erek falában található simaizmok relaxációja, trombocita-aggregáció vagy sejtproliferáció. A NO hatását sejttípus- és koncentráció-függő módon fejti ki. Kis mennyiségben főként protektív hatású, szerepe lehet a tanulás és a memória folyamatában is, míg nagy koncentrációban pro-apoptotikus hatással bír. Utóbbi hatását a NO gyakran közvetett módon fejti ki; míg önmagában kevésbé reakcióképes, más molekulákkal reagálva reaktív nitrogén-származékokat (reactive nitrogen species, RNS) képez. Ilyen például a peroxinitrit anion, amely a NO szuperoxiddal való reakciója során képződik. A peroxinitrit képes reagálni lipidekkel és a DNS-sel, emellett apoptózist indukálhat a mitokondrium membránjának átjárhatóvá tétele révén. Nitrozatív stressz esetén egyes fehérjék fokozott S-nitrozilációja szintén citotoxikus hatású; számos neurodegeneratív kórkép hátterében kimutatták a PDI és a XIAP fehérjék S-nitrozilációja következtében kialakuló idegsejt-károsodást.

Kísérleti körülmények között a gáz halmazállapotú NO alkalmazása nehezen kivitelezhető, ezért a sejtek kezelése során elterjedt különféle NO-donor vegyületek alkalmazása; az általunk használt szer a nitroprusszid-nátrium (SNP). Vad típusú PC12 patkány phaeochromocytoma sejtekben és domináns gátló fehérjét expresszáló PC12 szubklónokban a nagy dózisban (400  $\mu\text{M}$ ) alkalmazott SNP-kezelés sejthalált indukál. Hasonlóan a NO-hoz, az SNP is képes kiváltani a guanilát-cikláz aktivációját és ennek következtében a cGMP szintjének emelkedését.

## 2. Celluláris stressz / stressz-jelátvitel / MAPK-kaszádok

A sejteket számos környezeti hatás érheti; az ezekre adott válasz függ az adott behatás típusától és intenzitásától, az aktiválódott jelpályáktól és a sejt típusától is. A különféle környezeti ingerek/szignálok sejten belüli hatásainak közvetítésében fontos szerepe van a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) kaszkádoknak. Ezek a kaszkádok eukarióta sejtekben három szintre tagolhatóak; minden szintet egy fehérje-család tagjai képviselnek.



**1. ábra:** A MAPK-kaszádokon keresztül történő jelátvitel összefoglalása

Elsőként a mitogén-aktivált protein-kináz-kináz-kináz (MAPKKK) családba tartozó fehérjék aktiválódnak, majd ezt követően szerin és treonin aminosavak foszforilációja révén aktiválják a sorban következő mitogén-aktivált protein-kináz-kinázokat (MAPKK). Ez utóbbi fehérjék tirozin és treonin aminosavakon foszforilálják célfehérjéiket, a MAPK-család tagjait, melyek szintén szerin/treonin-specifikus kinázok. A MAPK-ok célfehérjéi között számos transzkripciós faktor van, melyek foszforilációja a sejt génexpressziós mintázatának

megváltozásával jár, ez eredményezi az adott hatásra bekövetkező biológiai választ. Emlős sejtekben a MAPK-családnak három fontos alcsaládja ismert: a c-Jun N-terminális kinázok (JNK1-3), a p38MAPK-ok (p38 $\alpha$ - $\delta$ ) és az extracelluláris szignál-regulálta kinázok (ERK1/2); a JNK és a p38MAPK fehérjék stressz kinázokként is ismertek (*1. ábra*).

## 2.1. Stressz jelátvitel a JNK- és a p38MAPK-úton

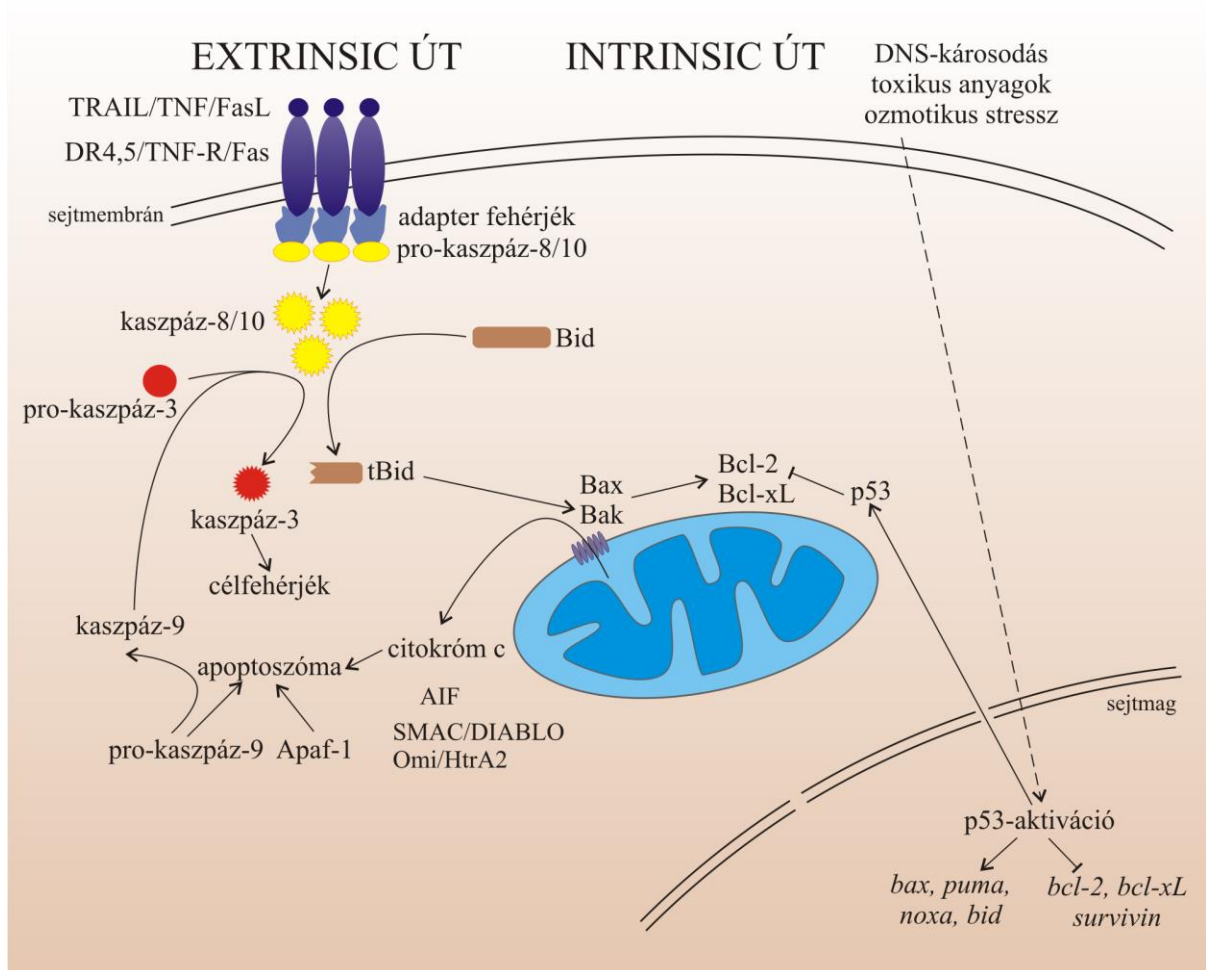
A JNK és a p38MAPK fehérjékhez kapcsolódó jelátvitelt számos hatás aktiválhatja, többek között az oxidatív és az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz, virális és bakteriális fertőzés, halál ligandok/gyulladásos citokinek (például tumor nekrozis faktor, TNF), UV- és ionizáló sugárzás, kemoterápiás szerek, illetve a citoplazmában a Ca<sup>2+</sup> szintjének emelkedése. A felsorolt hatások a MAPKKK-ok családjába tartozó ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) fehérje aktivációját okozhatják; ennek következményeképpen a MKK4 és MKK7 fehérjék a JNK, míg a MKK3 és MKK6 enzimek a p38MAPK foszforilációval történő aktivációjáért felelősek. A JNK- és a p38MAPK-aktiváció nem eredményez szükségszerűen sejtpusztulást; a sejt proliferációval, differenciációval és gyulladásos citokinek termelésével, sőt akár túléléssel is reagálhat a stressz hatásra; apoptózishoz általában a tartós JNK- és p38MAPK-aktiváció vezet. Az ASK1-MAPK jelátvitel zavarai betegségek (kardiovaszkuláris, neurodegeneratív és gyulladásos kórképek, tumorok és egyéb betegségek /asthma, diabetes/) kialakulását eredményezhetik.

## 2.2. Az ERK-út

Az ERK-út aktivációja a monomer G-protein Ras fehérjék közreműködésével történik, a jeltovábbítás a korábban már ismertetett mechanizmussal valósul meg: az aktív Ras a Raf (MAPKKK) – MEK1/2 (MAPKK) – ERK1/2 (MAPK) útvonalon fejti ki hatását. Az ERK-jelátvitel beindításáért jellemzően mitogén hatások felelősek, azonban stressz hatások is kiválthatják azt. Előbbi esetben az ERK-aktiváció általában sejtosztódást, terminális differenciációt, illetve sejttúlélést eredményez. A Ras/ERK-út fokozott működése a tumor képződés több lépésében is szerepet játszhat (migráció, invázió, túlélés). Stressz következtében azonban az aktív ERK fokozhatja anti-apoptotikus fehérjék (Bcl-2, B cell lymphoma-2; Bcl-xL, B cell lymphoma-extra large; Mcl-1, myeloid cell leukemia 1) és csökkentheti pro-apoptotikus fehérjék (Bim, B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death; Puma, p53 upregulated modulator of apoptosis; Bmf, Bcl-2 modifying factor) génjének átírását. Továbbá, az aktív ERK foszforilálhatja is a Bcl-2 család tagjait: az Mcl-1 esetén stabilizációt eredményezve, míg a Bad (Bcl-2-associated death promoter) esetén degradációt okozva.

### 3. Apoptózis

Az apoptózis a programozott sejthalál legismertebb, legtöbbet vizsgált, evolúciós szempontból igen konzervált típusa. Szerepet játszik a morfogenezisben, a szöveti homeosztázis fenntartásában, az öregedésben, illetve a károsodott és nem kívánatos sejtek eliminálásában. Nem megfelelő működése különféle betegségek (tumor, autoimmun és neurodegeneratív kórképek, stb.) kialakulásához vezethet. Apoptózist kiváltó hatások következtében a sejtmembrán nem sérül, a sejt a környező sejtek/szövetek károsodása, gyulladással járó folyamatok előidézése nélkül pusztul el. Az apoptózissal elpusztuló sejtek számos morfológiai és funkcionális változáson mennek át, ez lehetővé teszi molekuláris biológiai módszerekkel történő azonosításukat. Az apoptotikus sejtekre jellemző legismertebb jegyek a DNS internukleoszómális fragmentációja, a sejtről apoptotikus testek lefüződése, a foszfatidil-szerin molekulák kikerülése a sejthártya külső rétegébe (externalizáció), illetve a megfelelő jelátviteli utak/fehérjék aktivációja. A programozott sejthalál jelátvitelének két leginkább ismert útja az extrinsic (receptor által közvetített) és az intrinsic (mitokondriális) út.



2. ábra: Az apoptózis extrinsic és intrinsic jelátvitelének összefoglalása

### **3.1. Az apoptózis extrinsic útja / Extrinsic apoptózis-jelátvitel**

Az extrinsic utat sejtfelszíni receptorokhoz kötődő ligandok aktiválják (2. ábra), többek között a TNF és egyéb, a TNF-családba tartozó molekulák (TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; FasL, Fas-ligand, stb.). Ezek a halál-ligandok specifikus sejtfelszíni receptorokhoz kötődnek (TRAIL esetén DR4 és DR5, death receptor 4 és 5; FasL esetén Fas), aminek következtében a receptor intracelluláris doménjén egy multiprotein-komplex (DISC, death-inducing signaling complex) épül fel, mely továbbítja a jelet a jelpálya disztális komponenseinek. A DISC-ben található adapter fehérjék (FADD, Fas associated death domain containing protein; TRADD, TNF receptor associated death domain containing protein, stb.) inaktív iniciátor pro-kaspázokat (mint a pro-kaspáz-8 és -10) kötnek meg, ezáltal lehetővé téve számukra saját, proteolitikus hasítás révén megvalósuló aktivációjukat. Az aktív iniciátor kaspázok ezt követően két eltérő úton valósíthatják meg az effektor pro-kaspázok (pro-kaspáz-3, -6, -7) hasítással történő aktivációját. A sejtek egy részében (ún. I. típusú sejtek) a kaspáz-8 és -10 közvetlenül képesek hasítani a kaspáz-3 és -9 molekulákat. Ezzel szemben más sejtekben (ún. II. típusú sejtek) összekapcsolódik egymással az extrinsic és az intrinsic apoptózis jelátvitel. Ezekben a sejtekben a sejtfelszíni receptorokról kiinduló apoptózis-jelátvitel által aktivált kaspáz-8 molekulák hasítják a „BH3-only” fehérjék (ld. később) közé tartozó Bid (BH3 interacting-domain death agonist) fehérjét. A képződő hasított forma (tBid, truncated Bid) a mitokondriumba transzlokálódva a Bax (Bcl-2 associated X protein) és a Bak (Bcl-2 antagonist/killer) fehérjék aktivációját váltja ki. A halál-receptorokról kiinduló jelátvitel nemcsak apoptózist okozhat, hanem az egyedfejlődésben és gyulladásos folyamatokban is szerepet játszhat, illetve sejttúlélést közvetítő jelpályákat is serkenthet.

### **3.2. Az apoptózis intrinsic útja / Intrinsic apoptózis-jelátvitel**

Az apoptózis intrinsic/mitokondriális útjának aktivációját olyan stimulusok eredményezik, melyek hatása a sejten belül érvényesül (kivétel a tBid által közvetített mechanizmus, ld. előbb) (2. ábra). Ilyenek például a DNS-ben bekövetkező és a repair mechanizmusok által ki nem javítható károsodások, különféle toxikus ágensek vagy az ozmotikus stressz. A programozott sejthalál ezen útjának fontos szereplői a Bcl-2 családba tartozó fehérjék és a p53 transzkripciós faktor.

#### *3.2.1. A Bcl-2 fehérjecs család*

A Bcl-2 fehérjecs család magában foglal apoptózist gátló (anti-apoptotikus) és azt serkentő (pro-apoptotikus) fehérjéket is. A pro- és anti-apoptotikus fehérjék aránya dönt a sejt

életben maradásáról, illetve elpusztulásáról; az egyensúly felborulása számos betegség (daganatok, autoimmun betegségek, stb.) kialakulását vonhatja maga után. Az anti-apoptotikus alcsalád tagjai 4 Bcl-2 homológia (BH) doménnel rendelkeznek, legismertebb képviselőik a Bcl-2 és a Bcl-xL fehérjék. Daganatokban gyakran kimutatható a Bcl-2 családba tartozó anti-apoptotikus fehérjék génjének overexpressziója. A pro-apoptotikus fehérjéket magában foglaló alcsalád az egyes tagok szerkezete és funkciója alapján tovább tagolható: ide tartoznak a pro-apoptotikus multidomén Bax és Bak fehérjék (BH1-3-doméneket tartalmaznak) és a csak a BH3-doménnel rendelkező, ún. „BH3-only” fehérjék (Bad, Puma, Noxa, Bid, stb.).

A pro-apoptotikus multidomén fehérjék úgy segítik elő a sejtpusztulást, hogy oligomerizálódva pórusokat képeznek a mitokondrium külső membránjában, ezzel átjárhatóvá téve azt (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization). Ily módon lehetővé teszik a citokróm c és más fehérjék (Smac/DIABLO, second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI; AIF, apoptosis-inducing factor; endonukleáz G; Omi/HtrA2, high temperature requirement protein) kiáramlását a mitokondrium intermembrán teréből a citoszólba. Az endonukleáz G és az AIF fehérjék ezt követően a sejtmagba kerülnek, ahol a kromatin-kondenzáció és a DNS-fragmentáció kiváltásában van szerepük. A Smac/DIABLO és az Omi/HtrA2 proteinek a kaszpázokhoz kapcsolódó és ezáltal azokat gátló IAP-családba (inhibitor of apoptosis protein) tartozó fehérjéket gátolják, így hozzájárulnak a kaszpáz-aktivációhoz. A citokróm c molekulák citoplazmába történő kijutása nélkülözhetetlen az apoptozómák kialakulásához; ezek a komplexek a citokróm c mellett az Apaf-1 (apoptotic peptidase-activating factor-1) és az inaktív pro-kaspáz-9 fehérjéket tartalmazzák. Az apoptozóma kialakulása biztosít lehetőséget a pro-kaspáz-9 molekulák hasítással történő aktivációjához, majd ezt követően az aktív kaszpáz-9 fehérjék végzik el az effektor pro-kaspázok aktiválását. Az apoptózis folyamatának végét jelző proteolitikus hasításokért az ily módon aktivált kaszpáz-3, -6 és -7 enzimek felelősek. A Bcl-2 család anti-apoptotikus tagjai azáltal gátolják a citokróm c felszabadulását, hogy megkötik a Bax/Bak fehérjéket, illetve az azokat aktiválni képes „BH3-only” proteineket.

### 3.2.2. A p53 fehérje

Bár a felfedezését követően onkoproteinnak tartották, a „genom őre”-ként is emlegetett p53 az egyik legismertebb tumor szuppresszor fehérje. Először transzkripciósfaktorként vált ismertté, azonban az utóbbi időben világossá vált, hogy számos esetben a transzkripció közvetlen szabályozásától függetlenül fejt ki hatását.

A p53 fehérjét kódoló gén mutációja számos daganatban kimutatható; az esetek többségére a DNS-kötő doménben előforduló missense mutáció jellemző, mely aminosav-cserét eredményez. Napjainkig 45000-nél több szomatikus és csírasejt-mutációt írtak le a p53 génben, melyek következménye lehet a fehérje teljes inaktivációja; azonban előfordulhat az is, hogy a mutáns p53 fehérjék onkogén hatással bírnak, illetve domináns negatív módon gátolják a sejtben a vad típusú p53 fehérjét. Emellett a normál p53-funkció elvesztését eredményezheti virális/celluláris fehérjékhez való kötődés, epigenetikai mechanizmusok (promóter-hipermetiláció) és a fokozott degradáció is. A mutáns p53 fehérje által szabályozott gének olyan fehérjéket kódolnak, melyek elősegítik a tumor sejtek túlélését és osztódását, a kemorezisztencia kialakulását, genomikus instabilitást okoznak, gyulladást váltanak ki, közreműködnek a migráció, az invázió, az angiogenezis és a metasztázis-képződés folyamataiban. A p53 gén csírasejtben bekövetkező mutációja/inaktivációja felelős a ritka Li-Fraumeni-szindróma kialakulásáért.

A p53 fehérje legismertebb feladatai: (1) szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában; (2) indukálhatja a DNS-repair mechanizmusokban részt vevő fehérjék génjeinek átírását; (3) szabályozza az apoptózis folyamatát. Emellett szabályozza az autofágiát, a (tumor) sejtek metabolizmusát, a vezikuláris transzport folyamatát, a citoskeleton organizációját, az endocitózist és a nekrozist.

A teljes hosszúságú p53 fehérje 393 (patkányban 391) aminosavból épül fel. N-terminálisán találhatóak a transzaktivációs domének (TAD1 és 2) és egy prolin-gazdag régió (PP), ezt követi a DNS-kötő domén (DBD), míg a C-terminális tartalmazza a tetramerizációs/oligomerizációs domént (OD) és egy szabályozó régiót; emellett a fehérje nukleáris lokalizációs (NLS) és nukleáris export szignálokkal (NES) is rendelkezik. A TAD feladata a génexpresszió szabályozása, emellett rajta keresztül a p53 számos fehérjéhez kapcsolódik (például p300/CBP; Mdm2, mouse double minute 2; Bcl-2; Bcl-xL). A prolin-gazdag régió a p53 fehérje tumor szuppresszor funkciójának ellátásához, valamint a mitokondriumban az apoptózis kiváltásához szükséges. A p53 génben leírt mutációk többsége a DNS-kötő domént kódoló régióban lokalizálódik. Hat úgynevezett „hot-spot” hely található itt, a legtöbb mutáció ezeket érinti (Arg175His, Gly245Ser, Arg248Trp, Arg249Ser, Arg273His, Arg282Trp). A p53 fehérje tetramer formában kötődik a DNS-hez, ebben van szerepe az oligomerizációs doménnek; emellett található itt NLS és több ubikvitinációs hely is. A p53 gén átírásakor 8 különféle mRNS keletkezik, melyek összesen 12 izoformát kódolnak. A teljes hosszúságú p53 fehérje rendelkezik az összes korábban felsorolt doménnel. Ezen régiók azonban részben vagy teljesen hiányoznak a többi p53 izoformából, melyek alternatív promóter-használat, alternatív splicing vagy a fehérjeszintézis alternatív



iniciációjának eredményeképpen szintetizálódnak. Az egyes izoformák normál szövetekben is jelen vannak, azonban megváltozhat az expressziójuk tumor sejtekben, illetve patogének hatására (például a *H. pylori* fokozza egyes izoformák expresszióját a gyomor epitelsejtjeiben, elősegítve a sejtek túlélését).

Normál sejtekben alacsony a p53-szint, mivel az Mdm2 (emberben Hdm2) fehérje ubikvitin-ligázként elősegíti a p53 fehérje proteaszómális degradációját. Stressz hatások következtében megemelkedik a p53 fehérje mennyisége, azonban a p53 transzkripciós faktorként működve fokozza az *mdm2* gén átírását, ezáltal indirekt módon csökkentve saját mennyiségét (negatív feedback). A p53 fehérje működésképtelensége az Mdm2 fokozott működésére/overexpressziójára is visszavezethető.

A p53 fehérje több mechanizmus révén is részt vehet az apoptózis intrinsic jelátvitelében. Egyfelől transzkripciós faktorként képes aktiválni és gátolni is a Bcl-2 családba tartozó és egyéb fehérjék génjének átírását: indukálhatja a *bax*, *puma*, *noxa*, *bid*, *bad*, *apaf1*, *smac/diablo*, míg gátolhatja a *bcl-2*, *bcl-xL*, *mcl-1*, *survivin* géneket. Másfelől a p53 fehérje működhet transzkripció-független módon is; a citoplazmában közvetlenül kapcsolódva a Bcl-2 fehérjecsald tagjaihoz képes szabályozni azok aktivitását. Egyrészt kötődik a Bcl-2, Bcl-xL és Mcl-1 fehérjékhez, ami a Bax és a Bak fehérjék aktivációját eredményezi; másrészt közvetlenül is képes a Bax/Bak-aktivációra. A p53 fehérje olyan gének átírását is serkentheti, melyek az extrinsic útban közreműködő fehérjéket (Fas, FasL, DR5) kódolnak. A p53 nemkódoló RNS-gének átírását is fokozhatja (mikro RNS-ek, hosszú nem-kódoló RNS-ek, hosszú intergénikus nem-kódoló RNS-ek), emellett szabályozza a miRNS-ek érését is.

A p53 fehérje számos poszttranszlációs módosítás célpontja lehet (foszforiláció, acetiláció, ubikvitináció, sumoiláció, neddiláció, metiláció), melyek a fehérje működésére és sejten belüli lokalizációjára is hatással lehetnek. Az Mdm2 által végrehajtott multi-mono-ubikvitináció következtében a p53 kijut a citoplazmába, ezzel szemben a fehérje poli-ubikvitinációja a proteaszómák általi degradációhoz vezet. Eddig körülbelül 20, stressz hatására foszforilálódó szerin és treonin, valamint 6, stressz következtében acetilálódó lizin aminosavat írtak le a p53 fehérjében. A DNS-t károsító hatások a p53 fehérje foszforilációját eredményezhetik. A szerin-15 aminosavon bekövetkező foszforiláció következménye a p53 fehérje stabilizációja. A szerin-46 foszforilációja elősegíti a p53 mitokondriális transzlokációját, majd ott a Bcl-2 megkötése révén a külső membrán permeabilizálását; emellett a sejtmagban p53-stabilizációt okozva elősegíti pro-apoptotikus gének átírását. Más aminosavak DNS-károsodás által előidézett foszforilációja következtében az Mdm2 leválik a transzaktivációs doménről, így nagyobb affinitással kapcsolódik a p53-hoz a p300/CBP és fokozódik a p53 transzkripciós aktivitása.

#### 4. A PC12 sejtvonala

A PC12 patkány phaeochromocytoma sejtvonala 1976-os létrehozása óta széles körben ismert. Könnyű tenyésztetőségének és viszonylag rövid generációs idejének köszönhetően elterjedten alkalmazzák modellrendszerként a sejt túlélés, az apoptózis és a neuronális differenciáció hátterében álló jelátviteli útvonalak vizsgálata során. Az Orvosi Biológiai Intézetben a vad típusú PC12 sejtvonala mellett olyan PC12 szubklónok is rendelkezésre állnak, melyek expresszálják egy adott fehérje mutáns (domináns gátló vagy konstitutívan aktív) verzióját. A kutatócsoportunk által leggyakrabban használt egyik PC12 szubklón a p143p53PC12 sejtvonala. Ezek a sejtek olyan domináns gátló p53 fehérjével rendelkeznek, melyben mutációt szenvedett a 143-as pozícióban lévő aminosav (valin-alanin csere). Ennek hatására a mutáns fehérje nem képes transzkripciós faktorként ellátni a funkcióját, ugyanis képtelen a p53 fehérje által típusosan felismert DNS-szekvenciához kötődni. Mivel a p53 fehérje tetramer szerkezetű transzkripciós faktorként működik, a tetramerben egy mutáns alegység jelenléte már a fehérje inaktivációjához vezet. Irodalmi adatok szerint a Val143Ala-mutáns p53 fehérje a vad típusú fehérjéhez viszonyítva kevésbé stabil, mások szerint azonban képes fokozni egyes gének expresszióját.

## II. Célkitűzések

A NO-donor SNP nagy dózisban történő alkalmazása sejtpusztulást eredményez PC12 sejtekben. Munkánk célja a következő volt:

1. Az SNP és a belőle felszabaduló NO által kiváltott celluláris/nitrozatív stressz által aktivált jelátviteli fehérjék/utak analízise.
2. A domináns gátló mutáns p53 fehérjét tartalmazó p143p53PC12 sejtvonala fokozott SNP-érzékenységének hátterében álló molekuláris mechanizmusok vizsgálata.

Egér makrofág sejtekben az SNP nagy koncentrációjával kiváltott apoptózis gátolható dbcGMP- vagy kis dózisú (100  $\mu$ M) SNP-előkezeléssel. A kísérleti elrendezéseket PC12 modellrendszerünkre adaptálva célunk a következők vizsgálata volt:

1. SNP által okozott apoptózis 100  $\mu$ M SNP-előkezeléssel történő kivédésének lehetősége.
2. Más, szintén apoptózist előidéző körülmények/kezelések (szérummegvonás, ciszplatin, tunikamicin, anizomicin) pro-apoptotikus hatásának csökkentése kis dózisú SNP-előkezeléssel.
3. A 100  $\mu$ M SNP-vel történő előkezelés részlegesen protektív hatásának hátterében álló jelátviteli folyamatok vizsgálata.

### **III. Anyagok és módszerek**

#### **1. Sejtvonalak**

Kísérleteink során vad típusú PC12 patkány mellékvesevelő és p143p53PC12 sejtvonalakkal dolgoztunk; az utóbbi egy domináns gátló mutáns p53 fehérjét expresszáló PC12 szubklón. A sejteket a számukra optimális körülmények között (37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében) tenyésztettük, az ehhez használt médiumot (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 5% borjú és 10% ló szérummal egészítettük ki. A p143p53PC12 sejtvonal fenntartásához használt médium 200 µg/ml geneticint is tartalmazott.

#### **2. A sejtek életképességének vizsgálata**

Az ATP-assay az ATP-tartalom mérése révén lehetővé teszi az élő sejtek arányának meghatározását egy sejttenyészetben. Mintánként  $2 \times 10^3$  sejtet ültettünk ki 96 lyukú sejttenyésztő lemezre, a tenyésztés a korábban ismertetett körülmények között folyt. Ezt követően a sejteket SNP-vel kezeltük; az egyes SNP-dózisok (20, 50, 100, 200, 400 és 2000 µM) toxicitásának meghatározása során a kezelés időtartama 72 óra volt, míg az SNP-citotoxicitás időfüggésének vizsgálata során 400 µM SNP-kezelést végeztünk 2, 4, 6, 8, 18 és 24 órás időtartamban. Ezt követően az ATP-tartalom mérését a gyártó utasításainak megfelelően végeztük.

#### **3. DNS-fragmentáció vizsgálata**

A kezeléseket megelőző napon mintánként  $10^7$  sejtet ültettünk ki 100 mm-es lemezekre. A kezeléseket követően felkapartuk a sejteket, majd DNS-t izoláltunk. Lizist végeztünk, majd centrifugálással eltávolítottuk a sejttörmeléket. Az így kapott felülúszóból fenol/kloroformos extrakcióval távolítottuk el a fehérjét. A DNS-t 3M nátrium-acetát és 96% etanol segítségével precipitáltuk, a sókat 70% etanollal távolítottuk el, míg az RNS-szennyeződések lebontását RNáz-emésztéssel végeztük. Az így kapott DNS-mintákat etidium-bromidot tartalmazó agaróz gélben futtattuk, majd a gélről a Kodak IS440 CF géldokumentációs rendszerrel készítettünk képeket.

#### **4. Western blot analízis**

Mintánként  $6 \times 10^6$  sejtet ültettünk ki 100 mm-es sejttenyésztő lemezekre. A kezelési idő letelte után felkapartuk a sejteket, majd lizist végeztünk proteáz- és foszfatáz-gátlókat tartalmazó pufferben. A kaszpáz-aktiváció vizsgálata során egy speciális puffert használtunk a fehérje-izoláláshoz (Chaps cell extract buffer). Fehérje-izolálást követően hődenaturációt végeztünk, majd minden minta esetén azonos fehérjemennyiséget használtunk az SDS-poliakrilamid-gélelektroforézishez. Az elektroforézist követően a fehérjét a gélből PVDF membránra blottoltuk át, a vizsgálni kívánt fehérjék detektálásához indirekt módszert használtunk. Ennek során a membránokat tejpor 5%-os oldatában inkubáltuk a nem specifikus kötőhelyek blokkolása végett; ezt követte a vizsgálni kívánt fehérjére specifikus elsődleges antitestben történő inkubáció; végül az elsődleges antitestet felismerő, tormagyökér-peroxidázzal (HRP) konjugált másodlagos antitestet használtunk. A jelet a Kodak IS440

CF géldokumentációs rendszerrel detektáltuk. A következő antitesteket használtuk: anti-P-p38MAPK, anti-p38MAPK, anti-P-JNK, anti-JNK, anti-P-Akt, anti-P-eIF2 $\alpha$ , anti-eIF2 $\alpha$ , anti-P-p53Ser15, anti-P-p53Ser46, anti-p53, anti-CHOP, anti-Bcl-2, anti-Bcl-xL, anti-Bax, anti-kaspáz-8, anti-hasított kaspáz-9, anti-hasított kaspáz-3, anti-ERK1/2, anti-citokróm c, anti-PKR, anti-aktin, anti- $\beta$ -aktin, HRP-konjugált másodlagos anti-nyúl és anti-egér antitestek.

## **5. Citokróm c-felszabadulás vizsgálata**

Mintánként  $6 \times 10^6$  sejtől indultunk ki, melyeket 100 mm-es lemezekben tenyésztettünk. Kezelést követően a sejteket a lemezről felkapartuk és centrifugálással összegyűjtöttük, majd az üledéket felszuszpendáltuk. Az ehhez szükséges puffer tartalmazta azokat a foszfátáz- és proteázgátlókat, amiket a Western blot analízist megelőző fehérje-izolálás során használtunk. A sejtsuszpenziót homogenizáltuk, majd centrifugáltuk. Az így kapott felülúszót újra centrifugáltuk, majd az így nyert posztmitokondriális szupernatánsból citoplazmatikus fehérjéket izoláltunk. Az üledéket felszuszpendáltuk és újabb centrifugálást követően mitokondrium frakcióként használtuk. A citoplazmatikus, illetve mitokondriális fehérjék izolálását a korábban ismertetett módszerrel végeztük.

## **6. Apoptotikus magmorfológia vizsgálata**

Lyukanként  $10^5$  sejtet ültettünk ki üveg fedőlemezekre, 6 lyukú tenyésztőlemez lyukaiba. A kiültetést megelőzően a fedőlemezeket poli-L-lizinnel vontuk be, hogy a sejtek könnyen kitapadjanak rájuk. Másnap a minták fele kis dózisu (100  $\mu$ M) SNP-előkezelésen esett át, majd a következő napon, médiumcserét követően, a sejteket széruméheztetésnek, illetve SNP-, ciszplatin-, tunikamicin- vagy anizomicin-kezelésnek vetettük alá. A kezelési idő letelte után a sejteket fixáltuk, majd a sejtmagi DNS-t fluoreszcencia festékkel (Hoechst 33342) festettük. Lefedést követően a preparátumokat fluoreszcencia mikroszkópban (Olympus BX-61) vizsgáltuk, apoptotikus morfológiájú sejtmagokat keresve.

## **7. Immuncitokémia**

Mintánként  $5 \times 10^3$  sejtet ültettünk ki műanyag fedőlemezekre, 96 lyukú lemez lyukaiba. A kezelési idő letelte után a sejteket fixáltuk és permeabilizáltuk; a nem specifikus kötőhelyek blokkolására tejpor vagy albumin 5%-os oldatát használtuk. Ezt követően a mintákat az elsődleges antitestet tartalmazó oldatban inkubáltuk. A következő napon fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestekkel végeztünk inkubációt; a sejtmagokat Hoechst 33342 fluoreszcencia festékkel tettük láthatóvá. Az egyes lépések között Triton X-100-at tartalmazó pufferrel mostuk a mintákat. Lefedést követően lézer scanning konfokális mikroszkóppal (Olympus FluoView 1000) vizsgáltuk a keresett fehérjék lokalizációját.

## **8. TUNEL-analízis**

A TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling) módszer azon alapszik, hogy az apoptózis során a DNS darabolódása következtében nagy mennyiségben keletkeznek

a 3'-végükön szabad OH-csoporttal rendelkező DNS-fragmentumok. Ezekhez a szabad DNS-végekhez a terminális-transzferáz nevű enzim fluoreszcensen jelölt nukleotidokat kapcsol, a reakció végeredménye fluoreszcencia vagy konfokális mikroszkóppal detektálható. Mintánként  $2 \times 10^4$  sejtet ültettünk ki 96 lyukú sejtenyészítő lemez lyukaiba, műanyag fedőlemezekre. A kiültetést követő napon a minták fele alacsony koncentrációjú ( $100 \mu\text{M}$ ) SNP-előkezelést kapott. A következő napon a sejteket pro-apoptotikus hatásoknak tettük ki (szérummegvonás,  $400 \mu\text{M}$  SNP, ciszplatin, tunikamicin, anizomicin). A kezelési idő letelte után a sejteket fixálással és permeabilizálással készítettük elő a további lépésekre. A terminális-transzferáz által katalizált reakció és a DNS-festés (Hoechst 33342) után lefedtük, majd lézer scanning konfokális mikroszkóppal (Olympus FluoView 1000) vizsgáltuk a mintákat.

## **IV. Eredmények**

### **1. A p143p53PC12 sejtvonal érzékenyebb a nagy dózisu SNP-kezelésre, mint a vad típusu PC12 sejtek**

A sejtek életképességének/viabilitásának vizsgálatára az ún. ATP-assay módszert használtuk, a kezeléseket követően a sejtekben mérhető ATP-tartalomról következtettünk az élő sejtek számára. A vizsgált SNP-koncentrációk közül a  $100 \mu\text{M}$  és annál alacsonyabb dózisok nem voltak citotoxikusak, azonban a  $400 \mu\text{M}$  SNP-vel történő (72 óra időtartamú) kezelés az ATP mennyiségét 10% körüli értékre csökkentette mindkét sejtvonalban; a további kísérletek során ezt az SNP-koncentrációt választottuk az apoptózis előidőzésére. A 20, 50, 100 és  $200 \mu\text{M}$  SNP-vel végzett kezelésekre a p143p53PC12 sejtek érzékenyebben reagáltak, a két sejtvonal közti különbség szignifikáns volt.  $400$  és  $2000 \mu\text{M}$  SNP hatására a sejtek többsége/mindegyike elpusztult. A hosszan tartó (18 és 24 órás)  $400 \mu\text{M}$  SNP-kezelésre a domináns gátló p53 fehérjét expresszáló sejtek szignifikánsan érzékenyebben reagáltak a vad típusu sejteknél.

### **2. Domináns negatív p53 fehérjét expresszáló sejtekben az SNP-kezelés fokozottabb stressz kináz-aktivációt vált ki**

Stressz hatások következtében gyakran megfigyelhető a p38MAPK és a JNK fehérjék foszforilációja. 18 órás,  $400 \mu\text{M}$  SNP-vel történő kezelés mindkét vizsgált sejtvonalban p38MAPK- és JNK-foszforilációt idézett elő, ami a p143p53PC12 sejtvonalban jóval erőteljesebb volt. PC12 sejtekben a stressz kinázok foszforilációja 8 órás SNP-kezelést követően volt a leginkább kifejezett, majd fokozatosan lecsengett. Ezzel szemben a mutáns p53 fehérjével rendelkező sejtvonalban a p38MAPK- és JNK-aktiváció tartósnak bizonyult. A CHOP transzkripciós faktor stressz hatások következtében aktiválódhat, elősegítve az

apoptózis végrehajtásában szerepet játszó fehérjéket (például Bim, DR5) kódoló gének átírását. A CHOP indukciója mindkét sejtvonalban 200  $\mu\text{M}$  SNP hatására volt a legerőteljesebb, annak ellenére, hogy a 400  $\mu\text{M}$  koncentráció jóval toxikusabbnak bizonyult ennél a dózisonál. Hasonlóan a stressz kinázok aktivációjához, a CHOP fehérje mennyiségének növekedése is kifejezettebb és tartósabb volt a p143p53PC12 sejtvonalban.

### **3. A p143p53PC12 sejtvonal fokozott protein kináz R-hasítással és eIF2 $\alpha$ -foszforilációval reagál a 400 $\mu\text{M}$ SNP-kezelésre**

Vírusfertőzés és más hatások a protein kináz R (PKR) aktivációját eredményezhetik, melynek során a PKR fehérje kaspázok által végzett proteolitikus hasításon megy át. Az aktív PKR foszforilálhatja célfehérjéit, többek között az eukarióta iniciációs faktor 2  $\alpha$ -alegységét (eIF2 $\alpha$ ). Az eIF2 $\alpha$  foszforilációját más kinázok is végezhetik, azonban a következmény ezekben az esetekben is a transzláció (iniciációjának) gátlása. Az SNP nagy dózisban (200 és 400  $\mu\text{M}$ ) történő alkalmazása mindkét sejtvonalban PKR-hasítást eredményezett. A 400  $\mu\text{M}$  SNP által kiváltott PKR-aktiváció 8 órás kezelést követően volt a legkifejezettebb, hosszan tartó kezelések (18 és 24 óra) esetén kevésbé volt erőteljes. Az eIF2 $\alpha$  foszforilációja 400  $\mu\text{M}$  SNP-vel történő 18 órás kezelést követően volt a legerőteljesebb; míg a PKR-hasítás tekintetében nem tudtunk megfigyelni jelentős különbséget a két sejtvonal között, az eIF2 $\alpha$  foszforilációja jóval kifejezettebb volt p143p53PC12 sejtekben. Tartós, a kezelés időtartamának növelésével egyre erőteljesebbé váló eIF2 $\alpha$ -foszforiláció csak a mutáns p53 fehérjét expresszáló sejtekben volt megfigyelhető.

### **4. 400 $\mu\text{M}$ SNP erőteljes p53-indukciót és -foszforilációt vált ki p143p53PC12 sejtekben**

A stressz hatások következtében aktiválódó p53 fehérje részben a sejtmagban (transzkripciós faktorként működve), részben pedig a citoplazmában fejti ki hatását. Apoptózist kiváltó hatások következtében gyakran megfigyelhető a 15. és a 46. pozícióban található szerin aminosavak foszforilációja, melynek következményeképpen a fehérje stabilizálódik és fokozza pro-apoptotikus gének átírását. 200 és 400  $\mu\text{M}$  SNP-vel történő kezelés mindkét sejtvonalban a p53 fehérje foszforilációját eredményezte, mindkét említett szerin oldalláncon. A p53-foszforiláció p143p53PC12 sejtekben korábban kezdődött, erőteljesebb és tartósabb volt, mint vad típusú PC12 sejtekben. Normál sejtekben a p53 fehérje nagyon kis mennyiségben van jelen, a sejtet érő stressz hatások erőteljesen megemelik a p53-szintet. A p53 fehérje mennyiségének megnövekedését mindkét sejtvonalban hosszan tartó (18 és 24 órás), 400  $\mu\text{M}$  SNP-vel végzett kezelés után tudtuk megfigyelni.

## **5. Toxikus dózisu SNP-kezelés következtében csökken a Bcl-2 fehérje mennyisége**

Az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérje mennyiségének csökkenése a programozott sejthalál folyamata során megfigyelhető jelenség. Nagy koncentrációjú és hosszan tartó SNP-kezelés mindkét sejtvonalban jelentősen redukálta a Bcl-2-szintet; a mutáns p53 fehérjét expresszáló sejtekben ez a jelenség azonban már rövidebb időtartamú SNP-kezelést követően is detektálható volt.

## **6. A p143p53PC12 sejtvonalban fokozottabb a 400 $\mu$ M SNP hatására bekövetkező citokróm c-felszabadulás és kaspáz-aktiváció**

Az apoptózis intrinsic útjának aktivációja során olyan fehérjék szabadulnak fel a mitokondrium intermembrán teréből, melyek fontos szerepet töltenek be a sejtpusztulás folyamatában. Az egyik ilyen fehérje a citokróm c, melynek a citoplazmába történő kijutása szükséges az iniciátor kaspáz-9 és az effektor kaspáz-3 fehérjék aktivációjához. A p143p53PC12 sejtvonalban korábban detektálható és erőteljesebb volt a citokróm c-felszabadulás, mint PC12 sejtekben. Az anti-apoptotikus Bcl-2 és Bcl-xL fehérjék esetén mennyiségi különbség volt megfigyelhető a két sejtvonal között; mindkét fehérje alacsonyabb koncentrációban volt kimutatható a mutáns p53 fehérjével rendelkező sejtekben. Az SNP nagy koncentrációban (200 és 400  $\mu$ M) történő alkalmazásakor a kaspáz-9 hasított alakja megjelent PC12 sejtekben; a p143p53PC12 sejtvonalban kisebb SNP-dózisok is kaspáz-9-aktivációt váltottak ki. A kaspáz-3 hasított formájának megjelenése csak toxikus SNP-dózis (400  $\mu$ M) alkalmazását követően volt megfigyelhető. A kaspáz-9 és -3 fehérjék hasítása mindkét sejtvonalban 8 órás 400  $\mu$ M SNP-kezelést követően volt a legerőteljesebb, azonban p143p53PC12 sejtekben mindkét kaspáz aktivációja fokozottabb és tartósabb volt.

## **7. 400 $\mu$ M SNP-kezelést követően nem figyelhető meg a p53 fehérje sejtmagba történő transzlokációja**

A p53 fehérje 400  $\mu$ M SNP-kezelést követő intracelluláris elhelyezkedését immuncitokémia segítségével vizsgáltuk. Annak ellenére, hogy 400  $\mu$ M SNP-vel történő 2 órás kezelés után már kimutatható a p53 fehérje foszforilációja, valamint a citokróm c mitokondriumból történő felszabadulása, a mikroszkópos felvételeken nem volt megfigyelhető a p53 fehérje sejtmagi transzlokációja 2 vagy 8 órás kezelés után; e tekintetben a két vizsgált sejtvonal nem mutatott különbséget.

## **8. Kis dózisú SNP-előkezeléssel csökkenthető a 400 µM SNP-kezelés apoptotikus hatása PC12 sejtekben**

A programozott sejthalál folyamatának egyik jellegzetessége a sejtmagi DNS internukleoszómális fragmentációja; 400 µM SNP-vel történő 24 órás kezelés DNS-fragmentációt okozott PC12 sejtekben. Az SNP-indukálta DNS-fragmentáció mértéke csökkenthető volt 24 órán át tartó, kis dózisú (100 µM) SNP- vagy 0,5 mM dbcGMP-előkezeléssel. (100 µM SNP nem citotoxikus PC12 sejtekben.) 24 órás 400 µM SNP-kezelést követően erőteljes JNK- és p38MAPK-foszforiláció volt detektálható PC12 sejtekben. Mindkét stressz kináz foszforilációjának mértékét csökkentette a 100 µM SNP-, illetve a 0,5 mM dbcGMP-előkezelés. Apoptózist kiváltó hatások mérséklék az Akt fehérje foszforilációját, ilyen hatás a 400 µM SNP is. 100 µM SNP- vagy 0,5 mM dbcGMP-előkezeléssel az Akt-foszforiláció csökkenése kevésbé jelentős PC12 sejtekben.

## **9. A 100 µM SNP-előkezelés mérsékli a szérumeheztetés, ciszplatin-, tunikamicin- és anizomicin-kezelések által kiváltott internukleoszómális DNS-fragmentációt**

Szérumeheztetés során a növekedési faktorok megvonása miatt a sejtek a sejtciklus  $G_0$  fázisába kerülnek; amennyiben a szérummegvonás huzamosabb ideig fennáll, a sejtek apoptózissal elpusztulnak. A ciszplatin kemoterápiában alkalmazott vegyület, mely a purin bázisokhoz kötődve keresztkötéseket hoz létre a DNS két lánc között, ezáltal a tumor sejtek elpusztulását eredményezve. A tunikamicin nevű antibiotikum az N-kötésű glikozilációt gátolva ER stresszt okoz, míg az anizomicin a transzláció gátlása révén eredményez apoptózist. A felsorolt kezelések mindegyike pro-apoptotikus hatású, tehát internukleoszómális DNS-fragmentációt okoz PC12 sejtekben. 100 µM SNP-előkezeléssel kivédhető volt a szérumeheztetéssel, valamint a ciszplatin- és tunikamicin-kezelésekkel kiváltott DNS-fragmentáció; azonban az anizomicin-kezeléssel kiváltott DNS-darabolódás mértékét csak kevésbé csökkentette az SNP-előkezelés.

## **10. 100 µM SNP-előkezelés csökkenti egyes kezelések pro-apoptotikus hatását**

PC12 sejteket 400 µM SNP-vel kezelve a sejtek többsége apoptózissal elpusztult; a mintákban nagy számban voltak jelen apoptotikus morfológiájú (erősen kondenzált és fragmentálódott kromatin-állománnyal rendelkező) és sok helyen hasított DNS-t tartalmazó sejtmagok. Az említett elváltozások mértéke csökkenthető volt 100 µM SNP-előkezeléssel. Hasonlóképpen, az előkezelés csökkentette a szérumeheztetéssel és ciszplatin-kezeléssel kiváltott kromatin-kondenzáció és DNS-fragmentáció mértékét, míg tunikamicin-kezelés esetén nem volt jelentős különbség az előkezelt/nem előkezelt minták között. Azonban az



SNP-előkezelést követően végzett anizomicin-kezelés után nagyobb számban voltak a mintákban apoptózisra jellemző morfológiájú sejtmagok, mint az előkezelés nélküli mintákban.

### **11. A kis dózisú SNP-előkezelés mérsékelheti a különféle, apoptózist okozó kezelések által előidézett fehérje-foszforilációt és kaspáz-aktivációt**

400  $\mu$ M SNP-vel történő kezelés következtében megfigyelhető a stressz kinázok, a PKR, az eIF2 $\alpha$ , a p53, a CHOP és a kaspáz fehérjék aktivációja, valamint az anti-apoptotikus Bcl-2 és Bcl-xL fehérjék mennyiségének csökkenése. 100  $\mu$ M SNP-előkezelés mérsékelte a fent említett fehérje-aktivációs változások mértékét, illetve gátolta a Bcl-2 és Bcl-xL fehérjék mennyiségének csökkenését. Egyetlen kivételként a CHOP transzkripciós faktor említhető, melynek indukcióját fokozta az előkezelés. Hasonlóképpen, a széruméheztetéssel és ciszplatin- vagy tunikamicin-kezelésekkel kiváltott p38MAPK- és eIF2 $\alpha$ -foszforiláció, valamint PKR- és kaspáz-hasítás mértéke is csökkenthető volt a kis koncentrációjú SNP-előkezeléssel. Ezzel szemben a ciszplatin-indukálta p53-foszforiláció erősségét nem csökkentette az előkezelés; továbbá a kezelés/előkezelés kombinációk nem változtatták meg érdemben a pro-apoptotikus Bax és az anti-apoptotikus Bcl-2/Bcl-xL fehérjék mennyiségét (kivéve a 400  $\mu$ M SNP-vel történő kezelést). A többi hatással ellentétben az előkezeléssel kombinált anizomicin-kezelés fokozta a kaspáz-aktivációt, a JNK és a p53 fehérjék foszforilációját, valamint megemelte a p53 és a CHOP fehérjék mennyiségét.

### **12. 100 $\mu$ M SNP-előkezelés csökkenti a sejttenyésztő médiumban található TRAIL-molekulák mennyiségét**

A nagy koncentrációval történő SNP-kezelés az intrinsic út aktiválásával vált ki apoptózist az érintett sejtekben, 400  $\mu$ M SNP azonban a főként az extrinsic jelátvitelben közreműködő kaspáz-8 aktivációját is előidézte. A TRAIL fehérje sejtfelszíni receptoraihoz kötődve képes beindítani az apoptózis extrinsic útját, illetve a Bid fehérje hasítása révén az intrinsic apoptózis jelátvitelt is aktiválhatja; emellett jelen lehet a sejtekről lefűződő exoszómákban/mikrovezikulákban is. PC12 sejtek szövettényésztő folyadékában 400  $\mu$ M SNP hatására megnőtt a TRAIL fehérje 34 kDa molekulatömegű formájának mennyisége; a nagy dózisú SNP-kezelést 100  $\mu$ M SNP-előkezeléssel kombinálva ez a jelenség nem volt megfigyelhető.

## V. Megbeszélés

### 1. Nitrozatív stressz

Bár kis koncentrációban a NO elősegítheti a sejt túlélést (a kaszpázok S-nitrozilációja, a *bcl-2* gén expressziójának és a CREB fehérje foszforilációjának fokozása, valamint a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI3K)/Akt-út aktivációja révén), nagy mennyiségben citotoxikus. A NO sejt-károsító hatását azonban nem közvetlenül fejt ki: szabadgyökökkel reagálva reaktív nitrogén származékokat (például peroxinitrit) hoz létre. Amennyiben a különféle reaktív oxigén és nitrogén származékok (az angol kifejezések rövidítése ROS, illetve RNS) szintje jelentősen megemelkedik, a sejtben oxidatív/nitrozatív stressz alakul ki. A peroxinitrit lipid-peroxidációt okoz, valamint a fehérjék tirozin aminosavaihoz irreverzibilisen kötődve azok nitrációját idézi elő, ezáltal többnyire inaktíválva az érintett fehérjéket. A peroxinitrit a sejtben számos fehérjéhez kapcsolódhat, példaként említhetők a hemoglobin, a mioglobin, a citokróm c és a NOS-izofomák. Ismert a peroxinitrit DNS-károsító hatása is: mind a bázisokat (elsősorban a guanint), mind a cukor-foszfát gerincet károsíthatja, egyes láncú DNS-töréseket okozhat, inaktíválhatja a DNS-repair-ben közreműködő enzimeket, valamint a p53 fehérjét.

A sejtben képződő NO fehérjékhez kovalensen kötődve is kifejtheti hatását. A tirozin aminosav(ak) irreverzibilis nitrációja (vagy más néven 3-nitrotirozináció) általában peroxinitrit közvetítésével valósul meg és káros hatású. S-nitroziláció során a NO reverzibilisen kapcsolódik az érintett fehérjében található cisztein aminosav(ak)hoz. Alacsony NO-szint esetén az S-nitrozilációnak fiziológias szabályozó szerepe van; ezzel szemben a NO-koncentráció megnövekedése miatt kialakuló nitrozatív stressz abnormalis S-nitroziláció és nitráció révén gyakran káros hatású a sejtre nézve, ezáltal hozzájárulhat neurodegeneratív betegségek kialakulásához. Tartós és fokozott NO-termelés következtében olyan fehérjék S-nitrozilálódnak, melyek alacsony/fiziológias NO-koncentráció esetén nem, például a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), a PDI és a XIAP.

### 2. Mutáns p53 fehérjék és lehetséges szerepük az apoptózisban

A p143p53PC12 sejt vonal olyan domináns gátló mutáns p53 fehérjét termel, mely a 143-as pozícióban valin helyett alanin aminosavat tartalmaz (V143A). A mutáció a fehérje DNS-kötő doménjét érinti, azonban nem tartozik a daganatokban leggyakrabban mutációt szenvedő, ún. „hot spot” helyek közé. A p53 fehérje tetramer formában képes a DNS-hez kötődni; amennyiben a tetramerben V143A-mutáns p53 is található, a vad típusú p53 sem képes szekvencia-specifikusan kötődni a DNS-hez. A vad típusú és a V143A-mutáns p53

fehérjék eltérő affinitással és specificitással kötődnek a DNS-hez, utóbbi fehérje DNS-kötő képességét és transzkripció aktivitását a hőmérséklet is befolyásolja. Ismert jelenség, hogy a különféle mutáns p53 fehérjék is képesek a DNS-hez kapcsolódni; ilyen esetekben azonban a kötődés szerkezet-specifikus módon valósul meg (nem ismert olyan DNS-szekvencia ugyanis, melyhez a mutáns p53 fehérjék specifikusan kötődnének). Ellentétben a vad típusú p53 fehérje tumor szuppresszor funkciójával, a mutáns p53 fehérjék gyakran fokozzák a sejttúlélést és a sejtosztódást, mivel a vad típusú és a mutáns fehérjék eltérő gének expresszióját szabályozzák. A szóban forgó gének terméke lehet multidrog-transzporter, valamint növekedési faktor-receptorok; ezen fehérjék mindegyike túlműködhet daganatokban. Bár a DNS-kötő doménben található mutáció(k) következtében a mutáns p53 fehérjék gyakran nem képesek a vad típusú p53 által szabályozott gének expresszióját befolyásolni, transzkripció-független mechanizmusok révén mégis képesek apoptózist indukálni.

### **3. A NO serkenti az intrinsic apoptózis-jelátvitelt PC12 sejtekben**

A PC12 sejtek nitrozatív stressz indukálta apoptózisában közreműködő jelátviteli mechanizmusok vizsgálata során SNP-t használtunk NO-donorként. Az SNP nagy koncentrációban (400  $\mu$ M) apoptózist okozott vad típusú PC12 és mutáns p53 fehérjével rendelkező p143p53PC12 sejtekben. A NO főként a belőle képződő peroxinitrit DNS-károsító hatása révén okoz sejtpusztulást. A DNS-károsodás következtében foszforilálódik a p53 fehérje; a szerin-15 foszforilációja a fehérje stabilizációjához vezet, míg a szerin-46-ot érintő foszforiláció elősegíti a p53 mitokondriális transzlokációját és az apoptózist. 400  $\mu$ M SNP-kezelést követően a p53 fehérje mindkét említett aminosavon foszforilálódott, valamint emelkedett a fehérje mennyisége is. A p53 fehérje egyrészt képes fokozni a Bcl-2 család pro-apoptotikus tagjait (például Bax, Puma, Noxa) kódoló gének expresszióját, másrészt transzkripció-független mechanizmussal is hozzájárulhat az apoptózishoz. Utóbbi esetben a p53 „BH3-only” fehérjeként viselkedve (Bax/Bak aktivációja és Bcl-2/Bcl-xL gátlása révén) segíti elő a mitokondrium külső membránjának permeabilizálását, valamint a citokróm c és más pro-apoptotikus fehérjék felszabadulását a mitokondrium intermembrán teréből. A citokróm c citoplazmába jutását követően megtörténik a kaszpáz-9, majd a kaszpáz-3 fehérjék aktivációja, ami a sejt apoptózissal történő elpusztulását eredményezi. 400  $\mu$ M SNP-kezelést követően detektálható volt a citokróm c kijutása a mitokondriumból, valamint a kaszpáz-9 és kaszpáz-3 fehérjék aktivációja is. Ezen eredmények alapján az SNP és a belőle felszabaduló NO az intrinsic utat serkentve okoz apoptózist PC12 sejtekben.

#### 4. A p143p53PC12 sejtvonala érzékenyebben reagál a NO toxikus hatására

400  $\mu$ M SNP sejtpusztulást okozott vad típusú PC12 és p143p53PC12 sejtekben is, azonban a mutáns p53 fehérjével rendelkező sejtek érzékenyebbek voltak az SNP citotoxikus hatására. A vizsgált jelátviteli fehérjék aktivációját és mennyiségét érintő változások mindegyike kifejezettebb és/vagy tartósabb volt a p143p53PC12 sejtvonalaiban. A V143A-mutáns p53 fehérjét expresszáló sejtekben hamarabb bekövetkezett a p53-foszforiláció és a p53-szint emelkedése, valamint gyorsabban történt meg a citokróm c felszabadulása a mitokondriumból. Ezzel az eredménnyel egybevágóan a két sejtvonala között eltérés mutatkozott a kaszpáz-9 és -3 fehérjék hasításának időbeli lefutásában és erősségében is: p143p53PC12 sejtekben hamarabb kezdődött, tartósabb és fokozottabb volt a kaszpáz-aktiváció. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a p143p53PC12 sejtvonala azért reagál érzékenyebben az SNP-kezelésre, mert ezekben a sejtekben az intrinsic apoptózis út erőteljesebben aktiválódik, mint vad típusú PC12 sejtekben.

A p53 fehérje 46-os pozíciójában található szerin aminosav foszforilációja elősegíti a p53 mitokondriális transzlokációját, a szerin-46 foszforilációjáért a stressz kináz p38MAPK is felelős lehet. Más adatok szerint a p53 mitokondriumba jutását a szerin-15 foszforilációja is elősegítheti. A p143p53PC12 sejtvonalaiban korábban következett be erőteljes p38MAPK-aktiváció és a p53 fehérje szerin-46 foszforilációja, mint vad típusú PC12 sejtekben. Vagyis a V143A-mutáns p53 fehérjével rendelkező sejtekben korábban és hatékonyabban következhetett be a p53 mitokondriális transzlokációja; ez lehet az egyik mechanizmus, mely a p143p53PC12 sejtvonala fokozott NO-érzékenységének hátterében áll.

A p53 fehérje nemcsak génindukciót, hanem repressziót is kiválthat; a *bcl-2* gén expressziójának gátlását indirekt módon, a TATA-kötő fehérjéhez (TBP) kapcsolódva hajtja végre. A p53-TBP kapcsolat a p53 fehérje N-terminálisán található transzaktivációs vagy a C-terminális részét képező oligomerizációs domén közreműködésével valósul meg; vagyis nem szükséges hozzá a DNS-kötő domén, mely a V143A-mutáns p53 fehérje esetében a pontmutációt tartalmazza. Vad típusú PC12 sejtekkel összehasonlítva a p143p53PC12 sejtvonala SNP-kezelés hiányában is kisebb mértékben expresszálta a Bcl-2 fehérjét, a 400  $\mu$ M SNP-kezelés időtartamának növelésével tovább csökkent a sejtekben a Bcl-2 szintje. Lehetséges, hogy a V143A-mutáns p53 fehérjék képesek – akár indirekt módon is – gátolni a Bcl-2 expresszióját, ezáltal fokozottan érzékennyé téve a p143p53PC12 sejtvonala a NO toxikus hatásával szemben.

A mutáns p53 fehérjével rendelkező sejtek NO-dal szembeni fokozott érzékenységéhez hozzájárulhat az is, hogy a NO által kiváltott ER stressz következtében indukálódik a CHOP transzkripciós faktor, mely szintén képes represszálni a *bcl-2* gént. Ezt a

feltételezést támasztja alá az a megfigyelés, hogy p143p53PC12 sejtekben a 400  $\mu$ M SNP-kezelés erőteljes CHOP-indukciót váltott ki; míg ez vad típusú PC12 sejtekben jóval kevésbé volt kifejezett.

### **5. 100 $\mu$ M SNP-előkezelés csökkenti egyes pro-apoptotikus hatások erősségét**

Az SNP, a belőle felszabaduló NO és az abból képződő peroxinitrit PC12 sejtek mellett más sejtvonalakban is apoptózist vált ki; az egyes sejtípusok NO-érzékenysége azonban eltérő lehet. PC12 sejtekben már 400  $\mu$ M SNP is sejtpusztulást okoz, RAW264 egér makrofág sejtekben az ehhez szükséges koncentráció 4 mM. 4 mM SNP-kezelés hatására RAW264 sejtekben foszforilálódik a p38MAPK, illetve konformáció-változáson megy át és a mitokondriumhoz transzlokálódik a Bax fehérje, előidézve a citokróm c felszabadulását a mitokondriális intermembrán térből. Mindezek a folyamatok gátolhatóak, ha a nagy koncentrációjú SNP-kezelést megelőzően a sejtek 100  $\mu$ M SNP- vagy 0,5 mM dbcGMP-előkezelést kapnak.

PC12 sejtekben 400  $\mu$ M SNP apoptózist váltott ki; ez együtt járt a DNS internukleoszómális darabolódásával és számos fehérje aktivitásának/mennyiségének megváltozásával. 100  $\mu$ M SNP vagy 0,5 mM dbcGMP előkezelésként történő alkalmazása mérsékelte az SNP által kiváltott internukleoszómális DNS-fragmentációt, a stressz kinázok aktivációját, valamint az Akt-foszforiláció csökkenését PC12 sejtekben. Ezek alapján valamely, a NO kis koncentrációja által aktivált jelátviteli út/mechanizmus sejt túlélést serkentő/sejtpusztulást gátló hatása érvényesül az előkezelés következtében.

Annak eldöntésére, hogy a 100  $\mu$ M SNP-előkezelés képes-e az apoptózis általános érvényű gátlására, PC12 sejteket egyéb apoptózist kiváltó hatásoknak (széruméheztetés, kezelés ciszplatinnal, tunikamicinnel vagy anizomicinnel) tettünk ki. Hasonlóan az SNP-kezeléshez, a fent említett hatások mindegyike képes aktiválni az apoptózis intrinsic útját. 100  $\mu$ M SNP-vel végzett előkezelés alkalmazásakor kevésbé erőteljes DNS-fragmentációt detektáltunk szérummegvonást, illetve ciszplatin- vagy tunikamicin-kezelést követően, mint SNP-előkezelés hiányában. Más apoptózis-detektáló technikák (magmorfológia vizsgálata és TUNEL-módszer) hasonló eredményre vezettek: az előkezelés csökkentette az SNP, a széruméheztetés és a ciszplatin által kiváltott apoptózis mértékét; tunikamicin-kezelés esetén az előkezelés hatása nem volt jelentős. Western blot vizsgálatok eredményei alapján azonban nem kaptunk egységes képet arról, hogy az alacsony koncentrációjú SNP-előkezelés milyen mechanizmussal képes az apoptózis részleges kivédésére. A 100  $\mu$ M SNP-előkezelés csökkentette a 400  $\mu$ M SNP, széruméheztetés, ciszplatin és tunikamicin által kiváltott p38MAPK-foszforiláció mértékét. Ez vezethetett a kaszpáz-9 és -3 fehérjék aktivációjának és

következetesen a sejtpusztulás mértékének csökkenéséhez. A pontos mechanizmus azonban, mely az előkezelést követően az apoptózis részleges gátlásához vezet, még nem ismert.

A p38MAPK-aktivációt számos különféle stressz hatás kiválthatja (oxidatív stressz, DNS-károsodás, stb.). A kis koncentrációjú SNP-előkezelés gátolhatja a p38MAPK-foszforilációt közvetítő MAPKKK és MAPKK enzimeket; másik lehetséges alternatívaként felmerül a p38MAPK defoszforilációjáért felelős foszfatázok aktivációja.

## **6. Az SNP-előkezelés fokozza az anizomicin-indukálta sejtpusztulás mértékét**

Az alkalmazott citotoxikus szerek közül az anizomicin a fent említettektől eltérően viselkedett: a magmorfológia vizsgálata és a TUNEL-esszé eredményei alapján a 100  $\mu$ M SNP-előkezeléssel kombinált anizomicin-kezelés hatékonyabban indukált apoptózist, mint önmagában az anizomicin. A Western blot eredmények is ezt a megfigyelést támasztották alá; bár 100  $\mu$ M SNP-előkezeléssel csökkenthető volt az anizomicin-indukálta p38MAPK-foszforiláció, az anizomicin-kezeléseket megelőző SNP-előkezelés több fehérje aktivációját is fokozta (például JNK, PKR, p53, kaspázok). Elképzelhető, hogy az általunk alkalmazott dózisban (1  $\mu$ g/ml) az anizomicin fehérjeszintézist gátló és ezáltal apoptózist indukáló hatása olyan erőteljes, hogy az SNP-előkezeléssel nem gátolható.

## **7. A TRAIL fehérje lehetséges szerepe PC12 sejtek apoptózisában**

Bár az általunk apoptózis kiváltására használt kezelések mindegyike az intrinsic jelpályát aktiválja, mégis detektálható volt minden esetben a jellemzően az extrinsic útban szerepet játszó kaspáz-8 aktivációja. A kaspáz-8-aktiváció lehetséges magyarázata lehet a sejtekben az extrinsic apoptózis jelátvitel valamilyen ún. halál-ligand általi aktivációja; ezen feltételezés alátámasztására vizsgáltuk a sejttenyésztő folyadékban a TRAIL fehérje mennyiségét. A TRAIL transzmembrán formájának jelenléte a médiumban arra utal, hogy a sejtekről apoptotikus testek vagy extracelluláris vezikulák fűződhetnek le. Utóbbiak két típusa mikrovezikula és exoszóma néven ismert, a két típus méretben és a kialakulás módjában is különbözik. Elsődleges feladatuk a sejtek közötti kommunikáció, azonban megjelenésük betegségekhez is köthető. Fehérjéket, lipideket és nukleinsavakat (mRNS-ek, valamint miRNS-ek és egyéb nem kódoló RNS-ek) szállítanak.

TRAIL-t expresszáló K562 sejtek olyan exoszómákat termelnek, melyek tumor sejtekhez kötődve azokban apoptózist indukálnak. Elképzelhető, hogy PC12 sejtekről olyan extracelluláris vezikulák fűződnek le, melyek membránjukban TRAIL-molekulákat tartalmaznak. A TRAIL ezt követően a neki megfelelő sejt felszíni receptorhoz kötődve autokrin/parakrin módon serkentheti az extrinsic jelátvitelt. Ezt a még bizonyítást igénylő

feltételezést támaszthatja alá az is, hogy a 400  $\mu\text{M}$  SNP-kezelést megelőző előkezelés csökkenti a médiumban található TRAIL-szintet és a kaszpáz-8 aktivációjának mértékét is.

## **8. A munka gyakorlati jelentősége**

A központi idegrendszert érintő betegségek egyik gyakori jellemzője, hogy a neuronokban abnormális konformációjú fehérjék képződnek, melyek felhalmozódása ER stresszt vált ki. Ennek célja lehetőség szerint az ER-ra nehezedő terhelés megszüntetése a transláció gátlása és a nem megfelelő konformációjú fehérjék szerkezetének „kijavitása” révén. A helyes fehérje-konformáció kialakítását chaperone fehérjék végzik, ezek egyike a PDI; a PDI másik feladata a nem megfelelő helyen létrejött diszulfid-hidak átrendezése. Amennyiben a fehérje-homeosztázis helyreállítása nem valósul meg, a sejt apoptózissal elpusztul. A PDI-család különféle izoformáinak abnormális működése az idegrendszert érintő számos betegségben (Alzheimer-kór; Parkinson-kór; Creutzfeldt-Jakob betegség; amyotrophiás lateral sclerosis, ALS) kimutatható. Alzheimer-kórban az amyloid- $\beta$  peptidből létrejött plakkok, valamint a tau fehérje aggregációja figyelhető meg. Parkinson-kórban az abnormális konformációjú  $\alpha$ -synuclein fehérjét tartalmazó, ún. Lewy-testek jönnek létre a dopaminerg neuronokban, míg Huntington-kórban a huntingtin fehérje képez hatalmas komplexeket. ALS-ben szenvedő betegek idegsejtjeiben a szuperoxid-dizmutáz (SOD), a neurofilamentum és egyéb fehérjék által létrehozott aggregátumok alakulnak ki. A fehérje-aggregátumok kialakulásáért felelős lehet az idegsejteket érintő oxidatív és nitrozatív stressz. A nitrozatív stressz következményeként egyes fehérjék abnormális S-nitroziláción mennek át; ennek következtében hibás konformációjú fehérjék képződhetnek, zavart szenvedhet a mitokondriumok működése és a transzkripció folyamata, károsodhatnak az idegsejtek és a szinapszisok, mindez neurodegeneratív kórképek kialakulását vonhatja maga után. A Parkinson-kór kialakulásához hozzájárulhat a parkin nevű ubikvitin-ligáz S-nitrozilációja. Ennek következtében csökken a parkin aktivitása és a proteaszómális fehérje-degradáció hatékonysága, hozzájárulva a Lewy-testek kialakulásához és az idegsejt-pusztuláshoz. Abnormális S-nitroziláció gátolja a PDI működését is, elősegítve a korábban említett fehérje-aggregációt. Az S-nitroziláció mellett a jellemzően a peroxinitrit közvetítésével megvalósuló fokozott mértékű nitráció is fontos szerepet tölthet be egyes betegségek kialakulásában. A tirozin (és jóval kisebb gyakorisággal triptofán) aminosavak nitrációja az érintett fehérje működésének gátlásához, illetve fehérje-aggregátumok képződéséhez vezethet. Az  $\alpha$ -synuclein nitrációja Parkinson-kórban, míg a tau fehérje és az amyloid- $\beta$  peptid nitrációja Alzheimer-kórban mutatható ki, de a tirozin-nitráció az ALS, kardiovaszkuláris és gyulladáscsökkentő betegségek, valamint a diabetes kialakulásában is szerepet játszhat.

A NO-nak kettős szerepe lehet a tumor képződésben. Egyrészt gátolhatja azt, függően a NO-behatás időtartamától/erősségétől, a sejtípustól és a sejt NO-érzékenységétől. Másfelől a NO által kiváltott DNS-károsodás mutációkat okozhat, valamint a NO hatására fokozódhat a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) expressziója (angiogenezist eredményezve), illetve a guanilat-cikláz és a MAPK-jelátvitel aktivációja következtében fokozódhat a tumor sejtek migrációs és inváziós képessége.

A PC12 sejtvonalt széles körben használt idegsejt-jellegű modellrendszer, mivel ezek a sejtek idegi növekedési faktor (NGF) hatására neuronális differenciáción mennek át. Tehát PC12 sejtek SNP indukálta apoptózisa megfelelően modellezheti az idegsejtekben kialakuló nitrozatív stressz körülményeit. A nagy NO-koncentráció citotoxikus hatásának kis NO-dózissal történő kivédése megteremtheti annak elvi lehetőségét, hogy a nitrozatív stressz által kiváltott idegsejt-pusztulás mértéke hasonló hatásokkal mérsékelhető legyen.

## **VI. A munka során tett új megfigyelések**

A 400  $\mu$ M SNP által kiváltott nitrozatív stressz:

- apoptózist okoz PC12 sejtekben.
- nagyobb mértékű sejtpusztulást okoz a domináns gátló mutáns p53 fehérjét expresszáló p143p53PC12 szubklónban, mint vad típusú PC12 sejtekben.
- a p143p53PC12 sejtvonalon az intrinsic apoptózis jelátvitel erőteljesebb aktivációját váltja ki.
- megemeli a TRAIL mennyiségét PC12 sejtek médiumában.

Vad típusú PC12 sejtekben a 100  $\mu$ M SNP-előkezelés:

- részben gátolja a 400  $\mu$ M SNP által kiváltott sejtpusztulást.
- csökkenti a széruméheztetés, ciszplatin és tunikamicin által indukált apoptózis mértékét, feltehetően az apoptózis intrinsic útjának gátlásával.
- fokozza az anizomicin citotoxikus hatását.



## **Köszönetnyilvánítás**

Ezúton is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Szeberényi József professzor úrnak, aki a kezdetektől segítette munkámat. Rengeteg segítséget kaptam tőle a kísérletek megtervezésében, a közlemények megírásában és a dolgozat végleges formába öntésében. Hálás vagyok egykori TDK-témavezetőmnek, azóta pedig közvetlen munkatársamnak, dr. Bátor Juditnak. Bármilyen kérdéssel fordultam hozzá, mindig számíthattam azonnali segítségére és türelmére, legyen az gyakorlati vagy elméleti jellegű probléma. Köszönöm Potzné Árvai Zitának a kísérletek kivitelezésében nyújtott sok segítséget. Szeretnék köszönetet mondani ifj. dr. Sétáló Györgynek a konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatokban nyújtott segítségéért és dr. Pap Mariannának, aki rendelkezésemre bocsátotta a p143p53PC12 sejtvonalat. Köszönöm Schipp Renáta együttműködését eredményeink megvitatásában. Hálás vagyok továbbá Németh Maricának, dr. Balogh Andrásnak és Koloszar Ibolyának a kísérletes munkát segítő tanácsaikért. Köszönet illeti az Orvosi Biológiai Intézet minden további dolgozóját. Szeretném megköszönni dr. Szereday Lászlónak és dr. Kvell Krisztiánnak az előbíráló gondos átolvasását, véleményüket és tanácsaikat. Köszönöm családomnak és barátaimnak a szeretetüket és támogatásukat.

## Közlemények

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- Judit Varga**, Judit Bátor, Márton Péter, Zita Árvai, Marianna Pap, György Sétáló Jr., József Szeberényi: The role of the p53 protein in nitrosative stress-induced apoptosis of PC12 rat pheochromocytoma cells. *Cell Tissue Res.* 2014. Oct; 358(1): 65-74. (2014) **IF: 3,565**
- Judit Varga**, Judit Bátor, Gergő Nádasdi, Zita Árvai, Renáta Schipp, and József Szeberényi: Partial protection of PC12 cells from cellular stress by low-dose sodium nitroprusside pre-treatment. *Cell Mol Neurobiol.* 2016. Oct; 36(7): 1161-1168. (2016) **IF: 2,328 (2015)**

### Egyéb impakt faktoros közlemények

- Judit Bátor, **Judit Varga**, Gergely Berta, Tamar Barbakadze, David Mikeladze, Jeremy Ramsden, József Szeberényi: Sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, fails to bypass the block of neuronal differentiation in PC12 cells imposed by a dominant negative Ras protein. *Cell Mol Biol Lett.* 2012. Sep; 17:(3) 323-332. (2012) **IF: 1,953**
- Judit Bátor, **Judit Varga**, József Szeberényi: The effect of sodium nitroprusside on survival and stress signaling in PC12 rat pheochromocytoma cells expressing a dominant negative RasH mutant protein. *Biochem Cell Biol.* 2013. Aug; 91:(4) 230-235. (2013) **IF: 2,350**

### A témához kapcsolódó konferenciák

- Bátor Judit, Varga Judit, Szeberényi József: Nitrogén-oxid hatása PC12 sejtek jelátvitelére, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Eger, 2005 (Absztrakt: E85)
- Varga Judit, Bátor Judit, Stark Borbála, Harci Alexandra, Tarjányi Oktávia, Szeberényi József: Nitrogén-oxid szerepe PC12 patkány pheochromocytoma sejtek apoptózisában, XIV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Balatonfüred, 2007 (Absztrakt: P114.)
- Varga Judit, Harci Alexandra, Stark Borbála, Péter Márton, Bátor Judit, Szeberényi József: P53 fehérje szerepe PC12 patkány pheochromocytoma sejtek nitrogén-oxid indukálta apoptózisában, Semmelweis Egyetem PhD Tudományos Napok, Budapest, 2007 (Absztrakt: P-II/5.)
- Judit Bátor, Judit Varga, Márton Péter, Marianna Pap, József Szeberényi: The role of p53 protein in nitric oxide induced cell death of PC12 cells, EMBO Meeting on Cellular Signaling and Molecular Medicine, Horvátország, Cavtat, 2008 (Absztrakt: P48)
- Judit Varga, Judit Bátor, József Szeberényi: Nitric oxide-induced apoptosis of PC12 cells, 33<sup>rd</sup> FEBS Congress and 11<sup>th</sup> IUBMB Conference, Athén, Görögország, 2008 (Absztrakt: PP7A-90)
- Varga Judit, Bátor Judit, Péter Márton: A p53 fehérje szerepe PC12 sejtek nitrogén-oxid indukálta apoptózisában, Biológus Doktoranduszok Konferenciája, Pécs, 2009
- Varga Judit: A nitrogén-oxid szerepe a sejthalál folyamatában. Magyar Biológiai Társaság Szakülése, Pécs, 2009

- Varga Judit, Bátor Judit, Péter Márton, Pap Marianna, ifj. Sétáló György, Szeberényi József: Domináns gátló p53 fehérjét expresszáló PC12 sejtek fokozottabban érzékenyek a nitrogén-oxid apoptotikus hatására, XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011 (Absztrakt: O093)
- Judit Varga, Judit Bátor, Marianna Pap, György Sétáló Jr., József Szeberényi: PC12 cells expressing a mutant p53 protein are more susceptible to the cytotoxic effects of sodium nitroprusside, 2nd International Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2013 (Absztrakt: O-12)
- Varga Judit, Bátor Judit, Nádasdi Gergő, Szeberényi József: Stressz hatások okozta apoptózis részleges kivédése PC12 sejtekben, VIII. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2015 (Poszter: 28.)

### **Egyéb, a témához nem kapcsolódó konferenciák**

- 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
- Stark Borbála, Berta Gergely, Tarjányi Oktávia, Harci Alexandra, Varga Judit, Ifj. Sétáló György és Szeberényi József: MG-132 jelátviteli és morfológiai hatásai patkány feokromocitoma tenyészetekben, Magyar Biokémiai Egyesület 2006. évi Vándorgyűlése, Pécs, 2006
- 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
- Bátor Judit, Varga Judit, Szeberényi József: Manumycin kezelés hatása PC12 sejtek NGF indukálta differenciációjára, Semmelweis Egyetem PhD Tudományos napok, Budapest, 2006 (Absztrakt: P-II/18.)
- Varga Judit, Bátor Judit, Tarjányi Oktávia, Szeberényi József: A Ras fehérje szerepe PC12 sejtek nitrogén-oxid indukálta apoptózisában, Semmelweis Egyetem PhD Tudományos Napok, Budapest, 2009 (Absztrakt: E-VIII/6)
- Bátor Judit, Varga Judit, Szeberényi József: Ras-függő és Ras-független jelátviteli utak szerepe PC12 sejtek nitrogén-monoxid indukálta apoptózisában, XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Nyíregyháza, 2009 (Absztrakt: ES04)
- Bátor Judit, Varga Judit: Nitrogén monoxid neuronális differenciációt és apoptózist befolyásoló jelátvitelének Ras-függése, Biológus Doktoranduszok Konferenciája, Pécs, 2009
- Judit Bátor, Judit Varga, József Szeberényi: Pro-apoptotic and pro-survival effects of sodium nitroprusside in PC12 cells expressing a dominant inhibitory RasH protein, 1st International Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2012 (Absztrakt: O-03)
- Judit Bátor, Judit Varga, József Szeberényi: Effect of sodium nitroprusside on nerve growth factor induced differentiation of PC12 cells, 2nd International Doctoral Workshop on Natural Sciences, Pécs, 2013 (Absztrakt: O-13)