

# **Jelátviteli folyamatok a sejtmagban**

(doktori értekezés)

Dr. Csermely Péter

1993

# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b>	<b>1</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés</b>	
<i>2.1. Biokémiai szabályozó mechanizmusok lehetséges támadáspontjai a sejtmagban</i>	
2.1.1. Bevezetés: a sejtmag szerkezete	3
2.1.2. Transzportfolyamatok a sejtmag és a citoplazma között	
2.1.2.1. Iontranszport	4
2.1.2.2. Fehérjetranszport	6
2.1.2.3. RNS-transzport	11
2.1.3. A sejtmagon belüli folyamatok szabályozása	
2.1.3.1. Szabályozás a DNS harmadlagos szerkezete, a nukleoszómák szintjén	16
2.1.3.2. Szabályozás a DNS magasabb szerkezeti szintjein	26
2.1.3.3. Öröklődés a szabályozásban: a következő sejtciklusra áthúzódó szabályozás	27
<i>2.2. A hő-sokk fehérjék lehetséges szerepe a sejtmag jelátviteli folyamataiban</i>	
2.2.1. Bevezetés: a hő-sokk fehérjék funkciója, felosztása	29
2.2.2. A sejtmag hő-sokk fehérjéi	37
2.2.3. Hő-sokk fehérjék szerepe a sejtmag transzportfolyamataiban	39
2.2.4. Hő-sokk fehérjék szerepe a replikációban és a transzkripcióban	
2.2.4.1. Hő-sokk fehérjék szerepe a replikációban	42
2.2.4.2. Hő-sokk fehérjék szerepe a transzkripcióban -- transzkripció hő-sokk esetén, magreceptorok	44
2.2.5. Hő-sokk fehérjék az orvostudományban	
2.2.5.1. A hő-sokk fehérjék szerepe a fertőzések leküzdésében és az autoimmun betegségekben	51
2.2.5.2. Hő-sokk fehérjék a rákos megbetegedésekben	53
2.2.5.3. Hő-sokk fehérjék és ischaemia	54
2.2.5.4. Prionok: molekuláris anti-chaperonok?	55
2.2.5.5. Hő-sokk fehérjék az autodegeneratív betegségekben	55
2.2.5.6. A hő-sokk fehérjék az öregedésben	56
<i>2.3. Az inzulin növekedési hormon jellegű hatásai, mint a sejtmagban lezajló jelátviteli folyamatok egy példája</i>	
2.3.1. Inzulin hatásai a plazmamembránban	57
2.3.2. Az inzulin kiváltotta jel lehetséges útjai a sejtmagig	64
2.3.3. Inzulin hatásai a sejtmagban	69
2.3.4. Az inzulin sejtmagra gyakorolt hatásainak orvostudományi vonatkozásai	72
<b>3. Célkitűzések</b>	<b>74</b>

#### 4. A felhasznált vizsgálati módszerek összefoglalása

4.1.	Biokémiai módszerek: sejtfractionálás, fehérjeizolálás, fehérjefoszforiláció, fehérje kináz aktivitás vizsgálata, foszfoamino-sav-analízis, immunprecipitáció, immunoblot	76
4.2.	Sejtbiológiai módszerek: sejtek tenyésztése és differenciációja, ionok sejten belüli koncentrációjának meghatározása fluoreszcenciás úton és magmágneses rezonancia méréssel, fehérje kináz C lokalizációja digitális képfelbontással	80
4.3.	Analitikai módszerek: fehérjekoncentráció meghatározás, röntgen-fluoreszcencia-spektrometria, plazmaemissziós spektrofotometria, cirkuláris dikroizmus mérések, Fourier-transzformált IR spektroszkópia	81

#### 5. A kísérleti eredmények összefoglalása

5.1.	<i>A fehérje kináz C aktivációjának kapcsolata a sejtmagbeli jelátviteli folyamatokkal</i>	
5.1.1.	A cink szerepe fehérje kináz C aktivációjában és transzlokációjában	83
5.1.2.	A fehérje kináz C aktivációjának hatása a cink sejten belüli megoszlására	88
5.2.	<i>A 90 kDa molekulatömegű h<sub>o</sub>-sokk fehérje (hsp90) lehetséges szerepe a sejtmag jelátviteli folyamataiban</i>	
5.2.1.	A hsp90, mint ATP-kötésre és autofoszforilációra képes fehérje	88
5.2.2.	ATP hatása a hsp90 konformációjára	91
5.2.3.	A hsp90 autoproteolízise	93
5.2.4.	A hsp90 kölcsönhatásai a kromatinnal	95
5.3.	<i>Inzulinfüggő jelátviteli folyamatok a sejtmagban</i>	
5.3.1.	Inzulin-indukált DNS-kötő foszfofehérjék a sejtmagban	98
5.3.2.	A lamin A és C inzulinfüggő foszforilációja	100
5.3.3.	A nukleolin inzulinfüggő foszforilációja és defoszforilációja mint a sejtmagbeli inzulinfüggő rRNS-transzport lehetséges mechanizmusa	100

#### 6. Az eredmények megbeszélése

6.1.	A fehérje kináz C tartós aktivációja, mint a citoplazma és a sejtmag közötti jelátvitel egy lehetséges példája	103
6.2.	A hsp90 ATP-kötésének, autofoszforilációjának és autoproteolízisének lehetséges szerepe a fehérje funkciójában	105
6.3.	A hsp90 kölcsönhatásai a kromatinnal	108
6.4.	Inzulinfüggő jelátviteli folyamatok a sejtmagban	110
6.5.	Eredményeinkből levonható általános következtetések	111
6.6.	Az eredmények lehetséges orvostudományi vonatkozásai	112

#### 7. A kutatás további irányai

#### 8. Köszönetnyilvánítás

#### 9. Irodalomjegyzék



## Ábrák jegyzéke

1. ábra	Sejtmagbéli jelátviteli folyamatokkal és hő-sokk fehérjékkel foglalkozó tudományos közlemények az utóbbi 15 évben	2
2. ábra	A sejtmag vázlatos szerkezete	3
3. ábra	A kalcium-metabolizmussal összefüggő folyamatok a sejtmagban	4
4. ábra	A sejtmagmembrán póruskomplexének szerkezete	7
5. ábra	Nukleáris lokalizációs szignál	8
6. ábra	A splicing-ban részt vevő U RNS kialakulásának és transzportjának vázlatos mechanizmusa	14
7. ábra	Az mRNS transzport szabályozásának főbb mechanizmusai	15
8. ábra	A DNS másodlagos, harmadlagos, negyedleges és ötödleges szerkezete	16
9. ábra	A torziós feszültség hatása a nukleoszmák szerkezetére	18
10. ábra	Az NFkB aktiválásának mechanizmusa	21
11. ábra	A hsp70/dnaJ komplex részvétele a mitochondriumba irányuló fehérje-transzportban	34
12. ábra	A szteroidreceptorok transzformációját befolyásoló körülmények	49
13. ábra	Az inzulinreceptor vázlatos szerkezete és az inzulin hatásmechanizmusának két lehetséges iránya	58
14. ábra	Az inzulin által aktivált fehérje kináz kaszkád	67
15. ábra	Inzulin hatásai a sejtmagban	70
16. ábra	DNS-kötő foszfofehérjék izolálásának vázlatos menete	77
17. ábra	Az 5-F-BAPTA indikátor 19-F-NMR spektruma különböző cinkkoncentrációk esetén	84
18. ábra	A fehérje kináz C aktivitásának és forbol észter kötésének változása a szabad cinkkoncentráció függvényében	85
19. ábra	A fluoreszcens TPA analóg, nitrobenz-TPA megoszlása U937 sejtekben	86
20. ábra	A fehérje kináz C kötődése DNS-cellulóz oszlophoz	87
21. ábra	TPA hatása különböző elemek megoszlására nyúl timocitákban	88
22. ábra	A 90 kDa-os hő-sokk fehérje (hsp90) autofoszforilációja és kovalens jelölése azido-ATP-vel	89
23. ábra	A heparin agaróz kromatográfiával meg nem tisztított hsp90 foszforilációjának pH függése Ca-ATP és MgATP jelenlétében	90
24. ábra	Patkánymáj citoszol foszforilációja különböző kétértékű kationok jelenlétében	91
25. ábra	A hsp90 cirkuláris dikroizmus spektruma	92
26. ábra	hsp90 Fourier-transzformált infravörös spektruma ATP nélkül valamint 0.5 mM ATP és 10 mM CaCl <sub>2</sub> jelenlétében	92
27. ábra	A hsp90 kalciumfüggő proteolízise SDS-PAGE-n történő tisztítása és renaturációja után	94
28. ábra	A hsp90 kötődése hiszton-agarózhoz (A) és hatása a H1-es hiszton DNS-hez való kötődésére (B)	95
29. ábra	A hsp90 hatása a patkánymáj-kromatin cirkuláris dichroizmus spektrumára	96
30. ábra	Patkánymáj-kromatin 264 nm-nél mutatott cirkuláris dichroizmus maximumának változása NaCl hatására hsp90 távollétében és jelenlétében	98
31. ábra	Inzulinfüggő fehérjefoszforiláció adipocitává differenciált 3T3-442A sejtek sejtmagjában	99



32. ábra	DNS-kötő fehérjék inzulinfüggő foszforilációja adipocitává differenciált 3T3-442A sejtekben	99
33. ábra	A lamin A/C inzulinfüggő foszforilációja	101
34. ábra	A nukleolin foszforilációjának és a sejtmag rRNS transzportjának változásai az inzulinkoncentráció függvényében	101
35. ábra	A fehérje kináz C és a cink ionok kölcsönhatásai	104
36. ábra	A hsp90 konformációváltozása	106
37. ábra	"Poly-Glu"-szekvencia a hsp90 centrális domainjában	109
38. ábra	Inzulinfüggő folyamatok a sejtmagban: a lamin A/C és a nukleolin szerepe	110
39. ábra	Az értekezésben felhasznált irodalmi hivatkozások megoszlása megjelenésük éve szerint	
40. ábra	Az értekezésben felhasznált irodalmi hivatkozások a fenti folyóiratokból származtak a leggyakrabban	

## Táblázatok jegyzéke

1. táblázat	A sejtmag és a citoplazma között "ingázó" fehérjék	9
2. táblázat	Példák a nukleáris fehérjetranszport szabályozására	11
3. táblázat	A sejtmagban lezajló folyamatok szabályozásának módjai a DNS harmadlagos szerkezete, a nukleosómák szintjén	17
4. táblázat	Transzkripció faktorok DNS-hez való kötődésének és transzaktiváló hatásának szabályozása foszforilációs folyamatok révén	22
5. táblázat	Transzkripció faktorok aktivitásának szabályozása redox folyamatokkal	23
6. táblázat	Transzkripció faktorok és más fehérjék közötti kölcsönhatások szerepe a sejtmag szabályozási folyamataiban	25
7. táblázat	Hő-sokk fehérjék csoportosítása és főbb funkciói	29
8. táblázat	A 70 kDa körüli hő-sokk fehérjék funkciói	33
9. táblázat	A hsp90 asszociációja más fehérjékkel	36
10. táblázat	Hő-sokk fehérjék a sejtmagban	38
11. táblázat	A nukleolin (C23), numatrin (B23) és a lamin A/C (sejtmag NTP-áz) tulajdonságainak összehasonlítása a hsp60, hsp70 és hsp90 hő-sokk fehérjékkel	41
12. táblázat	A nukleosómák kialakulását segítő molekulák vázlatos összefoglalása	44
13. táblázat	A szteroidreceptorok hatását befolyásoló nukleáris faktorok	50
14. táblázat	Mikrobiális hő-sokk fehérjék, mint antigének különböző fertőzések esetén	52
15. táblázat	Hő-sokk fehérjék szerepe az autoimmun betegségekben	53
16. táblázat	Hő-sokk fehérjék eddig felderített speciális funkciói rákos sejtekben	54
17. táblázat	Hő-sokk fehérjék az autodegeneratív betegségekben	55
18. táblázat	Az inzulinreceptor tirozin-kináz aktivitását szabályozó mechanizmusok	59
19. táblázat	Az inzulinreceptor kölcsönhatásai GTP-kötő fehérjékkel	60
20. táblázat	Inzulin hatása a sejtek kalcium metabolizmusára	62
21. táblázat	Az inzulinreceptor szubsztrátjai	64
22. táblázat	Inzulin specifikus aktiváló szakaszok különböző gének promoter régióiban	72
23. táblázat	Az inzulin sejtmagra gyakorolt hatásainak lehetséges zavarai nem inzulinfüggő diabetes mellitusban	73
24. táblázat	A hsp90 autofoszforilációját alátámasztó adatok	89
25. táblázat	A hsp90 konformációváltozását bizonyító kísérletek összefoglalása	93
26. táblázat	Borjú tímusz DNS cirkuláris dikroizmus spektrumának változása 274 nm-en hsp90 hatására	97
27. táblázat	A hő-sokk fehérjék kapcsolata a proteolitikus folyamatokkal	106

## A felhasznált rövidítések jegyzéke

BAPTA	1,2-bisz(orto-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav
BiP	immunoglobulin nehéz lánc-kötő fehérje
CaCaM-PK	kalcium-kalmodulin-függő fehérje kináz
CAF-I	humán kromatin assembly faktor-I
C/EBP-β	CCAAT/ enhancer-kötő fehérje-β
c-hsp	citoplazmatikus hő-sokk fehérje
CK II	kazein kináz II
CREB	"cAMP response element" kötő fehérje
ct-hsp	kloroplaszt hő-sokk fehérje
dnaK	<i>E. Coli</i> 70 kDa hő-sokk fehérje
EGF	epidermális növekedési faktor
fes	feline sarcoma tirozin kináz
fgr	feline sarcoma tirozin kináz
fps	Fujinami, PRC II sarcoma tirozin kináz
gag	feline sarcoma tirozin kináz
GAL4	élesztő transzkripció faktor
GAP	GTP-áz aktiváló fehérje
GAPDH	glicerinaldehidfoszfát dehidrogenáz
GHF1/pit1	hipofízis transzkripció faktor
Gi	adenilát cikláz gátló (pertussis toxin érzékeny) GTP-kötő fehérje
grp	glükóz regulált fehérje
Gs	adenilát cikláz aktiváló (kolera toxin érzékeny) GTP-kötő fehérje
GSK-3	glikogén szintáz kináz 3
Gx	közelebből meg nem határozott GDP/GTP-kötő fehérje
Ha-ras	Harvey-ras fehérje
HMG	(= high mobility group) kis specificitású DNS-kötő fehérjék
HSF	hő-sokk faktor
hsp	hő-sokk fehérje
IGF-1	inzulin-szerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
IκB	az NFκB sejtmagba jutását megakadályozó fehérje
IP3	inozitol-1,4,5-trisz-foszfát
IR	infravörös
IRS I	inzulin receptor szubsztrát I
ISGF3	interferon-alfa transzkripció faktor
Ki-ras	Kirsten-ras fehérje
MAPK	mitogén aktivált protein kináz (MAP kináz, másnéven erk -- extracelluláris szignál által regulált kináz)
MAPKK	mitogén aktivált protein kináz-kináz
m-hsp	mitochondriális hő-sokk fehérje
N1/N2	hisztionszállító fehérjék <i>Xenopus</i> oocitákban
NAP-I	nukleosóma assembly protein I

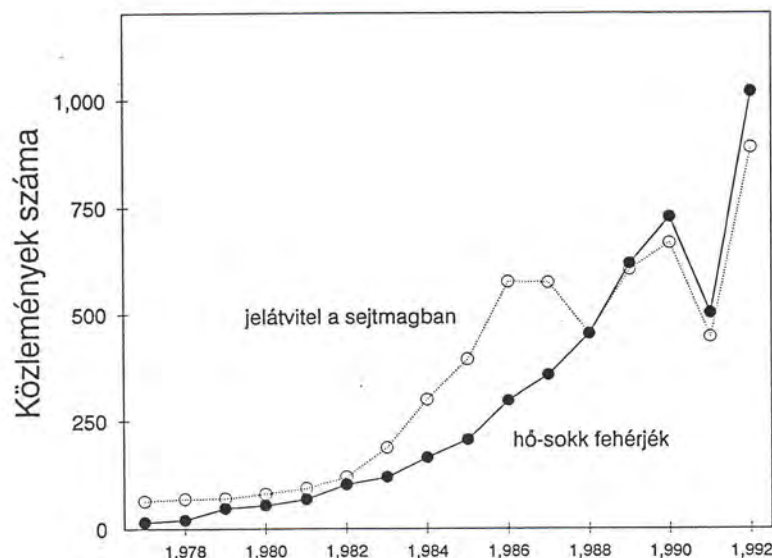


NF-AT	limfocita specifikus nukleáris faktor
NFkB	(nukleáris faktor kappa B) transzkripció faktor
NIDDM	nem inzulinfüggő diabetes mellitus
nitrobenz-TPA	12-(6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)hexanoil forbol-13-acetát
NLS	nukleáris lokalizációs szignál
N-ras	normál-ras fehérje
oct1	ATGCAAAT oktamer szekvencia-kötő fehérje
OxyR	oxidatív stressz esetén aktiválódó E. Coli transzkripció faktor
pdBu	forbol-dibutirát
PEPCK	foszfoenolpiruvát karboxikináz
PI	foszfatidil-inozitol
PI-3-kináz	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PKA	cAMP-függő fehérje kináz
PKC	Ca <sup>2+</sup> /foszfolipid-függő fehérje kináz
PP2A	foszfoprotein-foszfátáz 2A
PTP	foszotirozin-foszfátáz
raf	raf kináz
snRNP	kis ribonukleo fehérje (small nuclear ribonucleo-protein)
hnRNS	heteronukleáris RNS
snRNS	kis nukleáris RNS (small nuclear RNA)
RSK-II	S6-kináz II (92 kDa)
RSK-I	S6 kináz I (70 kDa)
SDS-PAGE	SDS (Na-dodecil-szulfát) poliakrilamid gélelektroforézis
src	Rous sarcoma vírus tirozin kináz
SRE	(serum response element) reguláló DNS-szakasz
SRF	szérum response faktor
TFIIIA	a III osztályba tartozó általános transzkripció faktor
TPA	tetradekanoil-forbol-acetát
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-piridilmetil)-etiléndiamin
yes	Yamaguchi sarcoma tirozin kináz

## 1. Bevezetés

A jelátviteli folyamatok molekuláris mechanizmusa az elmúlt évtizedekben mindvégig az élettudományok legszorgosabban kutatott területeinek egyike volt. A sejtfelszíni receptorokhoz szorosan kapcsolódó jelátviteli számos elemének megismerése után, a citoplazmatikus jelátviteli rendszerek feltérképezésével párhuzamosan az utóbbi években egyre több figyelem fordul a sejtmagban lezajló jelátviteli folyamatokra (1. ábra). E jelenség a "tudományos divat" szokásos fellángolásain túlmutató objektív okokra is visszavezethető. Ezek közül kettőt emelnék ki. A sejtciklus és az eukarióta génexpresszió szabályozásának számos kulcslépése csak a legutóbbi években vált, illetve jelenleg válik ismertté. Ezek ismeretének hiányában a hormon, illetve más jelzőanyag hatására létrejövő kaszkádszerű folyamatot korábban csak igen nehezen lehetett összekapcsolni a sejtmag meghatározóan specifikus folyamataival, a replikáció és a transzkripció szabályozásával. A másik ok, hogy a jelátvitel első, felerősítő lépései után a jelnek differenciálódnia kell, hogy az adott válaszhoz szükséges fehérjék szintézisét szelektíven változtathassa meg. A differenciált válasz kialakulásában kulcsszerepet játszó molekulák (pl. transzkripciós faktorok) szükségszerűen kis mennyiségben vannak jelen a sejtekben, így kimutatásuk, vizsgálatuk csak az analitikai technikáknak az elmúlt években tapasztalt fejlődése révén vált lehetővé.

A hő-sokk fehérjék (stressz fehérjék, molekuláris chaperon-ok -- "gardedám"-ok) intenzív kutatása hasonlóképpen rövid múltra tekint vissza (1. ábra). *Feruccio Ritossa* harmincegy évvel ezelőtti felfedezése után, amelyben a gyümölcslelgy lárvája nyálmirigyének hőhatásra bekövetkező speciális fehérjeszintézisét figyelte meg (Ritossa, 1962), a jelenségben szerepet játszó fehérjék tanulmányozása csak sokéves szünet után, az elmúlt évtizedben indult meg. A késlekedésnek itt alapvetően nem technikai okai voltak, hiszen e fehérjék közül jónéhány a sejten leggyakrabban előforduló fehérjék egyike. Időbe tellett, amíg felismerték, hogy a hő-sokk fehérjék nem csak egy ezoterikus jelenség, a hő-sokk hatásainak leküzdésében vesznek részt, hanem az élővilág egyik legkonzervatívabban továbbörökített fehérjecsaládjaként más fehérjék konformációjának őrzésével, illetve tervszerű megváltoztatásával tulajdonképpen a sejtet ért bármilyen káros behatás elleni védekezőrendszert, egyfajta "sejten belüli immunrendszert" alkotnak. A hő-sokk fehérjék sejtmagbeli hatásairól mindeztidáig keveset tudunk, azonban bizonyosra vehető, hogy a sejtmagban lezajló, térbelileg rendkívül rendezett, fehérjék tömegének tervszerű asszociációját és disszociációját igénylő folyamatok a hő-sokk fehérjék konformációátrendező hatásai nélkül nem valósulhatnak meg.



1. ábra Sejtmagbéli jelátviteli folyamatokkal és hő-sokk fehérjékkel foglalkozó tudományos közlemények az utóbbi 15 évben (Forrás: MEDLINE)

Értekezésem három szempontból is némileg rendhagyó. Az irodalmi áttekintés nem csak a kísérleti eredmények tudományos háttérét igyekszik bemutatni, hanem --a kutatott téma "forrongó állapotából" is következően-- néhány hipotézis felvázolását is tartalmazza. A bemutatott kísérleti eredmények --a kutatás alaptermészetéből is fakadóan-- nem egy kikristályosodott elmélet koherens bizonyítékai, hanem egy kutatási folyamat egyik fontos állomását jelentik, ahol a továbblépéshez egy olyan szintézis nyújthat nagy segítséget, amelyre e disszertáció megírása teremtette meg a lehetőséget. Végezetül, az értekezés formailag hibridtermészetű: a kísérleti eredmények zömét tartalmazó közlemények mellékletként való bemutatásával és az e közleményekre való gyakori utalásokkal átmenetet képez a "hagyományos" doktori értekezés és az újabban megszokottá váló "tézisek + cikkgyűjtemény" forma között; ugyanis a mellékletben szereplő cikkektől függetlenül, a tárgyalás folyamatossága miatt szükségét éreztem, hogy az 5. részben a már közölt kísérleti eredményekből is bemutassam a legfontosabbakat. E (szerencsés vagy szerencsétlen) formai újításokért, csakúgy, mint az angol szakirodalom helyenként bizonyára fűlsértő "magyarítási kísérleteiért" előre is az olvasó megértését kérem. Az értekezésben található munkahipotézisek bírálatával, valamint a kutatómunka a 7. részben leírt további irányainak kritikájával az olvasó nagy segítségemre tudna lenni a továbbhaladásban. Bármilyen észrevételért, szíves közreműködéséért előre is köszönettel tartozom.

Budapest, 1993 február

Dr. Csermely Péter  
Semmelweis Orvostudományi Egyetem  
1. sz. Kémiai-Biokémiai Intézet  
telefon, FAX: 266-6550



## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Biokémiai szabályozó mechanizmusok lehetséges támadáspontjai a sejtmagban

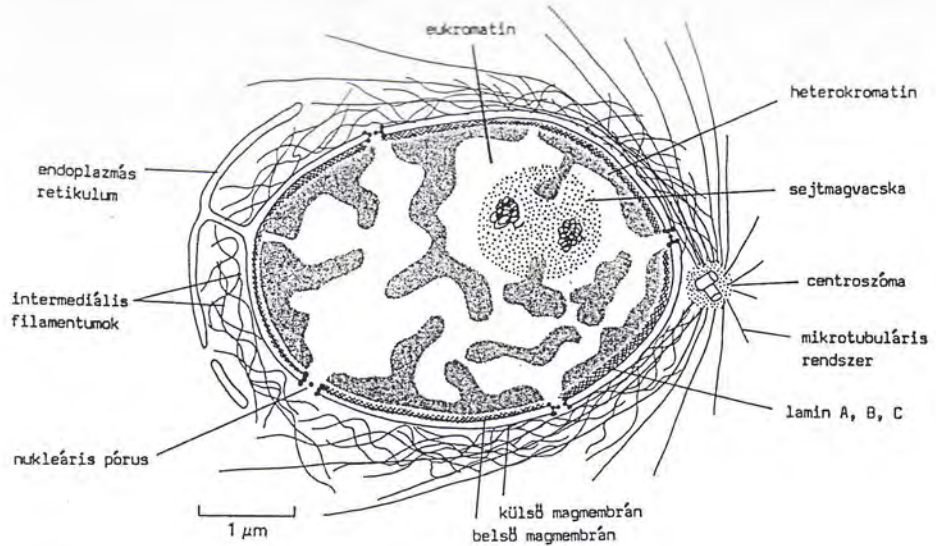
#### 2.1.1. Bevezetés: a sejtmag szerkezete

A sejtmag vázlatos szerkezetét a 2. ábra mutatja be. Az ábrán különösen a következő részleteket szeretném kiemelni: 1. *a sejtmag nem elkülönült*, a sejtmagot határoló kettős membrán az endoplazmás retikulummal szoros kapcsolatban áll (Newport és Forbes, 1987), a sejtmag körül pedig a belső szerkezetet stabilizáló lamin-komplexhez kötődő intermediális filamentumok találhatók, amelyek szoros burokká állnak össze stressznek kitett sejtekben (Foisner és mtsai, 1991; Welch, 1992). 2. *a sejtmag nem egységes*, eu- és kompaktabb heterokromatinra oszlik, amely "ötödleges" szerkezetének felderítése jelenleg is intenzív vizsgálódás tárgyát képezi (Gasser és Laemmli, 1987; Spector, 1990; Berezney, 1991; Jack és Eggert, 1992); a foszfatidil-inozitol metabolizmus enzimei a sejtmagon belül eltérő lokalizációt mutatnak (Payraste és mtsai, 1992), Birch és munkatársai (1992) pedig nemrégiben intranukleáris kalcium gradienseket fedeztek fel idegsejtekben. 3. *a sejtmag --az ábrával ellentétben-- időben nem állandó*, folyamatos változáson megy keresztül a sejtciklus során. A transzkripció és replikációs folyamatokban a sejtmag hihetetlenül kompakt belső szerkezete folyamatosan újjaalakul, a sejtmagvacska szerkezete folyamatosan változik a sejtciklus alatt (Anastassova-Kristeva, 1977), a sejtosztódás során pedig a sejtmagszerkezet teljes összeomlása és újraalakulása következik be (McIntosh és Koonce, 1989; Pfaller és mtsai, 1991).

#### 2.1.2. Transzportfolyamatok a sejtmag és a citoplazma között

##### 2.1.2.1. Iontranszport

A sejtmagot határoló kettős membránt négyzetmikrononként 2-60 pórus szakítja meg (Gerace és Burke, 1988). Paine és mtsai (1975) valamint Lang és mtsai (1986) fluoreszcens dextránnal végzett kísérletei alapján sokáig az a felfogás uralkodott, hogy a pórus-komplexek molekuláris szűrőként válogatás nélkül átengedik a 20-40 kDa alatti molekulákat (Dingwall és Laskey, 1986; Gerace és Burke, 1988). E felfogás értelmében a sejtmag és a citoplazma között kis molekulák, így ionok koncentrációgradiense nem keletkezhet. Mindazonáltal az elmúlt években számos kutatócsoport a sejtmag és a citoszol között jelentős kalcium koncentrációgradienst mutatott ki, amely eltérően változott különböző stimulusok hatására (Williams és mtsai, 1985, 1988; Hernandez-Cruz és mtsai, 1990; Yelamarty és mtsai, 1990; Przywara és mtsai, 1991; Waybill és mtsai, 1991; Bellomo és mtsai, 1992/a; Birch és mtsai, 1992; Himpens és mtsai, 1992). A sejtmagmembrán két oldalán fellépő koncentrációkülönbséget más kis molekulák, így répacukor (Horowitz, 1972), inulin (Horowitz és Moore, 1974) és glutation (Bellomo és mtsai, 1992/b) esetén is megfigyelték. A magmembrán két oldala közötti potenciálkülönbség (Loewenstein és Kanno, 1962, 1963; Giulian és Diacumakos, 1977; Mazzanti és mtsai, 1990) a  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$  ionok koncentrációgradiensére utal. Mindezek a megfigyelések nem magyarázhatók kizárólagosan a víz eltérő citoplazmatikus és nukleáris koncentrációjával (Horowitz, 1972; Horowitz és Moore, 1974)



2. ábra A sejtmag vázlatos szerkezete (Alberts és mtsai, 1989; 9-1 ábra, átdolgozott változat)

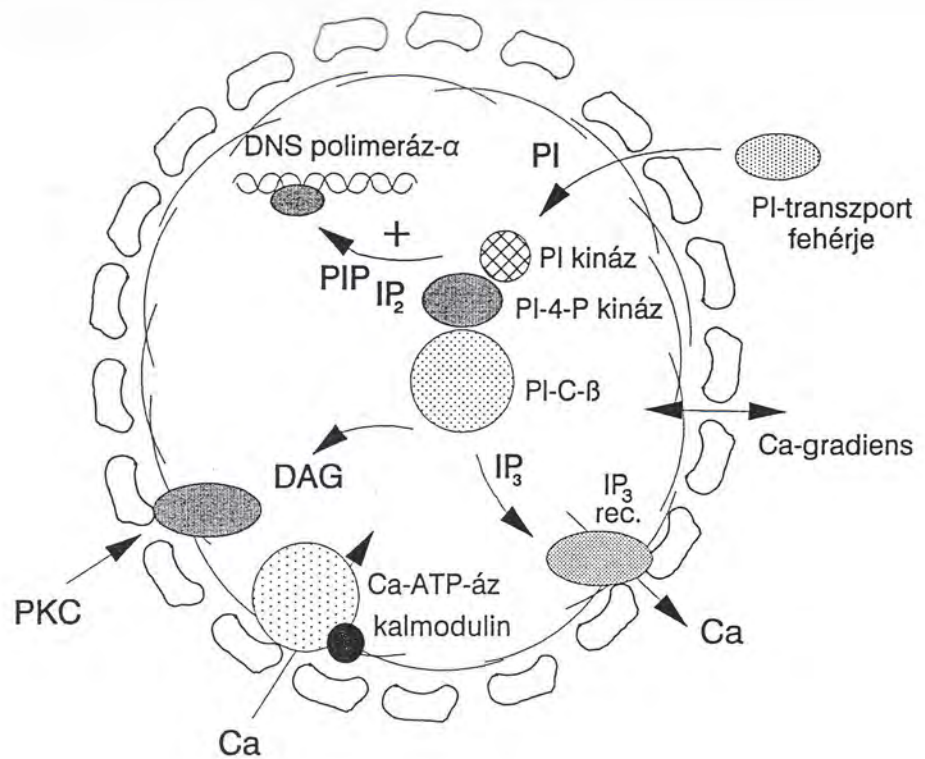
és egyrészt arra utalnak, hogy a pórus-komplexek nem akadálytalanul engedik át a kisebb molekulákat sem, másrészt pedig a sejtmag membránjába épült aktív transzportrendszerek létét feltételezik.

### Ca<sup>2+</sup> ionok

A kalcium metabolizmus "szokásos", a plazmamembránban és az endoplazmás retikulumban megtalálható komponenseit az elmúlt években szinte kivétel nélkül a sejtmagban is lokalizálni lehetett (3. ábra). A sejtmag a magbeli foszfatidil-inozitol (PI) ciklus kiindulópontjaként szolgáló PI-t döntően egy PI-transzfer fehérje segítségével veszi fel (Capitani és mtsai, 1990). A sejtmag PI-kináz és PI-4-foszfát kináz aktivitása már régóta ismeretes (Smith és Wells, 1983). Újabb kutatások tisztázták, hogy ezen enzimek nem a magmembránban, hanem a sejtmag belsejében találhatóak (Cocco és mtsai, 1987). A két enzim sejtmagon belüli lokalizációja különböző: a PI-kináz a sejtmag periferiáján, míg a PI-4-foszfát kináz a mag mátrixának belsejében helyezkedik el (Payraste és mtsai, 1992). A foszforilációs folyamatok eredményeként keletkező PI-4-foszfát a DNS polimeráz-alfa alacsony aktivitású formáját aktiválni képes (Sylvia és mtsai, 1988).

A PI-4-foszfát és a PI-4,5-biszfoszfát hidrolízisét a sejtmag mátrixában megtalálható foszfolipáz C béta izoformája végzi el (Martelli és mtsai, 1992; Payraste és mtsai, 1992). (A plazmamembránban az enzim gamma izoformája található.) Sylvia és munkatársai (1988) nagytisztaságú DNS polimeráz-alfa foszfolipáz C jellegű aktivitását is kimutatták, de ez az észlelés azóta az irodalomban megerősítést nem nyert. A foszfatidil-inozitolek hidrolízisét a sejtmag foszfolipáz C bétájának közreműködésével az IGF-1 számottevően aktiválja (Divecha és mtsai, 1991; Martelli és mtsai, 1992). Noha GTP-kötő fehérjék a sejtmagban is találhatóak, ezek szerepét nem annyira a magra specifikus foszfolipáz C-béta aktiválásában, hanem a sejtmag fehérje- és RNS-transzportjában, a DNS szintézis előrehaladásának jelzésében, valamint a sejtmag membránja a sejtosztódás utáni újralakulásának elősegítésében vélik megtalálni (Rubins és mtsai, 1990; Seydel és Gerace, 1991; Ren és mtsai, 1993). Katz és munkatársai (1992), valamint Camps és munkatársai (1992) nemrégiben közölt eredményei szerint az azonban elképzelhető, hogy a sejtmag foszfolipáz C szabályozásában a G fehérjék béta-gamma alegységei vesznek részt.





3. ábra A kalcium-metabolizmussal összefüggő folyamatok a sejtmagban Részleteket lásd a szövegben.

A foszfolipáz C-béta által katalizált reakció egyik termékeként intranukleáris diacil-glicerol keletkezik, amely a sejtmagban található, illetve a citoplazmatikus fehérje kináz C aktivációját és transzlokációját segítheti elő (Masmoudi és mtsai, 1989; Rogue és mtsai, 1990). A diacil-glicerol inaktiválására a sejtmag mátrixában található diacil-glicerol-kináz szolgál (Payraste és mtsai, 1992). A fehérje kináz C sejtmagba való transzlokációjának előidézésére számos más anyag, így cAMP, TPA, a TPA-analóg bryostatin, prolaktin és EGF is képes (Cambier és mtsai, 1987; Buckley és mtsai, 1988; Leach és mtsai, 1989; Hócevar és Fields, 1991). A fehérje kináz C ezen utóbbi agonisták hatására létrejövő transzlokációjának mechanizmusa még nem tisztázott.

A foszfolipáz C-béta hatására keletkező inozitol-1,4-biszfoszfát is képes a DNS polimeráz-alfa aktivációjára (Sylvia és mtsai, 1988). A hidrolízis másik foszfoinozotid terméke, az  $IP_3$  pedig specifikus sejtmagbéli receptorához kötve a sejtmagból  $Ca^{2+}$  felszabadulását idézi elő (Ross és mtsai, 1989; Nicotera és mtsai, 1990; Malviya és mtsai, 1990). A leadott  $Ca^{2+}$  újra-felvételére az endoplazmás retikulum  $Ca^{2+}$ -ATP-ázához hasonló, kalmódulin-függő nukleáris  $Ca^{2+}$ -pumpa szolgál (illetve pumpák szolgálnak) (Nicotera és mtsai, 1989; Burgoyne és mtsai, 1989; Lanini és mtsai, 1992; Bachs és mtsai, 1992). Jelenleg még nem tisztázott, hogy a sejtmag  $Ca^{2+}$ -pumpája a kettős membrán külső, belső, vagy mindkét oldalán található. Mivel a sejtmag  $Ca^{2+}$  koncentrációja a citoplazmáénál magasabb, illetve alacsonyabb is lehet (Williams és mtsai, 1985, 1988; Hernandez-Cruz és



mtsai, 1990; Yelamarty és mtsai, 1990; Przywara és mtsai, 1991; Waybill és mtsai, 1991; Bellomo és mtsai, 1992/a; Birch és mtsai, 1992; Himpens és mtsai, 1992) elképzelhető, hogy a két különböző irányú  $\text{Ca}^{2+}$  transzportra egymástól különböző (100, illetve 140 kDa-os, vö. Burgoyne és mtsai, 1989; Lanini és mtsai, 1992) pumpa-rendszerek szakosodtak. A sejtmagon belüli  $\text{Ca}^{2+}$  gradienseket (Nicotera és mtsai, 1990; Birch és mtsai, 1992) előállító, illetve megszüntető rendszerek azonosítása még a jövő feladata.

### $\text{Na}^+$ és $\text{K}^+$ ionok

Elég régóta ismeretes, hogy a magmembrán két oldala között kb. 10 mV, a belső oldalon negatív potenciálkülönbség mérhető (Mazzanti és mtsai, 1990). E megfigyelések közvetve a  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$  ionok koncentrációgradiensére utalnak. Ujabban patch clamp technikával az endoplazmás retikulum ioncsatornáitól különböző  $\text{K}^+$ -szelektív ioncsatornákat mutattak ki a sejtmag membránjában (Mazzanti és mtsai, 1990, 1991; Matzke és mtsai, 1990, 1992). A csatornák vezetőképességére 200 és 800 pS közötti értékek adódtak, az eltérések a különböző sejtmagizolálási technikával, illetve a csatornáknak a közeg összetételétől független nyílt/zárt formáival magyarázhatóak. A csatornák száma korrelációt mutatott az adott mintában lévő póruskomplexek számával, vezetőképességük felső értéke pedig megközelítette a póruskomplexekre számolható 1000 pS-t. E megfigyelések a póruskomplex 3 dimenziós szerkezetének újabban feltárt sajátosságai mellett (Hinshaw és mtsai, 1992; ld. 2.1.2.2. fejezet) közvetett bizonyítékként szolgálnak arra, hogy a póruskomplex a sejtmagmembrán  $\text{K}^+$ -szelektív ioncsatornájaként is működhet.

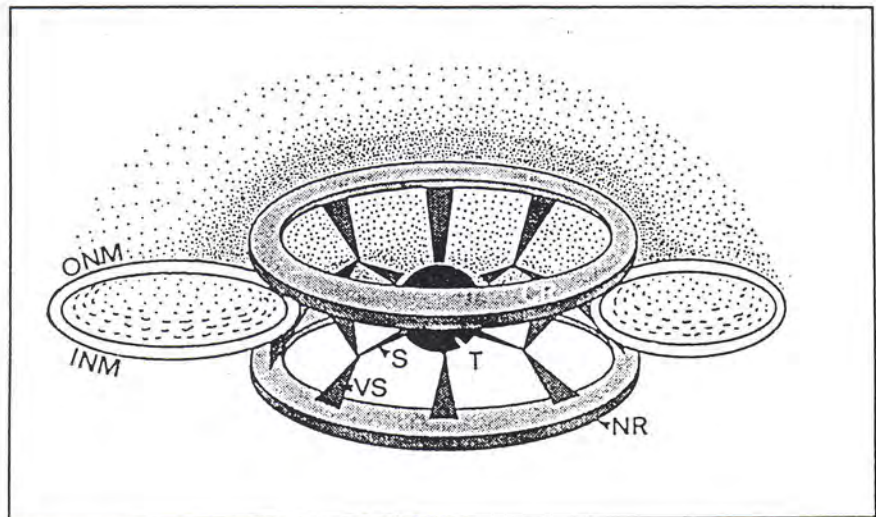
### $\text{Zn}^{2+}$ ionok

A  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  és  $\text{K}^+$  ionokhoz képest jóval kevesebb adat áll rendelkezésünkre a  $\text{Zn}^{2+}$  ionok sejtmagbeli elrendeződéséről, transzportjukról a sejtmagmembránon keresztül. Az adatok kis száma egyértelműen a megfelelő vizsgálati módszerek hiányának tudható be, hiszen a cink összes (szabad + kötött) sejtmagbeli mennyisége a kalciuméval összemérhető (Yarom és mtsai, 1976; Csermely és mtsai, 1987/b). Cink ionok számottevő szerepet töltenek be a DNS szerkezetének stabilizálásában (Sissoeff és mtsai, 1976), csökkent koncentrációjuk pedig specifikus endonukleázok aktiválásával apoptotikus folyamatok beindulását segítheti elő (Duke és mtsai, 1983; Shimizu és mtsai, 1990; Giannakis és mtsai, 1991; Zalewski és mtsai, 1991). Weser és Bischoff (1969, 1970) korai kísérletei  $^{65}\text{Zn}$  hőmérsékletfüggő felvételét mutatták ki ép sejtmagokon. Eredményeiket Coussins és munkatársai (1992) erősítették meg nemrégiben. A kérdés további, részletesebb vizsgálata a Forbes és mtsai (1992) által kifejlesztett cink specifikus fluoreszcens indikátor segítségével valósulhat meg.

### 2.1.2.2. Fehérjetranszport

#### A sejtmagmembrán póruskomplexeinek szerkezete

A póruskomplex Feldherr és Akin (1990) által javasolt szerkezetét a 4. ábrán mutatom be. A póruskomplex részleges nyitottságával kapcsolatban korábban leírtakkal (2.1.2.1. rész) összhangban megfigyelhető, hogy a pórus nem üres, közepét egy 10-40 nm átmérőjű transzport-komplex foglalja el (Gerace és Burke, 1988). A "dugószerű" centrális komplexet a citoplazmatikus és a nukleáris oldalon lévő két gyűrűvel tartó ívek bonyolult szerkezete köti össze. A pórus-komplex szerkezetének a 4. ábrán bemutatott képét az 1990 óta kapott kísérleti eredmények három helyen módosították:



4. ábra A sejtmagmembrán póruskomplexének szerkezete (Feldherr és Akin, 1990; 1. ábra) Jelmagyarázat: ONM = külső magmembrán, INM = belső magmembrán, NR = nukleáris gyűrű, CR = citoplazmatikus gyűrű, VS/S = tartóelemek, T = központi transzport-komplex

Jarnik és Aebi (1991) mind a citoplazmatikus mind a nukleáris gyűrűről a citoplazmába, illetve a sejtmag belsejébe nyúló kosárszerű, "halcsapdának" nevezett képződményeket fedezett fel, amelyek a póruson áthaladó makromolekulák korrekt pozícionálását segíthetik. A nukleáris oldalon lévő "halcsapdához" egy, a nukleáris laminától különböző, gézyszerű hálózat csatlakozik, amely az RNS-nek a sejtmagból való kijutását irányíthatja (Goldberg és Allen, 1992). A póruskomplex eddigi legpontosabb képét Hinshaw és munkatársai (1992) alkották meg több mint 400 póruskomplex digitalizált elektronmikroszkópos képének átlagolásával. Eredményeik szerint a póruskomplex a központi nyílása mellett nyolc kisebb, a citoplazmatikus és nukleáris gyűrűket egyaránt keresztülszelő csatornát is tartalmaz, amelyek alkalmasak lehetnek kisebb molekulák, így ionok transzportjára.

#### A sejtmagba irányuló fehérjetranszport feltételezett mechanizmusa

A 2.1.2.1. részben említetteknek megfelelően sokáig a nukleáris membrán pórusait egyfajta molekuláris szűrőnek tekintették, amely akadály nélkül átengedi a 20-40 kDa alatti fehérjéket. A 40-50 kDa-nál nagyobb molekulatömegű fehérjék némelyikét, így az SV40 vírus "large T" antigénje által kódolt fehérjét (92 kDa), illetve a nukleoplazmint (110 kDa pentamer) azonban a sejtmag még a kis molekulatömegű fehérjékénél is gyorsabban veszi fel (Gerace és Burke, 1988; Roberts, 1989; Garcia-Bustos és mtsai, 1991; Hanover, 1992). Ez a jelenség mindenképpen egy szelektivitást biztosító, aktív transzportmechanizmusra enged következtetni. Javárészt a fenti két modell-fehérjén végzett limitált proteolízis, illetve pontmutációk segítségével kb. egy évtizeddel ezelőtt sikerült tisztázni, hogy rövid, bázikus fehérjeszakaszok, ún. *nukleáris lokalizációs szignálok* felelősek ezen és más nukleáris fehérjéknek a sejtmagba juttatásáért. Dingwall és Laskey 1991-ben alkotta meg a nukleáris lokalizá-



# KKXXXXXXXXXXKxxKK

5. ábra Nukleáris lokalizációs szignál (Dingwall és Laskey, 1991 alapján) K = lizin, vagy arginin; x tetszés szerinti aminosav

ciós szignál ma is ismert modelljét, amelyet az 5. ábrán mutatok be (Robbins és mtsai, 1991; Dingwall és Laskey, 1991). Az elfogadott konszenzus szekvencia bázikus aminosavak (lizin vagy arginin) két csoportját tartalmazza, amely egymástól kb. tíz aminosav távolságra helyezkednek el. Az N-terminális csoport legalább két, a C-terminális csoport pedig öt aminosavon belül legalább három bázikus részletet kell, hogy magában foglaljon. A nukleáris lokalizációs szignálok a sejtmag nagyméretű fehérjéin (pl. laminok, c-myc, szteroid receptorok, hsp70, c-myc, p53; Roberts, 1989; Garcia-Bustos és mtsai, 1991) kívül a korábbi elmélet szerint szabad diffúzióval bekerülő kisebb fehérjéket, pl. a hiszton H1-et is segítik a sejtmagba jutásban (Breeuwer és Goldfarb, 1990). A nukleáris lokalizációs szignál a fehérjék sejtmagba jutásának szükséges és elégséges feltétele: a szignált tartalmazó peptiddel tetszés szerinti fehérje a magba juttatható (Goldfarb és mtsai, 1986).

A sejtmag a sejt legnagyobb, erőteljesen struktúrált sejtszervecskéje (ld. 2.1.1. rész). Így nem meglepő, hogy a nukleáris fehérjék *sejtmagon belüli* elhelyezkedését is további szignálok szabályozzák. Glutamin oldalláncot körülölelő bázikus csoportok az őket tartalmazó fehérjéket a sejtmagvacskába irányítják, a C-terminuson elhelyezkedő CAAX csoport pedig a lamin B farnezilálódásához és így a sejtmag belső membránjába épüléséhez vezet (Holtz és mtsai, 1989; Hatanaka, 1990; Garcia-Bustos és mtsai, 1991). A sejtmag belső domainjeinek felderítésével párhuzamosan minden bizonnyal további irányító mechanizmusok felfedezésére is sor fog kerülni.

A *sejtmagba irányuló fehérjetranszport mechanizmusának* kutatása a tudomány messze nem lezárt, jelenleg is nagy erővel művelt területe (Silver, 1991; Nigg és mtsai, 1991; Goldfarb, 1992). Annak a tisztázása után, hogy a transzport alapvetően két lépésből, a nukleáris lokalizációs szignállal rendelkező fehérje gyors megkötéséből és a póruskomplexeen való lassú "átszuszakolásából" álló, energiaigényes feladat (Newmeyer és mtsai, 1986; Newmeyer és Forbes, 1988; Richardson és mtsai, 1988) jelenleg a póruskomplexe és a hozzá kapcsolódó citoplazmatikus faktoroknak a folyamatban játszott szerepét próbálják meg felderíteni. Mivel egyedül a póruskomplex molekulatömege meghaladja a 124 mega-Dalton-t, ez a feladat nem ígérkezik egyszerűnek.

Morfológiai tanulmányok alapján a makromolekulák transzportjának két alapvető modellje létezik: a "folyamatos" és a "zsilipelő" modell. A folyamatos modell szerint a transzport energiaszükséglete, az endoplazmás retikulumban és a mitochondriumban működő transzportrendszerekhez hasonlóan, az átjutó makromolekulák "kitekerésére", majd a nukleáris oldalon "betekerésére" fordítódik. A zsilipelő modell a póruskomplex citoplazmatikus és nukleáris gyűrűjét egy-egy ATP felhasználásával szűkülő kapunak képzelel el (Hanover, 1992; Dingwall és Laskey, 1992).



A transzportfolyamatban részt vevő kulcsfontosságú fehérjék azonosítását négy fő módszerrel kísérelték meg eddig: 1. Az első módszer magát a nukleáris lokalizációs szignált, illetve feltételezett receptorának ezzel minden valószínűség szerint komplementer, savas kötőhelyét hívja segítségül. A szignállal egybeépített fotoaffinitás próbák, illetve a receptorok feltételezett kötőhelye ellen termeltetett antitestek segítségével főként 60 és 70 kDa körüli molekulatömegű fehérjéket lehetett megtalálni (Garcia-Bustos és mtsai, 1991; Silver, 1991). A kötődés N-metil-maleimiddel gátolható (Newmeyer és Forbes, 1990), ami újabb kísérleti eszközt jelenthet a részt vevő fehérjék azonosítására. 2. A második két módszer a folyamatban részt vevő transzporter komponenseinek azonosítására tesz kísérletet. Tíz éve ismert, hogy wheat germ agglutinin (WGA) a sejtmag makromolekula transzportjának gátlására képes. Ezen az úton legnagyobb biztonsággal egy 62 kDa molekulatömegű fehérjét, ú.n. nukleoporin-t sikerült azonosítani (Roberts, 1989; Nigg és mtsai, 1991; Silver, 1991). 3. A harmadik kísérleti megközelítés a transzporter ATP-t felhasználó komponensét kívánja megtalálni fotoaffinitás próbák segítségével. E próbákkal egy miozinszerű 188 és egy 40-46 kDa molekulatömegű ATP-áz azonosítása vált lehetővé (Roberts, 1989; Silver, 1991). 4. A negyedik módszer a sejtmagba irányuló makromolekuláris transzport *in vitro* rekonstrukciójára tesz kísérletet. Shannon-Moore és Blobel (1992) ezen az úton egy ATP-t igénylő *citoplazmatikus* frakciót talált, amely a hsp70-nek a folyamatban játszott szerepével együtt (Goldfarb, 1992; Dingwall és Laskey, 1992, ld. bővebben: 2.2.3. fejezet) arra utal, hogy a transzportban részt vevő citoplazmatikus faktorok is hozzájárulnak a folyamat energiaigényéhez.

#### A fehérjetranszport kétirányúsága: nukleáris "shuttle" mechanizmusok

A sejtmagba irányuló fehérjetranszport logikus követelménye az egyirányúság, hiszen ha az energiabefektetés árán bejuttatott fehérjék ugyanazzal a mechanizmussal kikerülnének a sejtmagból, a sejt hőtermelésének szellemes, ámde némileg bonyolult mechanizmusával állnánk szemben. Az általános szabály valóban ez. Mégis, azon néhány fehérje esetén, amelyeket az 1. táblázatban mutatok be, a fehérjéknek a sejtmag és a

Fehérje	Irodalmi hivatkozás
<i>RNS-kötő fehérjék</i>	
riboszómális L3 fehérje	Moreland és mtsai, 1985
nukleolin	Borer és mtsai, 1989
numatrin	Borer és mtsai, 1989
hnRNS-kötő A1 fehérje	Pinol-Roma és Dreyfuss, 1992
<i>DNS-kötő fehérjék</i>	
HMG1	Rechsteiner és Kuehl, 1979
progeszteron receptor	Guiochon-Mantel és mtsai, 1991
<i>"Fehérje-kötő fehérjék"</i>	
hsp70	Lewis és Pelham, 1985
lamin A/C (?) receptor	Powell és Burke, 1990

1. táblázat A sejtmag és a citoplazma között "ingázó" fehérjék

citoplazma közötti ciklikus vándorlása figyelhető meg. E "nukleocitoplazmatikus shuttle" az RNS-kötő fehérjék esetén az RNS-transzportot, a hsp70 esetén pedig a fehérjetranszportot segítheti. A ciklikus vándorlás hozzásegíthet ahhoz, hogy a progeszteron receptor újabb és újabb jelet közvetítsen a sejtmagba, "spórolva" a kis mennyiségben szintetizált receptormolekulával. Végezetül a HMG1 pedig részt vehet a kromatin asszociációs folyamataiban, amelyre csak a sejtciklus bizonyos szakaszaiban (leginkább G2 és M-profázis) van szükség (Bonne-Andrea és mtsai, 1984).

#### Példák a sejtmag fehérjetranszportjának szabályozására

A sejtmag fehérjetranszportjának szabályozása két szinten képzelhető el. A transzport általános szabályozásával minden fehérje transzportját lehet egyidejűleg növelni, illetve csökkenteni. Ilyen szabályozásra példa az inzulin, EGF és a foszfatidil-inozitol makromolekula (dextrán) transzportot stimuláló hatása (Jiang és Schindler, 1986; 1988; Schindler és Jiang, 1987; Peralta-Soler és mtsai, 1992). E hatások pontos mechanizmusa egyelőre nem ismeretes.

A fehérjetranszport speciális szabályozása során csak bizonyos fehérjék transzportjának szelektív segítése, illetve gátlása valósul meg. Könnyen belátható, hogy e folyamatnak kulcsfontosságú szerepe van a jelátviteli folyamatokban, hiszen a különböző transzkripciós faktorok sejtmagba jutása után már csak a DNS-sel való kölcsönhatásuk változtatásával nyílik a sejtnak lehetősége a génexpresszió specifikus szabályozására (ld. bővebben a 2.1.3.1. fejezetben).

A fehérjetranszport az egyes fehérjékre specifikus szabályozásának néhány lehetséges mechanizmusát a következő oldalon lévő 2. táblázatban foglaltam össze. A szabályozás a fehérjék szerkezetének poszttranszlációs módosításával (foszforiláció, defoszforiláció, limitált proteolízis) és fehérjekomplexek képződésével, illetve felbomlásával fejt ki hatását. A módosítások hatására a nukleáris lokalizációs szignál jobban felismerhetővé válik, mint a rel onkogén celluláris változata esetében, vagy kölcsönnevedik, mint ahogy a sejtciklus szabályozásában alapvető szerepet játszó cdc2 kináz kölcsönveszi a lokalizációs szignált az őt kinázként is aktiváló ciklintől (hivatkozásokat ld. 2. táblázat). A sejtosztódás során aktiválódó cdc2 kináz számos transzkripciós faktor sejtmagba jutását és DNS kötését akadályozza meg, hozzájárulva ezzel a transzkripció általános gátlásához a mitózis során. Néhány igen ismert fehérjét a nukleáris lokalizációs szignáljukat elfedő "társuk" tart a citoplazmában. E maszkírozó szerepet a cAMP-függő fehérje kináznál a regulációs alegység, a szteroid receptorok esetén a hsp90, az NFkB mellett pedig az IκB tölti be (az utóbbi kettő részletesebb tárgyalását lásd a 2.1.3.1. és a 2.2.4.2. fejezetekben).

A nukleáris lokalizációs szignál esetén is feltehető a "Ki kit győz le?" kérdés, ha a fehérje ezen kívül egy másik, pl. mitochondriális, vagy szekréciós szignált is tartalmaz. Általános szabályként elmondható, hogy a ko-transzlációs szignálok, így a szekréciós szignál és a plazmamembránba irányító hidrofób peptidszakasz "győznek" a poszttranszlációs nukleáris lokalizációs szignál felett. A szintén poszttranszlációs mitochondriális szignál esetén az eredmény "döntetlen": a fehérje N-terminusához közelebbi szignál dominál, vagy a fehérje mindkét sejtszervecskében elő fog fordulni (Garcia-Bustos és mtsai, 1991; Hanover, 1992).



Aktiválás

több NLS egy fehérjén

-- szérumalbumin-gold (model)  
kazein kináz II foszforiláció  
az NLS előtt

Dworetzky és mtsai, 1988

-- SV40 large T (model)

Rihs és mtsai, 1991

NLS más fehérjén ("piggyback")

-- adenovírus DNS polimeráz +  
preterminális fehérje

Zhao és Padmanabhan, 1988

-- cdc2 kináz + ciklin  
az NLS-t elfedő C-terminális  
proteolitikus lehasítása

Booher és mtsai, 1989

-- NFkB, 110 kDa prekursor

Henkel és mtsai, 1992

-- c-rel

Hannink és Temin, 1989

Gátlás

cdc2 kináz foszforiláció

az NLS-ben

-- SV40 large T (model)  
-- xnf7 (Xenopus Laevis)  
-- SWI5 (S. cerevisiae)  
-- jun (?)

Jans és mtsai, 1991

Miller és mtsai, 1991

Moll és mtsai, 1991

Chida és Vogt, 1992

az NLS elfedése

-- szteroid receptor  
-- NFkB  
-- fehérje kináz A  
-- fos (?)

Pickard és Yamamoto, 1987

Lenardo és Baltimore, 1989

Nigg és mtsai, 1985

Roux és mtsai, 1990

## 2. táblázat Példák a nukleáris fehérjetranszport szabályozására

NLS = nukleáris lokalizációs szignál; a többi rövidítést lásd a  
bevezető oldalakon található rövidítésgyűjteményben

## 2.1.2.3. RNS transzport

Igy, a sejtmag RNS transzportjának tárgyalását a fehérjetranszport ismertetése után hagyva az első kérdés, ami felmerül az emberben, hogy mennyiben azonos és mennyiben különbözik a két transzportfolyamat mechanizmusa. A transzport bizonyos lépései mindenképpen hasonlóaknak kell, hogy legyenek, hiszen mindkét típusú makromolekula transzportja a nukleáris póruskomplexen keresztül folyik (Schröder és mtsai, 1987). A kétféle transzportfolyamat azonban döntően ellentétes irányú: a fehérjék (a "shuttle"-ban résztvevők kivételével) befelé mennek, ezzel szemben az RNS kifelé vándorol. A heteronukleáris RNS "szabdalásában" (hnRNS-splicing) részt vevő kis ribonukleo-fehérjék (snRNP-k) importja azon kevés példák egyike, ahol a fehérje és az RNS(-fehérje komplex) transzportja egy irányba történik. E folyamat esetén kompetíciós kísérletek tisztázták, hogy a szignál felismerését különböző mechanizmusok biztosítják (Dingwall és Laskey, 1992). Mivel az mRNS, az rRNS, az snRNS és a tRNS transzportja egymástól meglehetősen különbözik, tárgyalásukat ilyen csoportosításban, külön fogom elvégezni.



### Az mRNS transzportjának mechanizmusa

Az mRNS-transzport mechanizmusának a fehérjetranszportéhoz hasonlóan szintén két lépését lehet megkülönböztetni: a transzportra kerülő molekulák felismerését és a nukleáris póruson való keresztülhaladásukat.

*1. Az mRNS felismerése* Az RNS transzportjára a legtöbb esetben a hnRNS érése után kerül sor, ugyanis intronokat tartalmazó, részlegesen, vagy egyáltalán fel nem szabdalt (unspliced) hnRNS-ek csak ritkán hagyják el a sejtmagot (Schröder és mtsai, 1987; Hanover, 1992). Máig is vitatott, hogy az mRNS felismerése egyáltalán jelhez kötött-e. Amikor egy molekula felismeréséről beszélünk, általában oldatszerű körülményeket képzelünk magunk elé, ahol a felismerendő anyag szabad diffúzió után nagy affinitással kötődik receptorához. Ez a kép szigorúan véve a vérplazmára és a citoszolra sem igaz, végképp érvényét veszti azonban a sejtmag belsejének magasan struktúrált körülményei között. Itt inkább az mRNS molekula a transzportrendszernek való "átadásáról" beszélhetünk (Carter és Bentley-Lawrence, 1991).

Kétségtelen tény, hogy a hnRNS útja igen "szervezett" a sejtmagon belül. A splicing folyamatok a sejtmag belsejében, legalább részben a "nukleáris testekhez" (nuclear body) kötötten zajlanak le (Gerace és Burke, 1988; Carter és mtsai, 1991; Saunders és mtsai, 1991; Brasch és Ochs, 1992). A splicingban részt vevő kis ribonukleo fehérjék egy magasan szervezett retikuláris hálózatot alkotnak a sejtmagon belül (Spector, 1990). A hnRNS az érési folyamat előtt igen erős affinitással kötődik a sejtmagmátrixhoz, a "kész" mRNS-nek pedig mintegy 70 %-a a mátrixról leszakad (Schröder és mtsai, 1987). A hnRNS kihorgonyzásáért többek között a 41-43 kDa molekulatömegű C fehérjék lehetnek felelősek (Pinol-Roma és Dreyfuss, 1992). Az mRNS transzportját pedig a nukleáris pórus belső oldalához csatlakozó gézszerű fonalhálózat is segítheti (ld. 7. oldal; Goldberg és Allen, 1992).

A hnRNS érése során kialakult speciális jegyek, így az RNS 5' végére kerülő 7-metil-GpppG "sapka" (cap) és a 3' végre csatolt poli-A farok szerepet játszanak a transzportra kerülő mRNS pozicionálásában a nukleáris pórus belső oldalán (Schröder és mtsai, 1987; Nigg és mtsai, 1991). A poli-A farokhoz kapcsolódó számos nukleáris fehérje közül egy 78 kDa és egy 110 kDa molekulatömegűről feltételezik, hogy szerepet játszik az mRNS transzportjában. Az mRNS 7-metil-GpppG-kötő fehérjéjének azonosítása jelenleg folyik (Schröder és mtsai, 1987; Nigg és mtsai, 1991). Jónéhány mRNS, így az idegsejt számos specifikus mRNS-e, a hiszton és a béta-aktin mRNS-ek nem rendelkeznek poli-A farokkal, így felismerésük ezen eleme nem vesz részt specifikus transzportjukban (Schröder és mtsai, 1987).

*2. Az mRNS transzportja* A fehérjeburokkal körülvett mRNS átmérője kb. 20 nm, míg a nukleáris pórusé mintegy 10 nm, tehát a keresztülhaladás során a fehérje-mRNS komplexnek legalább részlegesen "kitekerednie" és disszociálnia kell. Az RNS kitekeredését egyes feltételezések szerint a topoizomeráz II is segíti (Schröder és mtsai, 1987). A transzport során először az mRNS 5' vége halad át a póruson, ami összhangban van azzal, hogy a transzport egyik legfontosabb jele, a 7-metil-GpppG is az 5' végen helyezkedik el (Nigg és mtsai, 1991). Az mRNS transzport energiaigényes folyamat. Az energiaszükséglet a topoizomeráz II aktivitáson kívül a transzportban részt

vevő, a nukleáris pórushoz asszociált nukleotid-trifoszfátáz fedezi, amely egyes vizsgálatok szerint a lamin A, illetve C N-terminális 46 kDa-os részletével azonos (Schröder és mtsai, 1987; Clawson és mtsai, 1988; Tőkés és Clawson, 1989). A sejtmag burkának felépítésében kulcsszerepet játszó laminoknak az RNS transzportban betöltött szerepére utal az is, hogy az RNS-transzport lamin B ellenes antitesttel is gátolható (Baglia és Maul, 1983).

Az mRNS a citoplazmában sem oldott állapotban van jelen. Az mRNS 5' vége sok esetben már a molekula 3' végének transzportja közben riboszómákkal asszociál. Az mRNS-nek 40 S riboszóma alegységhez való asszociációjáért több iniciációs faktorról együtt egy 24 kDa molekulatömegű, 7-metil-GpppG-kötő fehérje a felelős (Darnell és mtsai, 1990, p. 310). Ebből és mutációs kísérletekből az a kép kezd kirajzolódni, hogy a "félig kibújt" mRNS-t a fehérjeszintézis hajtóereje is segíti kihúzni a sejtmagból (Dingwall és Laskey, 1992).

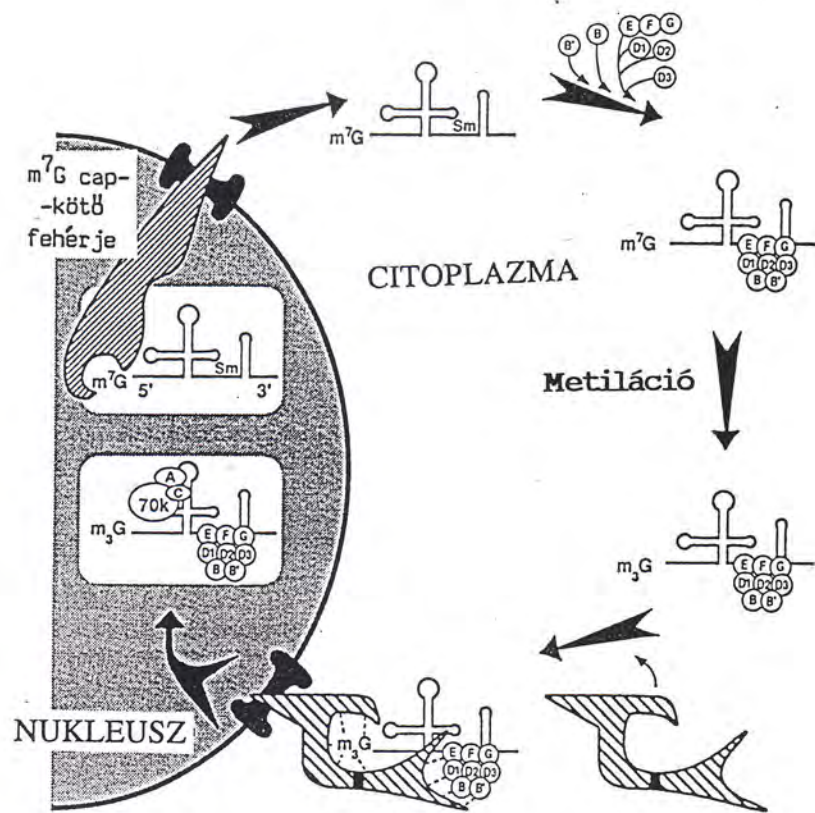
Az mRNS transzportja során a sejtmagra jellemző kísérőfehérjéket hátrahagyva, a riboszómák mellett citoplazmatikus fehérjékkel, valamint a citoskeletonnal is asszociál. Az asszociáció specificitása függ az mRNS fajtájától, így pl. számos citoskeletonális fehérjéről (pl. aktin, tubulin és vimentin) mutatták ki, hogy szintézisük és későbbi funkciójuk helye megegyezik. A nukleáris RNS-kötő fehérjék lecserélése azonban nem teljes, hiszen pl. a 36 kDa molekulatömegű, az RNS bázispárosodását katalizáló A1-es fehérje követi az mRNS-t a citoplazmába (Kumar és Wilson, 1990; Pinol-Roma és Dreyfuss, 1992). A 7-metil-GpppG-hez és a poli-A farokhoz asszociált citoplazmatikus fehérjék is hozzájárulhatnak ahhoz, hogy az mRNS transzportja egyirányú legyen (Schröder és mtsai, 1987).

Blobel (1985) Spector (1990) által kísérleti tényekkel alátámasztott hipotézise szerint egyre inkább elképzelhető, hogy adott nukleáris póruson csak a pórus melletti kromoszómán kódolt gének mRNS-ei áramlanak ki, azaz az mRNS transzport (és ezzel szoros összefüggésben a translációs folyamatok döntő része) igen nagyfokú térbeli aszimmetriát mutat a sejten belül.

#### **Az rRNS transzportjának mechanizmusa**

A riboszómális RNS kialakulása a sejtmagvacskában zajlik le. Az elsődleges 35-47 S pre-rRNS darabolódása után az 5, 17 és 28 S termékek transzportját feltételezhetően egymással kooperáló külön mechanizmusok segítik elő, amelyekről azonban elég keveset tudunk. A transzport során valószínűleg a riboszómák többé-kevésbé "összeszerelt" állapotban, hordozófehérje (fehérjék) segítségével jutnak át a nukleáris póruson (Khanna-Gupta és Ware, 1989; Bataillé és mtsai, 1990). Az 5 S rRNS először átmenetileg a transzkripció terminációjában részt vevő La antigénnel asszociál, majd az La fehérje a TFIIIA transzkripciós faktorra és az L5-ös riboszómális fehérjére cserélődik le. Az utóbbi két fehérjével való asszociáció az 5 S rRNS transzportjának elengedhetetlen feltétele (Guddat és mtsai, 1990). A 28 S rRNS transzportjában a numatrin (ribocharin, B23) vesz részt (Hügler és mtsai, 1985). A numatrinval együtt a nukleolin (C23) és az L3 fehérje is a nukleáris póruson keresztül ki és befelé egyaránt vándorol (Moreland és mtsai, 1985; Borer és mtsai, 1989), ami ezen fehérjék részvételét is valószínűsíti az rRNS transzportjában.





6. ábra A splicing-ban részt vevő U RNS kialakulásának és transzportjának vázlatos mechanizmusa (Nigg és mtsai, 1991; 3. ábra után) Az ábra magyarázatát lásd a szövegben

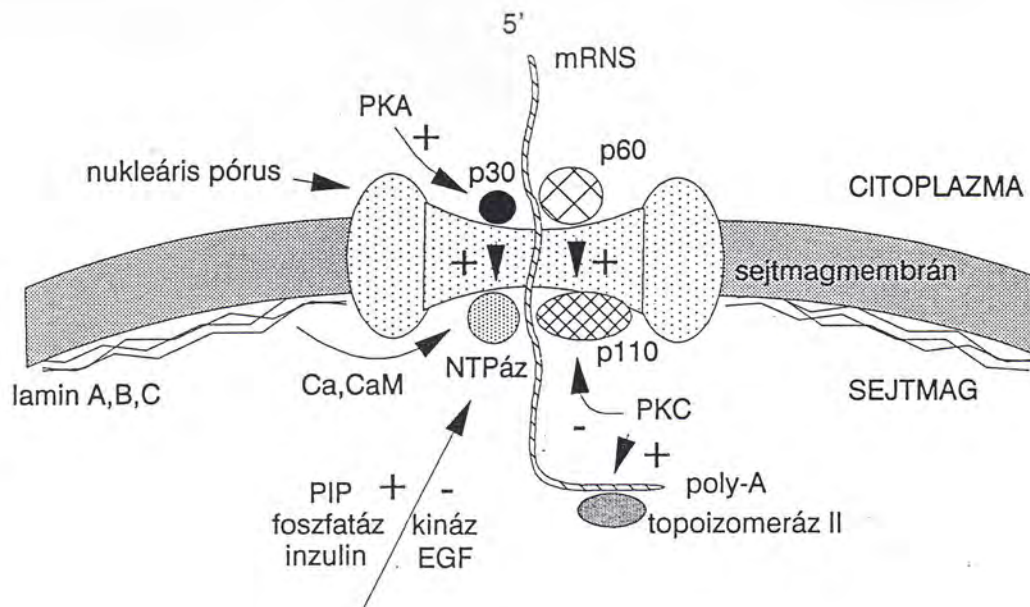
#### Az snRNS transzportjának mechanizmusa

A heteronukleáris RNS szabdalásában ("splicing") részt vevő kis nukleáris RNS-ek (snRNS-ek, U RNS-ek) kialakulása eltér az összes többi fajta RNS-étől, ugyanis érésük, fehérjékkel való asszociációjuk a citoplazmában zajlik le, ami után a kész U RNS-fehérje komplexek visszatranszportálódnak a sejtmagba (Nigg és mtsai, 1991). Az U RNS-ek kialakulásának és transzportjának főbb folyamatait a 6. ábrán mutatom be. Az U RNS prekürzora az 5' végén lévő, az mRNS-hez hasonló 7-metil-GpppN sapkát (cap) felismerő transzportfehérje segítségével kerül át a citoplazmába, ahol az 5' guanin 2,2,7-trimetil származékká alakul át és számos fehérjével asszociál. Az így kialakult komplexet egy másik transzportfehérje juttatja vissza a sejtmagba. A sejtmagba irányuló transzporthoz mind az 5' trimetil-guanin sapkára, mind pedig az asszociált fehérjekomplexre szükség van. Érdekes módon az összes többi transzportfolyamattal szemben az U RNS-ek döntő többségének transzportját a wheat germ agglutinin (WGA) nem gátolja, ami a még teljesen nem tisztázott transzportmechanizmus egyedi jellegére utal. Az U1, U2, U4 és U5-ös RNS-ekkel szemben az U6-os RNS transzportja más úton folyhat, amit eltérő (monometil) citoplazmatikus 5' sapkája és a wheat germ agglutininnal való gátolhatóság jelez (Nigg és mtsai, 1991).

#### A tRNS transzportjának mechanizmusa

A tRNS transzportjáról viszonylag keveset tudunk. Zasloff korai munkái tisztázták, hogy a transzport telítetű, így feltételezhetően szállítófehérjéhez kötött, és a tRNS-nek e szállítófehérje által történő felismerésében a "T-psi-C-kar" az egyik döntő elem (Zasloff és mtsai, 1982; Zasloff, 1983). A tRNS transzportjára is csak a





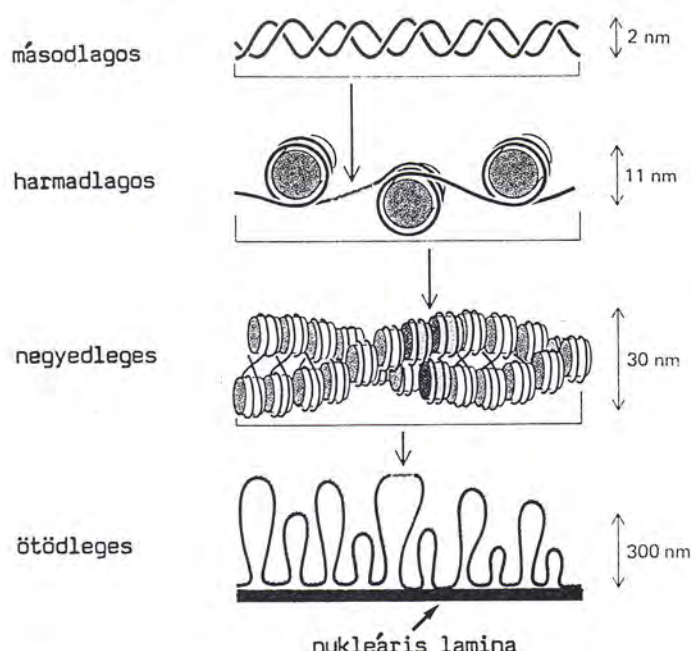
7. ábra Az mRNS transzport szabályozásának főbb mechanizmusai PKA = cAMP-függő fehérje kináz; p30, p60 = citoszolbeli, poli-A -kötő fehérjék; PKC =  $\text{Ca}^{2+}$ /foszfolipid-függő fehérje kináz; PIP = foszfati-dil-inozitol; CaM = kalmodulin; NTPáz = az mRNS transzportban részt vevő nukleozid-trifoszfataz; p110 = poli-A-felismerő fehérje; EGF = epidermális növekedési faktor; további magyarázatot lásd a szövegben

molekula teljes "érése" után kerül sor, amely az mRNS éréséhez hasonlóan a sejtmag belsejében zajlik le (Gerace és Burke, 1988). A transzportfolyamat néhány lépése az mRNS transzportjával közös lehet (Dargemont és Kühn, 1992).

#### Az RNS transzport szabályozása

Az RNS fajták transzportfolyamatai közül csak az mRNS transzportjának szabályozását vizsgálták részletesebben. A szabályozás főbb mechanizmusait a 7. ábrán mutatom be. A szabályozás fő eleme a 40 kDa-os nukleozid-trifoszfatazból (NTP-áz) és a 110 kDa-os poli-A felismerő fehérjéből (p110) álló transzport-komplex, amelyet egy eddig nem azonosított sejtmagbéli fehérje kináz gátol és a megfelelő foszfataz aktivál (Schröder és mtsai, 1987). A kináz az EGF, a foszfatazt az inzulin képes stimulálni ellentétes hatást gyakorolva ezáltal az mRNS transzportjára (Schröder és mtsai, 1990). A nukleozid trifoszfataz Clawson és csoportja szerint a lamin A és C N-terminális részlete, amely lehasadását fiziológiás kalciumkoncentrációk és kalmodulin jelenléte segítik (Clawson és mtsai, 1988; Tőkés és Clawson, 1989; Madsen és mtsai, 1990; Clawson és mtsai, 1992). Az NTP-áz RNS és foszfati-dil-inozitol hatására aktiválódik (Smith és Wells, 1984), fehérje kináz C-vel pedig működése gátolható (Schröder és mtsai, 1988). A nukleozid trifoszfataz mind szubsztrát-specifitásban, mind ionfüggésében, mind pedig RNS-sel való aktiválhatóságában különbözik a sejtmag membránjában megtalálható  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-áztól (Schröder és mtsai, 1987; v.ö. a 2.1.2.1. fejezettel).

## SZERKEZETI SZINT



8. ábra A DNS másodlagos, harmadlagos, negyedleges és ötödleges szerkezete

A nukleozid-trifoszfátzából és a poli-A felismerő fehérjéből álló mRNS transzport-komplexen kívül a szabályozás még két elemét sikerült eddig feltárni. Az mRNS transzport előtti kitekeredését a topoizomeráz II segíti. Az enzim aktivitása mind fehérje kináz C, mind kazein kináz II hatására megnő (Sahyoun és mtsai, 1986; Schröder és mtsai, 1987; Cardenas és mtsai, 1992). A citoplazmatikus oldalon a transzportálódó mRNS-t két poli-A kötő fehérje várja, amely feltételezhetően a transzport sikeres befejezését segíti elő, ugyanis poli-A jelenlétében az NTP-áz/poli-A felismerő komplex aktiválására képes. A fehérjék közül a 30 kDa molekulatömegű aktiváló hatása cAMP-függő fehérje kináz jelenlétében felerősödik (Schröder és mtsai, 1987).

### 2.1.3. A sejtmagon belüli folyamatok szabályozása

A sejtmagban lezajló legfontosabb folyamatok, a transzkripció és a replikáció alapvetően a DNS-sel kapcsolatosak. A sejtmagot a citoplazmától leginkább a benne összezsúfolt makromolekulák kompaktága különbözteti meg. A citoplazmához képest a sejtmagban nincs hely (egyedül a fehérjekoncentráció mintegy 200 mg/ml-es), így mind a transzkripció, mind a replikáció szabályozásában az elemi részfolyamatok térbeli rendezettsége különös jelentőséget kap (Hancock és Hughes, 1982; Gross és Garrard, 1987; Berezney, 1991; Jack és Eggert, 1992). Így a sejtmag felépítésében résztvevő "unalmas" struktúrális elemek sorra a sejtmagbeli jelátviteli folyamatok "izgalmas" kulcsszereplőivé válhatnak. Ebből a szemléleti alapállásból kiindulva a sejtmagon belüli legfontosabb folyamatok szabályozását egy szokatlan szempont, a DNS-szerkezet szintjei szerint csoportosítva fogom tárgyalni. Az eukromatinban található DNS másodlagos, harmadlagos, negyedleges és ötödleges szerkezetét a 8. ábrán mutatom be. (A heterokromatin pontos negyed- és különlegesen ötödleges szerkezete egyelőre nem ismeretes.) Ismereteink mai szintjén a különböző sejtmagbeli jelátviteli folyamatokat a DNS harmadlagos szerkezetének, a nukleosómáknak és az őket összekötő H1-es hisztonoknak a változásaival tudjuk összefüggésbe hozni, de mind több jel utal arra,



hogy a DNS magasabbrendű (negyed- és különösen ötödleges) szerkezete is szerepet játszik a nukleáris jelátvitelben (Hancock és Hughes, 1982; Berezney, 1991; Dingwall és Laskey, 1992; Jack és Eggert, 1992).

### 2.1.3.1. Szabályozás a DNS harmadlagos szerkezete, a nukleoszómák szintjén

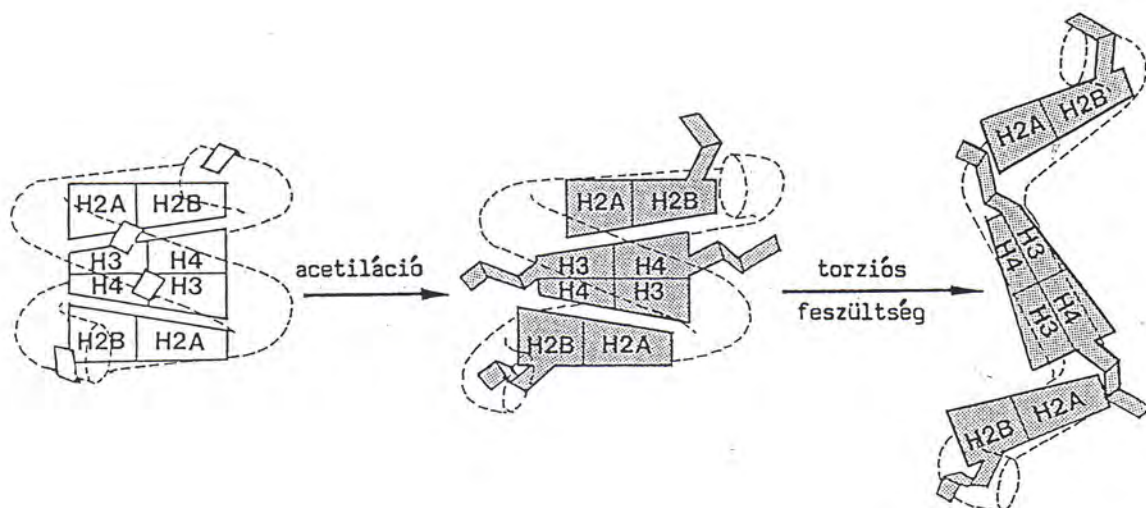
A DNS harmadlagos szerkezeti szintjének legfontosabb eleme, a nukleoszómák finomszerkezetét Aaron Klug és munkatársai tették elektronmikroszkóposan láthatóvá a nyolcvanas évek elején (Richmond és mtsai, 1984). A nukleoszómák kialakulása általában szoros periodicitást mutat, de a létrejött szerkezet stabilitása, feszessége függ a DNS helyi bázissorrendjétől, a DNS ebből következő "hajlíthatóságától" (Travers, 1987). A DNS harmadlagos szerkezete azonban nem csak az örökölt és változatlan bázissorrend által meghatározott. A szabályozásban szerepet játszó egyéb, a DNS harmadlagos szerkezetét is befolyásoló folyamatokat a 3. táblázatban foglaltam össze.

#### *Változások a DNS szerkezetben*

A DNS szerkezetének a szabályozó folyamatokkal összefüggő legfontosabb módosulása a DNS csavarodottsága (csavarása) folytán fellépő torziós feszültség. A nukleoszómákban a torziós feszültség hatására létrejövő lehetséges változások egyikét a 9. ábra mutatja be. Mint látható, a DNS csavarodottságának változtatásával a már előzetesen fellazított nukleoszóma "kitekeredik", ezáltal a DNS szerkezete a transz-

Szabályozás módja	Irodalmi hivatkozás
<i>Változások a DNS-szerkezetben</i>	
-- torziós feszültség	Ausio, 1992
-- Z-DNS	Rich, 1983
-- DNS metiláció	Cedar, 1988
<i>Hisztionok poszttranszlációs modifikációi</i>	
-- foszforiláció	Roth és Allis, 1992
-- acetiláció	Csordas, 1990
<i>Kis specificitású DNS-kötő fehérjék</i>	
-- HMG14/17	Gonzales és Palacian, 1990
<i>Nagy specificitású DNS-kötő fehérjék -- transzkripciós faktorok</i>	
-- transzport a sejtmagba	Dingwall, 1991
-- foszforiláció	Hunter és Karin, 1992
-- redox folyamatok	Xanthoudakis és Curran, 1992
<i>Transzkripciós faktorok kölcsönhatásai más fehérjékkel</i>	

3. táblázat A sejtmagban lezajló folyamatok szabályozásának módjai a DNS harmadlagos szerkezete, a nukleoszómák szintjén



9. ábra A torziós feszültség hatása a nukleosómák szerkezetére (Ausio, 1992; 2. ábra után)

kriptációs és replikatív folyamatok számára elérhetővé válik (Ausio, 1992). A DNS csavarodottságának szabályozása döntően a topoizomeráz I és II aktivitás révén valósul meg (Gross és Garrand, 1987; Liu, 1989). Mivel transzkripció és replikáció közben a DNS torziós feszültsége nő, ez a DNS-láncon tovaterjedő jelként katalizálhatja a soronkövetkező, vagy akár távolibb DNS szakaszok kitekeredését.

Biológiai rendszerekben a DNS feszültségmentes állapotához képest "kitekerten" fordul elő. Ez a negatív felcsavarodottság (supercoiling) a citozin C5-ös oldalláncának metilezésével, fehérjék kötődésével és többértékű kationokkal együtt kedvez a *balmenetes Z-DNS* kialakulásának. A Z-DNS kialakulása a "csendes", a transzkripciós és replikatív folyamatokban részt nem vevő DNS szakaszokra jellemző (Rich, 1983; Rich és mtsai, 1984). A Z-DNS, a stabilisabb, "normális", B-DNS-sé való átalakulása önmagában is torziós feszültséget okoz, amely "tervezett" folyamatként is elősegítheti a szomszédos, vagy akár távolibb DNS szakaszok aktiválását (Rich, 1983).

A citozin 5-ös helyzetben történő *metilációja* csökkenti az adott DNS-részlet transzkripciós aktivitását. Egyre több megfigyelés utal arra, hogy a DNS metilációjának nagy szerepe van a transzkripció általános szabályozásában: Razin és mtsai (1986) differenciálódó sejtekben bizonyos DNS szakaszok metil-citozin  $\rightarrow$  citozin cserével történő demetilációjáról számoltak be, amely szerepet játszhat e szakaszok aktiválásában, Jost és munkatársai pedig egy metilezett DNS-hez szelektíven kötődő hiszton H1-származékot írtak le, amely ösztadiol hatására a metilezett DNS szakaszból leválik (Jost és mtsai, 1991; Jost és Hofsteenge, 1992). A metiláció az adott gén ki-vagy bekapcsolásában alárendelt szerepet játszik, mintegy elősegíti, megerősíti a génre ható szekvenciaspecifikus aktivátorok, illetve represszorok hatását. A metiláció pontos hatásmechanizmusa nem ismeretes: szerepe lehet a DNS-kötő fehérjék affinitásának változtatásában és a DNS fentiekben leírt balmenetes (inaktív) konformációjának stabilizálásában is (Razin és mtsai, 1984; Cedar, 1988).



A DNS-hez hisztonok és nem hiszton fehérjék kötődnek. Az utóbbiak közül kis és nagy specificitású DNS-kötő fehérjéket tudunk megkülönböztetni. A DNS-hez különösebb válogatás nélkül kötődő fehérjékre a HMG14 és HMG17 egy jellemző példa. Más fehérjék, pl. a transzkripció faktorok ezzel szemben bizonyos meghatározott DNS szekvenciákhoz mutatnak nagy affinitást. Az alábbiakban a DNS-sel kapcsolatos folyamatoknak a kötő fehérjék oldaláról történő szabályozását ebben a sorrendben (hisztonok, kis és nagy specificitású DNS-kötő fehérjék) fogom tárgyalni.

#### *Hisztonok posztranszlációs modifikációi*

E modifikációk közül a foszforilációnak és az acetilációnak van fontos szabályozó szerepe. *In vitro* szinte minden hiszton szinte minden kináz foszforilál. A lehetséges folyamatok e zavarbaejtően gazdag választéka közül a H1-es hisztonnak a sejtosztódás során a cdc2 kináz által történő foszforilációja a legismeretesebb. Mivel a kromoszómák kialakulása során a kromatin nagyfokú kondenzációja valósul meg, sokáig a H1-es hiszton foszforilációját is a kondenzáció előfeltételének/kísérőjeleniségének hitték. Friss eredmények szerint a nukleoszóma-khoz kötött H1-es hiszton foszforilációjára a cdc2 kináz képtelen és jónéhány olyan rendszer létezik, ahol a H1-es hiszton foszforilációja a kromatin dekondenzációjához vezet (Roth és Allis, 1992; Jerzmanowski és Cole, 1992). A H1 mellett a H2A és a H4-es hiszton foszforilációját is kimutatták a kromatin dekondenzációja során. A H3-as hisztonnak pedig éppen ellenkezőleg, a defoszforilációját lehetett megfigyelni ilyen körülmények között (Blank és mtsai, 1992). Sajnálatos módon mindeztidig nem alakult ki egy olyan egyértelmű kép, amely a hisztonok foszforilációját és a szabályozási folyamatokat meg tudta volna egymásnak feleltetni.

A helyzetet tovább bonyolítják Jouko Oikarinen-nek és csoportjának felfedezései, amelyek szerint a H1-es hiszton egy ATP/GTP kötésére és hidrolízisére képes fehérje, amelynek DNS-sel szemben mutatott affinitását a nukleotidok jelenléte nagymértékben csökkenti (Oikarinen, 1991; Mannermaa és Oikarinen, 1992; Nilsson és mtsai, 1992), valamint a HMG14 fehérjével kiegészített kromatoszóma (a nukleoszóma hiszton magja + H1-es hiszton) egy kalmodulin-függő fehérje kináz aktivitással rendelkezik (Oikarinen és mtsai, 1993). A kromatoszóma-kináz így új szereplőként részt vehet a saját, vagy szomszédos hisztonok, transzkripció faktorok és más DNS kötő fehérjék foszforilációjában.

A hiszton acetiláció pontos szerepe (a foszforilációéhoz hasonlóan) nem tisztázott. A meglévő eredmények szerint acetilált hisztonok főként a transzkripcióban aktívan részt vevő DNS részekén dúsulnak fel, ahol a nukleoszóma-kat összekötő DNS szakaszok "lazításával" a DNS negyedleges szerkezetének megbomlását okozzák (ld. 8. ábra; Csordas, 1990; Ausio, 1992). Ausio (1992) hipotézise szerint a hiszton acetiláció a nukleoszóma-k belső szerkezete fellazulásának is egyik előfeltétele (ld. 9. ábra).

#### *Kis specificitású DNS-kötő fehérjék*

E fehérjék közül a legtöbb figyelem a HMG14-es és HMG17-es fehérjékre irányult (HMG = high mobility group). Mindkét fehérje feldúsul a transzkripcióban aktívan részt vevő DNS szakaszokon (Weisbrod és Weintraub, 1979) ahol feltételezhetően a meglazult nukleoszóma egyik H2A-H2B hiszton párja (ld. 9. ábra) helyére "ülnek be",

a kromatin szerkezetét stabilizálva ugyan, de a transzkripciót nem zavarva (Gonzalez és Palacián, 1990). Oikarinen és munkatársai (1993) felfedezése szerint a HMG14 a kromatinnak fehérje kináz aktivitást, a HMG17 pedig  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-áz aktivitást kölcsönöz. Ezen utóbbi enzimfunkciók a HMG14 és HMG17-es fehérjék *aktív* részvétele engedik következtetni a transzkripciós folyamatokban.

#### *Nagy specificitású DNS-kötő fehérjék*

Az eukarióta DNS replikációjának szabályozásában részt vevő nagy specificitású DNS-kötő fehérjékről, mint az iniciációs komplexről, a replikáció megindítására jelet adó "S-fázis aktivátor"-ról vagy a befejezett replikációt jelző "STOP"-fehérjéről viszonylag keveset tudunk (Alberts és mtsai, 1989; Darnell és mtsai, 1990; Thömmes és Hübscher, 1990; Jindal és mtsai, 1991; Jacobs, 1992; Ren és mtsai, 1993). Emiatt a továbbiakban a *transzkripció* nagy specificitású DNS-kötő fehérjéinek, leginkább a transzkripciós faktoroknak a szabályozó mechanizmusait fogom áttekinteni.

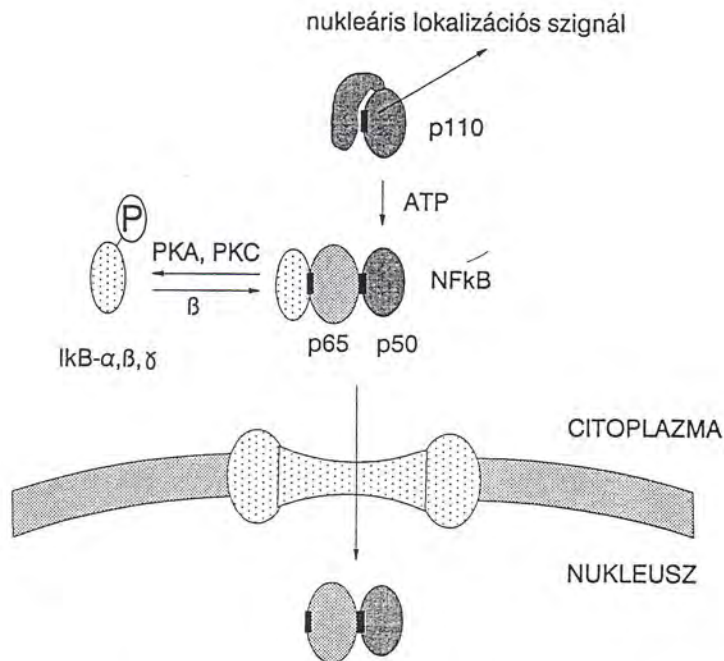
A transzkripciós faktorok hatásait több, egymással összefüggő mechanizmus szabályozza. *Eredményét* tekintve a szabályozás befolyásolhatja az adott transzkripciós faktor koncentrációját általában és a sejtmagon belül, DNS kötődésének affinitását és specificitását, valamint a transzkripciót aktiváló, illetve gátló hatását. *Mechanizmusa* szerint a szabályozás érintheti a transzkripciós faktor szintézisét (ez a szabályozás döntően más transzkripciós faktorokra vezethető vissza), transzportját a sejtmagba, poszttranszlációs módosításait (foszforiláció, redox módosítások) és --döntően az előzőek következményeként-- asszociációját más fehérjékkel (Hunter és Karin, 1992). Az alábbiakban a transzkripciós faktorok nukleáris transzportjának, foszforilációjának és redox módosításainak szabályozó szerepére fogok néhány példát bemutatni.

#### Szabályozás a sejtmagba irányuló transzport révén

Egyre nő azoknak a transzkripciós faktoroknak a száma, amelyek esetén ismert az a mechanizmus, amely sejtmagba jutásukat szabályozza (Dingwall, 1991). Néhányukat, így a fos/jun-t, az NFkB-t és a szteroid receptorokat már a 2. táblázatban (lásd 11. oldal) is bemutatam. A jun esetén a nukleáris transzportot a transzkripciós faktor citoszolban megvalósuló foszforilációja szabályozza (Chida és Vogt, 1992). Más faktorok esetén is, mint pl. az interferon-alfa hatásmechanizmusában részt vevő ISGF3-nál, a T limfociták aktivációjához vezető NF-AT-nál és a C/EBP-nél az eddigi kísérletek a foszforiláció szerepét valószínűsítik az adott transzkripciós faktor nukleáris transzportjának szabályozásában (Hunter és Karin, 1992). Az NFkB és a szteroid receptorok esetén a (feltárt) szabályozás bonyolultabb; mind a transzkripciós faktorok nukleáris lokalizációs szignálját elfedő fehérjéket, mind pedig poszttranszlációs módosításokat tartalmaz. Az NFkB szabályozásának mechanizmusát a 10. ábrán mutatom be, a szteroid receptorok szabályozására pedig a 2.2.4.2. fejezetben térek vissza.

Az NFkB sejtmagba jutását a nukleáris lokalizációs szignálját elfedő I $\kappa$ B gátlófehérje  $\text{Ca}^{2+}$ - és foszfolipid-függő és cAMP-függő fehérje kinázok által katalizált foszforilálása teszi lehetővé. A foszforilált I $\kappa$ B leválik az NFkB dimerről, ami után a 65 kDa-os alegység nukleáris lokalizációs szignálja szabadon felismerhetővé válik (Inoue és mtsai, 1992; Link és mtsai, 1992). Az NFkB 50 kDa-os alegysége egy 110 kDa-os előfehérjéből ATP-függő limitált proteolízissal keletkezik (Fan és Maniatis, 1991). A proteolízis során lehasad a fehérje N-terminálisán elhelyezkedő nukleáris lokalizációs szignált elfedő C-terminális részlet (Henkel és mtsai, 1992).





10. ábra Az NFκB aktiválásának mechanizmusa (Lenardo és Baltimore, 1989; Fan és Maniatis, 1991; Henkel és mtsai, 1992; Inoue és mtsai, 1992; valamint Link és mtsai, 1992 nyomán) p50, p65 = NFκB alegységek; p110 az 50 kDa-os NFκB alegység prekursora; IκB = az NFκB sejtmagba jutását megakadályozó fehérje; PKC =  $\text{Ca}^{2+}$ -foszfolipid-függő fehérje kináz; PKA = cAMP-függő fehérje kináz; további magyarázatot lásd a szövegben

Jelenleg még nem tisztázott, hogy az NFκB 65 kDa-os alegységéhez kötő IκB fehérje hogyan akadályozza meg az 50 kDa-os alegységen lévő másik nukleáris lokalizációs szignál felismerését. Naumann és munkatársai (1993) újabb eredményei szerint az IκB-hez hasonlóan p100-es NFκB prekursor is képes az NFκB-hez való kötődésre, és ezáltal a komplex sejtmagba jutásának megakadályozására.

#### Szabályozás foszforilációval

Jelenleg több mint tucatnyi azon transzkripciósfaktoroknak a száma, amelyek DNS-hez való kötődésének, és/vagy transzaktiváló hatásának szabályozásában a foszforiláció szerepét tisztázni lehetett. Az eddig felderített példákat a 4. táblázatban foglalom össze. Az eddigi fejlődés és a csaknem száz részletes tanulmányozásra váró foszforilált transzkripciósfaktor ismeretében könnyen megjósolható, hogy az "1001 kináz" és az "1002 foszfatáz" mellé hamarosan az 1003 foszforilált transzkripciósfaktor is csatlakozni fog.

Nem is olyan egyszerű bebizonyítani, hogy egy transzkripciósfaktornak egy adott fehérje kináz által megvalósuló foszforilációja tényleg részt vesz az adott faktor aktiválásában. *In vitro* szinte minden kináz minden transzkripciósfaktort foszforilál. Így az adott szignálra megvalósuló *in vivo* foszforiláció kimutatása mellett tisztázni kell azt is, hogy tényleg az a kináz tényleg azon a helyen foszforilálta a transzkripciósfaktort, amely az *in vivo* aktiválódáshoz vezet. A 4. táblázat kérdőjelei azt jelzik, hogy az adott esetben e vizsgálatok egyike-másika még nem történt meg, vagy az eredmények nem voltak kielégítőek, egyértelműek.

Hatás/Transzkripciósfaktor	A foszforilációért felelős kináz(ok)
<i>A DNS-hez való kötődés aktiválása</i>	
SRF	CK II
GBF1 (növényi)	CK II
<i>A DNS-hez való kötődés gátlása</i>	
c-myb	CK II
c-jun	CK II, GSK-3
max	CK II
miogenin	PKC
oct1	PKA (?)
GHF-1/pit1	PKA
<i>A transzaktiváló hatás erősítése</i>	
CREB	PKA, CK II (?), CaCaM-PK (?)
c-jun	MAP kináz (?), raf (?)
c-myc	MAP kináz (?), GSK-3 (?), PKC (?)
C/EBP-β	CaCaM-PK
HSF (?)	
<i>A transzrepresszió erősítése</i>	
c-fos	cdc2 (?)
<i>A transzrepresszió gátlása</i>	
v-erbA	PKA, PKC
ADR1 (élesztő)	PKA

4. táblázat Transzkripciósfaktorok DNS-hez való kötődésének és transzaktiváló hatásának szabályozása foszforilációs folyamatok révén (Hunter és Karin, 1992 valamint Morimoto és mtsai, 1992 nyomán) Felhasznált rövidítések: CK II = kazein kináz II; GSK-3 = glikogén szintáz kináz 3; PKA = cAMP-függő fehérje kináz; PKC =  $\text{Ca}^{2+}$ -foszfolipid-függő fehérje kináz; CaCaM-PK = kalcium-kalmodulin-függő fehérje kináz; MAP kináz = mitogén aktivált fehérje kináz; SRF = szérumban response faktor; oct1 = ATGCAAAT oktamer szekvencia-kötő fehérje; GHF1/pit1 = hipofízis transzkripciósfaktor; CREB = "cAMP response element" kötő fehérje; C/EBP-β = CCAAT/ enhancer-kötő fehérje-β; HSF = hő-sokk faktor

Érdekes módon eddig nemigen vizsgálták azt, hogy a transzkripciósfaktorok foszforilációja a citoplazmában, vagy a sejtmagban játszódik le. A sejtben elég nagy mennyiségben jelenlévő, a kinázoknál kisebb szelektivitást mutató foszfatázok miatt (Cohen, 1989) a sejtmagon belüli foszforiláció valószínűbbnek látszik. Ezt az a tény is alátámasztja, hogy a szerepet játszó kinázok közül a  $\text{Ca}^{2+}$ -foszfolipid-függő fehérje kináz, a kalcium-kalmodulin-függő fehérje kináz, a kazein kináz II, a MAP kináz és a cdc2 kináz számottevő mennyiségét mutatták ki a sejtmagban (Masmoudi és mtsai, 1989; Rogue és mtsai, 1990; Bachs és mtsai, 1992; Krek és mtsai, 1992; Sanghera és mtsai, 1992; Chen és mtsai, 1992; Riabowol és mtsai, 1989; Bailly és mtsai, 1989), a cAMP-függő, a  $\text{Ca}^{2+}$ -foszfolipid-függő fehérje kinázok,



valamint a kazein kináz II, a MAP kináz és a raf pedig aktivációjuk után a sejtmagba rendeződnek át (Nigg és mtsai, 1985; Cambier és mtsai, 1987; Buckley és mtsai, 1988; Leach és mtsai, 1989; Hocevar és Fields, 1991; Cochet és mtsai, 1991; Blenis, 1991; Rapp és mtsai, 1988).

Sajnálatos módon a foszfatázok szerepének tisztázása mind a mai napig meglehetősen háttérbeszorított a transzkripció faktorok szabályozásának kutatásában. Az általános feltételezés az, hogy a foszfatázok kis száma, és csekély szubsztrátspecifitása kevés teret enged a szabályozási folyamatoknak. Ennek az előítéletnek meglehetősen ellentmondanak a jun és a CREB vizsgálata során kapott eredmények. A jun C-terminális részlete igen gyorsan elveszíti foszfát tartalmát a sejt aktivációja során. Mivel a régió foszforilációjáért felelős kinázok (kazein kináz II, glikogén szintáz kináz 3) aktívak, vagy aktiválódnak hasonló körülmények között, a fokozott defoszforiláció a foszfofehérje-foszfatáz 1 vagy 2A aktiválására vezethető vissza (Thevenin és mtsai, 1991; Hunter és Karin, 1992). A CREB cAMP-függő aktivációját a foszfofehérje-foszfatáz 1 "tartja kordában". Érdekes módon a foszfatáz inhibitor fehérjéjét a cAMP-függő kináz aktiválja, amely így módon a CREB aktiválását foszforilációjával és defoszforilációjának gátlásával egyaránt elősegíti (Karin és Smeal, 1992).

A transzkripciót a szevencia-specifikus transzkripció faktorokon kívül a "TATA-box"-hoz kötő általános transzkripció faktorok és az RNS polimeráz II foszforilációjával is szabályozni lehet. Az RNS polimeráz II-öt C-terminális részletének foszforilációja segíti abban, hogy a starthely felismerése után a TFIID általános transzkripció faktorról ledisszociálva a transzkripció elongációs szakaszába lépjen. A foszforilációért felelős kináz jelenleg még nem ismeretes (Hunter és Karin, 1992).

#### Redox folyamatokon keresztül megvalósuló szabályozás

Az utóbbi években számos transzkripció faktorról sikerült kimutatni, hogy aktivitásuk redukciójukkal, vagy oxidációjukkal szabályozható (5. táblázat). A fos/jun esetén egy 37 kDa molekulatömegű, ref-1-nek nevezett fehérje vesz részt a heterodimer egy-egy SH csoportjának redukciójában, ami a fos/jun DNS-kötődésének aktiválásához vezet (Abate és mtsai, 1990; Xanthoudakis és Curran, 1992). Az NFkB disszociációját az inhibitor szerepet betöltő Ikb-tól a citoszolbeli NFkB-Ikb komplex oxidációja is

Transzkripció faktor	Irodalmi hivatkozás
progeszteron receptor (-)	Silva és Cidlowski, 1989
glükokortikoid receptor (-)	Peleg és mtsai, 1989
TFIIIC (-)	Cromlish és Roeder, 1989
ISGF3 (-)	Levy és mtsai, 1989
OxyR (E. Coli) (+)	Storz és mtsai, 1990
fos/jun (-)	Abate és mtsai, 1990
NFkB (+)	Toledano és Leonard, 1991

5. táblázat Transzkripció faktorok aktivitásának szabályozása redox folyamatokkal A használt rövidítések: ISGF3 = interferon-alfa transzkripció faktor; OxyR = az E. Coli oxidatív stressz esetén aktiválódó transzkripció faktora; a (-) jel arra utal, hogy az adott transzkripció faktor oxidáció hatására aktivitását elveszti

elősegíti (Toledano és Leonard, 1991; Schreck és mtsai, 1991). A transzkripciós faktorok redox szabályozásának különös jelentőséget kölcsönöz az a tény, hogy a redukált glutation koncentrációja a sejtmagban a citoplazmáénál mintegy négyszeresére magasabb (Bellomo és mtsai, 1992/b). A redukáló környezet segíthet a transzkripciós faktorok aktiválásában, oxidatív stressz esetén pedig a nem hő-sokk fehérjékre irányuló transzkripció "elnémítása" tovább segítheti a hő-sokk fehérjék szelektív szintézisét. Régebbi megfigyelések szerint a sejtmag e redukáló környezetének fokozatos "elromlása" szerepet játszhat az öregedés során fokozatosan bekövetkező transzkripciós válaszképtelenségben (Tas, 1978).

#### *Transzkripciós faktorok kölcsönhatásai más fehérjékkel*

A transzkripciós faktorok nem csak a DNS-sel lépnek kölcsönhatásba, hanem egymással és hisztonokkal is. E kölcsönhatások a szabályozás egy új szintjét jelentik, ahol az egyedi fehérjék módosulásai egymást erősítve, vagy kioltva vezethetnek el a transzkripcióra gyakorolt végleges hatáshoz. E fehérje-fehérje kölcsönhatások szabályozó szerepének néhány példáját a 6. táblázatban mutatom be.

#### Transzkripciós faktorok kölcsönhatásai egymással

A transzkripciós faktorok elsőként megismert változatához hasonló, homológ fehérjéket eddig a legrészletesebben a fos és a jun esetén tanulmányozták. A fos, fosB, fra-1, fra-2 és a jun, junB, junD fehérjék között jun-jun homodimerek és jun-fos heterodimerek egyaránt képződhetnek. A lehetséges (meglehetősen nagyszámú) variációk előfordulási arányát alapvetően az egyes homológok aktuális koncentrációja határozza meg. A képződő termékek a DNS közel ugyanazon helyére kötnek, de DNS-kötő affinitásuk és transzaktiváló hatásuk különböző (Curran és Fianza, 1988; Kovary és Bravo, 1991; Karin és Smeal, 1992). A cAMP-válasz elemhez kötődő CREB fehérje kilenc ismert homológ változata közül az egyik, a CREM kompetitív inhibitoraként viselkedik (Hai és Curran, 1991; Karin és Smeal, 1992). Hasonló homológ sorokat minden bizonnyal számos más transzkripciós faktor esetén is fel fognak tárnai a közeli jövőben.

A fos/jun heterodimer a "cAMP-response element"-hez is kötni képes. Hasonlóképpen a cAMP-válaszért felelős DNS szakaszhoz kötő CREB fehérjék a fos vagy jun fehérjékkel heterodimereket képezve a fos/jun kötőhelyeül szolgáló TPA-válaszért felelős DNS szakaszhoz is kötődhetnek. A különböző heterodimerek eltérő affinitásuk és transzaktiváló hatásuk mellett (a tisztán fos/jun változatokkal ellentétben) DNS-kötésük specificitásában is különböznek (MacGregor és mtsai, 1990; Hai és Curran, 1991; Karin és Smeal, 1992; Masquillier és Sassone-Corsi, 1992). A fos/jun heterodimer és a szteroid receptorok is képesek egymás DNS-kötésének kölcsönös gátlására (ld. bővebben 2.2.4.2. fejezet; Yang-Yen és mtsai, 1990; Hass és mtsai, 1991).

A transzkripciós faktorok eddig feltárt kölcsönhatásai közül még a hő-sokk faktor (HSF) hőhatásra bekövetkező oligomerizációja és ezáltal DNS-kötésének átrendeződése (Westwood és mtsai, 1991), valamint a szérum response faktor (SRF) kötőhelyéhez asszociált mintegy 7 transzkripciós faktor kölcsönhatásai (Treisman, 1992) érdemelnek említést.

#### Transzkripciós faktorok kölcsönhatásai hisztonokkal

A nyugvó kromatin hisztionszerkezetének számottevően meg kell változnia ahhoz, hogy az adott génszakasz aktiválódjon. E változásokban a 18-19. oldalon említetteken



*Transzkripciós faktorok  
kölsönhatásai egymással*

-- fos(fosB, fra-1, fra-2)/ /jun(junB, junD)	Curran és Franza, 1988
-- CREB/CREM	Karin és Smeal, 1992
-- fos-jun/CREB	Hai és Curran, 1991
-- HSF oligomerizáció	Westwood és mtsai, 1991
-- SRE-kötő fehérjék	Treisman, 1992

*Transzkripciós faktorok  
kölsönhatásai hisztonokkal*

-- szteroid receptor/ /nukleoszóma	Pina és mtsai, 1990
-- TFIIIA/hiszton H2A-H2B	Hayes és Wolffe, 1992
-- GAL4/nukleoszóma	Workmann és Kingston, 1992
-- "makro"-hiszton H2A	Pehrson és Fried, 1992

*Transzkripciós faktorok  
kölsönhatásai más fehérjékkel*

<u>Gátlófehérjék</u>	
-- NFkB/IkB	Lenardo és Baltimore, 1989
-- szteroid receptor/hsp90	Pickard és Yamamoto, 1987
-- HSF/hsp70	Morimoto és mtsai, 1992
-- fos-jun/inhibitor (IP-1)	Auwerx és Sassone-Corsi, 1991
-- C/EBP-β/p53	Agoff és mtsai, 1993

Aktivátorok

-- NF-AT/28 kDa aktivátor	Granelli-Piperno és McHugh, 1992
-- fos/19 kDa aktivátor (FIP)	Blancar és Rutter, 1992
-- NF-kB/HMG1	Thanos és Maniatis, 1992

6. táblázat Transzkripciós faktorok és más fehérjék közötti kölcsönhatások szerepe a sejtmag szabályozási folyamataiban Felhasznált rövidítések: fosB, fra-1, fra-2 = fos homológ fehérjék; junB, junD = jun homológ fehérjék; CREB = "cAMP response element" kötő fehérje; CREM = CREB homológ fehérje; HSF = hő-sokk faktor; SRE = (serum response element) reguláló DNS-szakasz; TFIIIA = a III osztályba tartozó általános transzkripciós faktor; GAL4 = élesztő transzkripciós faktor; NFkB = nukleáris faktor kappa B; IkB = az NFkB sejtmagba jutását megakadályozó fehérje; hsp = hő-sokk fehérje; C/EBP-β = CCAAT/enhancer-kötő fehérje-β; NF-AT = limfocita specifikus nukleáris faktor; p53 = antionkogén fehérje

túl a transzkripciós faktoroknak a kromatinnal való közvetlen kölcsönhatásai is szerepet játszanak (Grunstein, 1992). Pina és mtsai (1990), valamint Archer és mtsai (1991) a szteroid receptorok nukleoszómákat lazító hatásáról számoltak be. Hasonló folyamatokat észleltek a GAL4 és a TFIIIA transzkripciós faktorok esetén is. A kompetíció a H2A és H2B hisztonokkal általában erősebb, mint a DNS-hez szorosabban kötődő H3-H4 dimerrel, ld. 9. ábra (Workmann és Kingston, 1992; Hayes és Wolffe, 1992). Nemrégiben Pehrson és Fried (1992) egy leucin "cipzár" dimerizációs részletet is tartalmazó 42 KDa-os "óriás H2A hiszton" írt le, amely számos transzkripciós faktorkhoz, így pl. a fos-jun-CREB család tagjaihoz is kötődhet.

### Transzkripció faktorok kölcsönhatásai más fehérjékkel

Eddig két olyan transzkripció faktor, az NF $\kappa$ B és a szteroid receptor ismeretes, amelyek bejutását a sejtmagba más citoszolbeli fehérjékkel (az I $\kappa$ B-vel és a hsp90-nel) alkotott komplexük akadályozza meg (Lenardo és Baltimore, 1989; Pickard és Yamamoto, 1987; ld. részletesebben 10. ábra és 2.2.4.2. fejezet). A hő-sokk faktor, a fos/jun heterodimer és a C/EBP esetén pedig az inhibitor fehérjék (hsp70, egy 30-40 kDa-os gátlófehérje és a p53-as antionkogén) a faktorok DNS-kötődését akadályozzák meg (Morimoto és mtsai, 1992; Auwerx és Sassone-Corsi, 1991; Agoff és mtsai, 1993).

Nemrégiben a limfocitákra specifikus NF-AT transzkripció faktorot illetve a fos-t aktiváló fehérjét is feltártak. Az aktiválás pontos mechanizmusa egyelőre nem ismeretes (Graneli-Piperno és McHugh, 1991; Blonar és Rutter, 1992). Thanos és Maniatis (1992) nemrégiben a HMG I-es fehérjének az NF- $\kappa$ B transzkripció faktor DNS-hez való kötődését segítő szerepéről számoltak be.

### **2.1.3.2. Szabályozás a DNS magasabb szerkezeti szintjein**

A transzkripció/replikáció folyamatok szabályozásában a DNS nukleoszómák feletti szerkezeti szintjei is részt vesznek. Aktív szerepükre utal az a tény is, hogy a transzkripció faktoroknak elég az átírandó génszakasz végére kötniük ahhoz, hogy a nukleoszómák sorozatos meglazulását igénylő transzkripció az egész génen végighaladjasson.

Az egyes nukleoszómákat a H1-es hiszton "köti össze". A H1-es hiszton kötődése erős kooperativitást mutat, így az irányított H1-hiszton láncok kiépülése, illetve felfeszlése önmagában is a DNS nagyobb szakaszaira kiható esemény lehet. A H1-es hisztonnak számos izoformája, illetve poszt-transzláció módosulata ismeretes, ezek szelektív beépülése az egyes génszakaszokat kódoló DNS eltérő stabilitásához vezethet (Zlatanova, 1990).

Az interfázisú DNS magasabbrendű szerveződésére a nukleáris mátrixhoz kapcsolódó, 50-100 kilobázis hosszúságú hurkok jellemzőek (ld. 8. ábra). Az egyes hurkok kiindulási pontjainál ("scaffold associated region" = SAR, vagy "matrix attachment region" = MAR) a H1-es hisztonok preferált kötődése figyelhető meg, így ezek a pontok akár az egész hurokra kiterjedő H1-es hiszton "kristályosodási góc"-ként is szolgálhatnak (Zlatanova, 1990).

A hurkok kiindulási pontjainál egy balmenetes Z-DNS formájában is stabil, kb. 50 bázispár hosszú poli(CA/GT) régió található. Ez a régió a Z- és B-DNS közti átalakulással hozzájárulhat a hurok egészére kiterjedő negatív felcsavarodottság növekedéséhez és ezáltal a hurokban lévő gének aktiválódásához (Rich, 1983; ld. bővebben 18. old.).

A hurkokat a nukleáris mátrix-szal összekötő kiindulási régió a topoizomeráz II enzimnek is preferált kötőhelye (Cockerill és Garrard, 1986; Jack és Eggert, 1992). A topoizomeráz II a DNS felcsavarodottságának egyik fő szabályozó enzime, amelyet mind a fehérje kináz C, mind a kazein kináz II foszforiláció révén aktivál (Sahyoun és mtsai, 1986; Cardenas és mtsai, 1992). Ilyen módon ezek a jelátviteli folyamatokban részt vevő kinázok gének egész csapatát kódoló DNS hurkok egyidejű szabályozásához járulhatnak hozzá.



Egyelőre keveset tudunk az egyes DNS hurkokat rögzítő nukleáris mátrix szerepéről a szabályozási folyamatokban. A nukleáris mátrix a laminok kétdimenziós rácsaként képzelhető el. A laminok keresztkötésében számos lamin B-kötő fehérje részt vesz, így az intermediális filamentumokhoz is kötődő plektin és egy 54-58 kDa-os, a belső nukleáris membránban található lamin B receptor (Worman és mtsai, 1988; Foisner és mtsai, 1991; Bailer és mtsai, 1991). A nukleáris membránhoz kötődő lamin B-vel szemben a lamin A és C a lamináris hálózat DNS-hez kötéseért felelős (Yuan és mtsai, 1991; Hakes és Berezney, 1991). Noha a lamináris szerkezet döntő része a sejtmag periferiáján helyezkedik el, a sejtmag finomszerkezetének felderítésével párhuzamosan a sejtmag belsejében lévő nukleáris mátrix elemeket is kezdenek leírni (Spector, 1990; Carter és mtsai, 1991; Brasch és Ochs, 1992; Jack és Eggert, 1992).

A lamin A, B és C-ből álló struktúra legismertebb átalakulása az anafázis bevezető lépéseként, a cdc2 kináz hatására bekövetkező depolimerizációja (Peter és mtsai, 1990; Heald és McKeon, 1990). E mellett jónéhány olyan poszttranszlációs módosítás ismeretes, amely az *interfázisú* laminok polimerizációjának, kölcsönhatásainak szabályozására képes. A lamin A farnezilcsoportot tartalmazó C-terminálisának előzetes eltávolítása nélkül a fehérje a nukleáris mátrixba való beépülésre képtelen (Lutz és mtsai, 1992). A lamin B asszociációját pedig éppen ellenkezőleg a fehérje farnezilezése és metilezése segíti elő (Chelsky és mtsai, 1989; Kitten és Nigg, 1991). A fehérje kináz C a lamin B foszforilációjára képes (Hornbeck és mtsai, 1988; Fields és mtsai, 1988), inzulin hatására pedig a lamin A és C foszforilációja következik be (Friedman és Ken, 1988; Csermely és Kahn, 1992). Dessev és mtsai (1988) egy specifikus, a nukleáris mátrixhoz szorosan kötődő fehérje kinázt írtak le, amely ugyancsak részt vehet a laminok és receptoraik foszforilációjában. A lamin B receptor cAMP-függő foszforilációja erősíti (Appelbaum és mtsai, 1990), a plektin cAMP-, vagy fehérje kináz C-függő foszforilációja pedig gyengíti (Foisner és mtsai, 1991) a lamin B kötését.

Mindezen adatokat azzal összevetve, hogy a kiterjedt heterokromatinnal rendelkező differenciált sejtekben a lamin A mennyisége felszaporodik (Hass és mtsai, 1990; Yuan és mtsai, 1991; Kaufmann és mtsai, 1991; Kaufmann, 1992) az a kép rajzolódik ki, hogy a lamin A és C felelős a DNS esetleg részleges inaktiválással is együttjáró ötödleges, "hurkos" szerkezetének kialakításáért, míg a lamin B a sejtmag alapstruktúráját építi fel.

### 2.1.3.3. Öröklődés a szabályozásban: a következő sejtciklusra áthúzó szabályozás

A sejtosztódás a sejtmagbeli jelátviteli folyamatok szempontjából is kitüntetett esemény a sejt életében, hiszen megszűnik a sejtmag és így egy sor, addig a citoplazmába rekesztett fehérje közvetlen kapcsolatba kerülhet a DNS-sel. A kondenzált kromoszómák kialakulása, majd osztódás utáni dekonzenzációjuk és a sejtmag újraformálódása alkalmával a DNS szerkezetének többszöri, teljes átalakulása következik be, amely bő alkalmat szolgáltat a sejtnek arra, hogy az utódsejtek életét alapvetően megváltoztatásokat hajtson végre. A sejtciklus S-G<sub>2</sub>-M fázisában lejátszódó hosszútávú jelátviteli folyamatok kitüntetett szerepére utal, hogy a sejtek differenciációja szinte kivétel nélkül csak több osztódási cikluson keresztül válik teljesé.

Sajnos a DNS szerkezetének a sejtosztódáskor átörökölt, illetve megváltoztatott speciális jegyeiről keveset tudunk. A DNS replikációja során az újonnan kialakuló nukleoszómákban a jelenlévő nem-hisztón fehérjék (pl. HMG14, HMG17 és a transzkripció faktorok) koncentrációjuknak megfelelően vehetnek részt. Adott állapotú sejtben a DNS-ért "vetélkedő" fehérjekészlet, annak kötődési specificitásával és affinitásával más és más lehet. E szerint az újonnan szintetizálódott, illetve az új sejtben "elhelyezkedett" DNS finomszerkezete, aktív helyei bizonyos mértékig függenek a sejt összetételétől a DNS szintézise, illetve a sejt osztódása során. Belátható, hogy ilyen módon az előző sejtciklus "szignál-állapota" (értsd: jelátvivő molekuláinak összessége) a DNS finomszerkezetén keresztül öröklődik a következő sejtciklusra. Bizonyos gének aktiváltabbak, elérhetőbbek, más gének represszáltabbak lesznek az új G1 fázisban, mint ugyanazok a gének voltak az előző sejtciklus G1 fázisában. E "rövidtávú" öröklődés a DNS szekvenciájától független és a sejt "szignál-állapotának", mint a DNS-alapú öröklődés melletti, a sejtgenerációkon változó tartalommal továbbadható információnak a jelentőségére mutat rá.

A replikáció és a sejtosztódás során átépített DNS újonnan nyert szabályozó elemeire eddig jószerivel két példa ismeretes. Az ú.n. "silencer" represszáló DNS szakaszt élesztőben fedezték fel. Közös tulajdonságuk, hogy csak egy S fázison keresztül haladva tudják kifejtetni represszív hatásukat minden bizonnyal azért, mert a hozzájuk kötődő represszáló fehérjék csak ekkor tudják elérni az adott DNS szakaszt (Gross és Garrard, 1987). A másik példa a re-replikációt meggátló, egyelőre közelebből nem ismeretes fehérje, amelynek eltávolítására csak a sejtosztódás alkalmával kerül sor (Alberts és mtsai, 1989; pp. 732-733).

A DNS magasabbrendű szerkezetének a replikáció és a sejtosztódás során bekövetkező változásait természetesen nem szeretném úgy beállítani, hogy az új DNS-re "már rá sem lehet ismerni". Nyilvánvaló, hogy ilyen változások feltételezhetően csak a DNS kis részleteire terjednek ki. Erre utal az is, hogy a DNS magasabbrendű szerkezetét *megőrző* egész mechanizmus alakult ki az eukarióta sejtekben. A DNS metilációjának az adott DNS szakasz szupressziójában játszott szerepéről már a 18. oldalon volt szó. Eukariótákban egy "fenntartó metiláz" nevű enzim az új DNS szálon is metilezi azon CG párok citozinjait, amelyeknek megfelelő GC párok a régi szálon metilezett formában fordultak elő. Így a metilezéssel szupresszált szakaszok átírásának gátlása az új sejtciklusban is biztosított (Razin és mtsai, 1984; Cedar, 1988).

A sejtben DNS-ének --a housekeeping gének kivételével-- minden szegmense szinte egyedi fontossággal bír. Így azok a fluktuációk, amelyek a különböző fehérjéknek az ezekhez a génszakaszokhoz való kötődésében jelentkeznek, jelentős változásokhoz vezethetnek a következő sejtgenerációk életében. A sejtben folyó folyamatok jelentős részére nem érvényes tehát a daltoni szemlélet, amely a molekuláris történéseket makroszkópikus anyagmennyiségek egymásrahatásából vezeti le. A sejtben a molekuláris történések jelentős része egyedi és megismételhetetlen. Ilyen módon vizsgálata is új eszközöket igényel.



## 2.2. Hő-sokk fehérjék lehetséges szerepe a sejtmag jelátviteli folyamataiban

### 2.2.1. Bevezetés: a hő-sokk fehérjék funkciója, felosztása

Definíciójuk szerint minden olyan fehérjét hő-sokk fehérjének nevezünk, amelynek szintézise a normálisnál magasabb hőmérséklet, vagy más környezeti stressz (pl. leghűlés, anoxia, mérgezés, vírusfertőzés, alkoholbevitel, nehézfémionok, szabadgyökök, stb.) hatására fokozódik. Ilyenkor a sejt a fehérjeszintézisét "átprogramozza", és a normál állapotban szintetizálódó fehérjék termelésének gátlásával párhuzamosan a hő-sokk fehérjék szintézise ugrásszerűen megnő. A legtöbb hő-sokk fehérje azonban a sejt "nyugalmi" állapotában is számottevő mennyiségben keletkezik, van jelen (Lindquist, 1986; Welch, 1992). Ez arra enged következtetni, hogy a hő-sokk fehérjék olyan alapvető funkciókat látnak el a sejt életében, amelyek a sejtet ért váratlan behatás, károsodás esetén válnak különösen fontossá. A hő-sokk fehérjék fenti, laza meghatározása az élő sejtek fehérjéinek igen tág csoportját öleli fel. Mivel az ide tartozó fehérjék közül csak néhánynak a szerepe ismert pontosan, éppen ezért csoportosításuk átmenetileg a molekulatömegük szerint történik. Így "kis" (6-50 kDa), 60 kDa, 70 kDa és 90-100 kDa molekulatömegű hő-sokk fehérje családokról beszélhetünk (Lindquist és Craig, 1988; Schlessinger, 1990; Hubbard és Sander, 1991; Csermely és Somogyi, 1992; Gething és Sambrook, 1992; Welch, 1992). Az egyes hő-sokk fehérje családok főbb tagjait és legfontosabb funkcióikat a 7. táblázatban foglalom össze.

Hő-sokk fehérje család	Fontosabb tagok	Funkció
6-50 kDa	ubikvitin hsp10, groES*, SecB*, hsp27, hsp47 dnaJ*, hsp32 osteonektin	fehérjelebontás hsp60 ATP-áz aktivitás fokozása fehérjekonformáció kialakítása hsp70 ATP-áz aktivitás fokozása hem oxigenáz
60 kDa	hsp 59, c-hsp60, m-hsp60 groEL*, rubisco-BP	szteroid receptor asszociált fehérje fehérjekomplexek asszociációjának segítése, fehérjetranszport
70 kDa	hsp70, dnaK*, BiP	fehérjék helyes konformációjának stabilizálása, fehérjetranszport
90-110 kDa	hsp90, hspg*, grp94, hsp110	szteroidreceptor DNS kötésének gátlása, Tyr-kináz inaktiválás fehérjék helyes konformációjának stabilizálása

7. táblázat Hő-sokk fehérjék csoportosítása és főbb funkciói hsp = hő-sokk fehérje; \* prokarióta homológ fehérje; m-, c-hsp60 = mitochondriális és citoplazmatikus hsp60; BiP = immunoglobulin nehéz lánc-kötő fehérje; grp = glükóz regulált fehérje

Az alábbiakban a hő-sokk fehérjék funkcióit e csoportosítás szerint fogom röviden áttekinteni.

#### *Kisméretű hő-sokk fehérjék*

##### Ubikvitin

A kisméretű stressz fehérjék csoportjának egyik legismertebb tagja a 6000-es molekulatömegű ubikvitin, amely a sejt extralizoszómális, ATP-függő fehérjelebontó rendszere számára kovalensen kötött állapotban megjelöli a hibás, részlegesen denaturált, vagy "öreg" fehérjéket (Hershko és Ciechanover, 1992). Az ubikvitin mellett a konjugációjáért felelős két enzim is hő-sokk fehérje (Seufert és Jentsch, 1990). Ujabban ubikvitin-konjugált fehérjék jelenlétét a lizoszómákban is sikerült kimutatni (László és mtsai, 1990), ami az ubikvitin általános szerepére utalhat a sérült fehérjék felismerésében.

##### hsp10, groES

A hsp60-nal együtt "gardedámocskának" (chaperonin) nevezett (Hemmingsen és mtsai, 1988) hexamer szerkezetű mitochondriális/bakteriális hsp10/groES fehérjék a hsp60/groEL ATP-áz aktivitását növelve, segítenek a sérült fehérjék konformációjának helyreállításában, illetve a fehérjék transzportjában a mitochondriális membránon keresztül (Hartman és mtsai, 1992). A hsp10 a hsp60 komplex központi régiójához kötődve részt vesz a "szubsztrát-fehérje" megkötésében is (Bochkareva és Girshovich, 1992).

##### SecB

A 16,6 kDa molekulatömegű *Escherichia Coli* molekuláris chaperone tetramerré oligomerizálva segíti a fehérjék exportját az *E. Coli* plazmamembránján keresztül (Randall, 1992). Az ATP és a protongradiens energiáját felhasználó transzport során a SecB fehérje az exportfehérjét a SecA ATP-áz a SecD, SecE, SecF és SecY membránfehérjékkel alkotott komplexének adja át (Driessen, 1992).

##### hsp27

A hsp27 összefoglaló néven jelölt fehérjecsaládba számos, 20 és 28 kDa közötti fehérje tartozik. A szemlencsében legnagyobb mértékben előforduló krisztallint is magába foglaló fehérjecsalád tagjai egymással nagyfokú szerkezeti homológiát mutatnak. A különböző hsp27 fehérjék akár 100 tagú "oligo"-mereket is képezhetnek (Kato és mtsai, 1992; Zantema és mtsai, 1992) és részt vesznek az ösztrogén receptorhoz kötődő hsp90-hsp70-hsp59-hsp27 hő-sokk fehérje komplexben is (Mendelsohn és mtsai, 1991). Az oligomerek hő-sokk, illetve a gazdasejtek rákos transzformációjának hatására disszociálnak (Zantema és mtsai, 1992). Az  $\alpha$ -krisztallin más fehérjeaggregátumok disszociációját is elősegíti, és így szerepet játszhat a szemlencse átlátszóságának megőrzésében (Horwitz, 1992). A hsp27 részt vesz a simaizom-kontrakcióban (Bitar és mtsai, 1991) és a mikrofilamentumok stabilizálásában hő-sokk esetén (Lavoie és Landry, 1992).

A hsp27 fehérjék szinte mindegyike több helyen is foszforilálódik, foszforiláltságuk foka hő-sokk, interleukin-1, trombin, tumor promoterek, illetve tumor nekrosis faktor hatására átmenetileg megnő (Guesdon és Saklatvale, 1991; Mendelsohn és mtsai, 1991; Landry és mtsai, 1992; Shibamura és mtsai, 1992). A foszforilációban a cAMP-függő fehérje kináz, a fehérje kináz C, az S6 kináz és egy másik MAP-kináz aktivált fehérje kináz szerepét tételezik fel (Gaestel és mtsai, 1991; Landry és mtsai,



1992; Benndorf és mtsai, 1992; Stokoe és mtsai, 1992), míg a defoszforilációban a kalcineurin (kalcium-függő fehérje foszfatáz 2B) játszik nagy szerepet (Gaestel és mtsai, 1992). A foszforiláció/defoszforiláció szerepe a hsp27 saját magával és más fehérjékkel való aggregációjában egyelőre nem ismeretes.

#### hsp32

A 32 kDa-os hem oxigenáz szintézise is számottevően nő hő-sokk, tumor promoterek, karcinogének és nehézfém ionok hatására (Shibahara és mtsai, 1987; Kageyama és mtsai, 1988).

#### hsp47

A hsp47 a prokollagén molekulák aggregációját akadályozza meg a kollagént szekretáló sejtek endoplazmatikus retikulumában (Nakai és mtsai, 1992). A fehérje feltehetően komplexet képez a BiP (grp78), grp94 hő-sokk fehérjékkel és a diszulfid-izomeráz enzimmel. A szekretálódó prokollagén a szekréciós granulomok enyhén savas (pH 6.5) közege miatt válik le a hő-sokk fehérjék komplexéről (Nakai és mtsai, 1992).

#### dnaJ

A bakteriális dnaJ fehérje a hsp10/hsp60/hsp70 *E. Coli* homológjaival, a groES/groEL/dnaK fehérjékkel együtt vesz részt a sérült konformációjú fehérjék "helyretekerésében" és a fehérjeszekrécióban. A hő-sokk fehérje komplexben a groES a groEL, a dnaJ pedig a dnaK ATP-áz aktivitását növeli meg (Wild és mtsai, 1992; Gragerov és mtsai, 1992). Mind élesztőben, mind humán sejtvonalakban a dnaJ számos homológját tárták fel. A humán dnaJ az agyban felszaporodik (Cheetham és mtsai, 1992) és valószínűleg a hsp70-nel kooperálva részt vesz mind az endoplazmatikus retikulumba, mind a mitochondriumba, mind pedig a sejtmagba irányuló fehérjetranszportban (Sadler és mtsai, 1989; Blumberg és Silver, 1991; Atencio és Yaffe, 1992).

#### osteonektin

Az osteonektin a csont- és porcszövet kialakulásában és átépülésében részt vevő kalcium-kötő glikoprotein. Neri és munkatársai (1992) porcszöveti sejtek hő-sokk kezelésekor számottevő osteonektin szintézist és szekréciót figyeltek meg. A jelenség arra utal, hogy az osteonektin részt vehet az extracelluláris fehérjék konformációjának helyreállításában a szervezetet ért hő-sokk után.

#### 60 kDa körüli hő-sokk fehérjék

##### hsp59

A hsp59 egy 56-60 kDa molekulatömegű hő-sokk fehérje, amely a hsp70-nel és a hsp90-nel komplexet képezve a nem transzformált szteroid receptorok részét képezi (Sanchez, 1990). A hsp59 más hidrofób fehérjékhez hasonlóan az FK-506 és a rapamicin immunosuppresszív szerek kötőfehérjéjeként viselkedik (Yem és mtsai, 1992; Tai és mtsai, 1992). A fehérje kalmodulin- és ATP-kötő hellyel rendelkezik, valamint peptidil-prolil izomeráz (rotamáz) aktivitással bír (Lebeau és mtsai, 1992; Callebaut és mtsai, 1992; Peattie és mtsai, 1992; Massol és mtsai, 1992). Azon a kísérleti ta-

pasztalaton kívül, hogy FK-506 és rapamicin hatására megnő a progeszteron és antiprogesteron kötődése a receptorához (Callebaut és mtsai, 1992) sajnos jelenleg még nem tisztázott, hogy a hsp59 hogyan vesz részt a szteroid receptor funkcióban, milyen általános hő-sokk fehérje hatással bír és hogy mindezt az ATP, a kalmodulin, valamint az immunoszuppresszív szerek hogyan befolyásolják.

#### m-hsp60, c-hsp60, groEL, rubisco-BP

A 60 kDa molekulatömegű hő-sokk fehérjéknek számos változata ismeretes. A mitochondriális m-hsp60 fehérjén, az *E. Coli* groEL-en és a növényi ribulóz-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz-kötő fehérjén (rubisco-BP) kívül nemrégiben a citoplazmában is felfedeztek egy hsp60 homológot (c-hsp60, t-komplex polipeptid 1, TCP1; Trent és mtsai, 1991; Welch, 1992). Ez a citoplazmatikus hsp60 két molekula hsp70-nel és még hat eddig nem azonosított fehérjével egy 800-950 kDa-os komplexet képez, amely ATP hatására látványos konformációváltozáson megy keresztül (Lewis és mtsai, 1992; Gao és mtsai, 1992). A komplex a béta-aktin és a tubulin oligomerizációjában játszik segédkező szerepet (Yaffe és mtsai, 1992; Gao és mtsai, 1992), valamint részt vehet a mitotikus orsó kialakításában (Ursic és Cuthbertson, 1991). A reakcióban az asszociált fehérjék eleresztése itt is az ATP hidrolízise révén valósul meg (Gao és mtsai, 1992), bár a groEL fehérje esetén ehhez nem hidrolizáló ATP-analóg, sőt ADP is elegendőnek bizonyult (Mizobata és mtsai, 1992). Érdekes módon Ikawa és Weinberg (1992) a --feltételezhetően citoplazmatikus-- hsp60 és a p21-Ha-ras asszociációját figyelte meg. Az asszociáció oka és jelentősége egyelőre nem tisztázott.

A citoplazmatikus hsp60-hoz, a groEL-hez és a rubisco-BP-hez hasonlóan a mitochondriális hsp60 is főként a több alegységből álló komplex fehérjék helyes konformációjának megőrzésében/kialakításában vesz részt (Hemmingsen és mtsai, 1988; Ostermann és mtsai, 1989; Prasad és mtsai, 1990). A hsp60 fehérjék 14 alegységből álló, hétfokú szimmetriával rendelkező kettős gyűrűvé oligomerizálnak. A reakció helyes lezajlását a fehérje autokatalitikus módon saját maga segíti (Lissin és mtsai, 1990). Hő-sokk hatására a groEL fehérje foszforilálódik, ami a hibás fehérjék kijavításának turnover-ét fokozza (Yu-Sherman és Goldberg, 1992/b). Luis és munkatársai (1990) szerint a mitochondriális  $F_1$ -ATP-áz alfa alegysége is a hsp60 család tagja. Eredményeik megerősítéséről/továbbfejlesztéséről azóta az irodalomban nem olvastam.

Az m-hsp60 a hsp10-zel komplexet képez, amely megnöveli az m-hsp60 ATP hidrolízisének sebességét (Hartman és mtsai, 1992). A sejtmagban kódolt mitochondriális fehérjék importja során a mitochondriális hsp70 után a hsp10/m-hsp60 komplex a fehérjék "összeszerelésének második ütemét" végzi el. A hsp10/m-hsp60 működésére különösen a több alegységből álló mitochondriális fehérjék helyes konformációjának/asszociációjának kialakításához van szükség (lásd 11. ábra, 34. old.; Manning-Krieg és mtsai, 1991; Welch, 1992).



# 70 kDa körüli hő-sokk fehérjék

## hsp70, dnaK

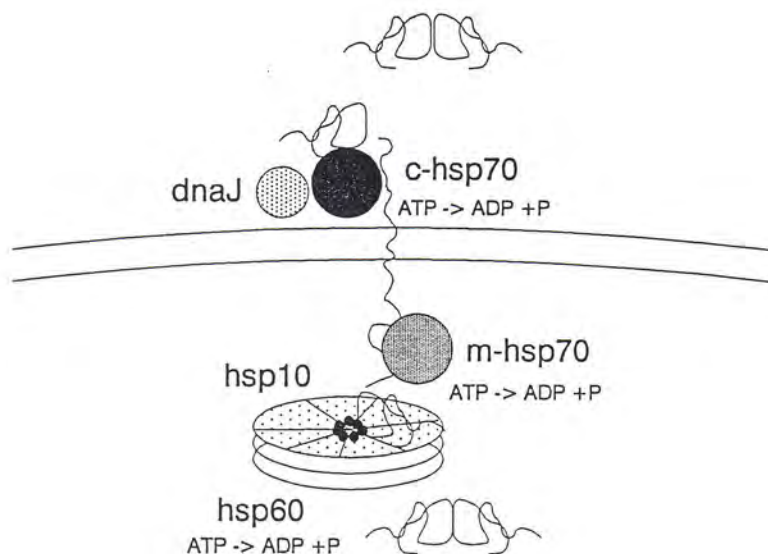
A 70 kDa körüli hő-sokk fehérjék legfontosabb funkcióit a 8. táblázatban foglalom össze. Költői túlzással a táblázaton végigtekintve azt mondhatjuk, hogy a hsp70 v gigkise ri a fehérjék életét a bölcsőtől a sírig. A hsp70 a riboszómákhoz tapadva részt vesz a friss fehérjel ncnak az elongáció során való egyengetésében (Beckmann és mtsai, 1990; Nelson és mtsai, 1992)  s a félkész-kész fehérjének az endoplazmatikus retikulumba, a mitochondriumba, vagy a membránba való bejuttatásában (Deshaies és mtsai, 1988; Chirico és mtsai, 1988; Manning-Krieg és mtsai, 1991; Yalovsky és mtsai, 1992). A mitochondriális fehérjetranszport vázlatos mechanizmusát a 11.  br n mutatom be. Látható, hogy a citoplazmatikus oldalon a c-hsp70, a mátrix fel l pedig az m-hsp70 egyengeti a transzportálódó fehérje útját ( s magát a fehérjét is). Egyes feltételezések szerint az m-hsp70 (illetve endoplazmatikus retikulumban a BiP) "húzza  t" a transzportálódó fehérjét a hozzákötött ATP hidrolízisének energiáját felhasználva. A mitochondriumban az m-hsp70 a (különösen több alegységből álló) fehérjéket az m-hsp60/ hsp10 komplexnek adja át "utógondozásra". A c-hsp70 részt vesz az endocitotikus vezikulák klatrinburk nak "sz tszerel s ben" (Rothman  s Schmid, 1986), a sérült konformációjú fehérjék "kijavításában" (Skowyra és mtsai, 1990)  s ha "jav thatatlanok", a "nemes halálra", a proteol zisre való felk sz t s kben is (Chiang és mtsai, 1989; Yu-Sherman  s Goldberg, 1992/a).

A hsp70 fehérjék ATP, GTP és az AppppA szerkezetű alarmon kötésére képesek (Welch  s Feramisco, 1985; Lewis  s Pelham, 1985; Bochner és mtsai, 1986). ATP hatására a hsp70 erőteljes konform ci v ltoz s n megy keresztül (Liberek és mtsai, 1991; Palleros és mtsai, 1991). Az ATP ezek után vagy a fehérje 199-es treoninon megvaló-

hsp70	funkció	irodalmi hivatkozás
c-hsp70	frissen szintetizált fehérjék helyes konformációjának kialakítása, elong�ci�seg�t�s	Beckmann és mtsai, 1990 Nelson és mtsai, 1992
c-hsp70/ BiP	fehérjetranszport az endoplazmatikus retikulumba	Deshaies és mtsai, 1988 Chirico és mtsai, 1988
c-hsp70/ m-hsp70	fehérjetranszport a mitochondriumba	Deshaies és mtsai, 1988 Manning-Krieg és mtsai, 1991
ct-hsp70	fehérjék membránba illesztése	Yalovsky és mtsai, 1992
c-hsp70	klatrin disszociáció	Rothman �s Schmid, 1986
dnaK	RNS polimeráz aktiválás	Skowyra és mtsai, 1990
c-hsp70/ dnaK	lebontandó fehérje prezentálása	Chiang és mtsai, 1989 Yu-Sherman �s Goldberg, 1992/a

## 8. táblázat A 70 kDa körüli hő-sokk fehérjék funkciói dnaK = *E. Coli*

hsp70; c- és m-hsp70 = citoplazmatikus és mitochondriális hsp70;  
ct-hsp = kloroplaszt hsp70; BiP = immunoglobulin nehéz lánc-kötő fehérje (grp78, hsp70 az endoplazmatikus retikulumban)



11. ábra A hsp70/dnaJ komplex részvétele a mitochondriumba irányuló fehérje-transzportban (Welch, 1992; Nelson és mtsai, 1992; Bochkareva és Girshovich, 1992; valamint Cyr és mtsai, 1992 alapján)

suló autofoszforylációjára használódik fel, vagy hidrolízise zajlik le (Zylicz és mtsai, 1983; McCarty és Walker, 1991). Az autofoszforyláció csak Ca-ATP jelenlétében figyelhető meg, magnézium nem befolyásolja (Leustek és mtsai, 1992). Mind az autofoszforyláció mind az ATP-áz aktivitás a hőmérséklet és a jelenlévő helytelen konformációjú fehérjék koncentrációjának növelésével ugrásszerűen emelkedik (Rieul és mtsai, 1987; McCarty és Walker, 1992; Sadis és Hightower, 1992).

A hsp70 szerkezetének vizsgálata során kiderült, hogy az autofoszforylációért a variábilisabb C-terminális domain, az ATP-kötésért és hidrolíziséért pedig a meglehetősen konzervatív N-terminális rész a felelős (Cegielska és Georgopoulos, 1989; Milarski és Morimoto, 1989). Az N-terminális 44 kDa-os "ATP-áz" 3 dimenziós analízise egy aktin- és hexokinázszerű, kettős lebenyből álló ATP-kötő helyet tárt fel (Flaherty és mtsai, 1990).

Noha az általánosan elfogadott, hogy az ATP-áz aktivitás szükséges a hsp70 által kötött fehérjék eleresztéséhez, a fehérje autofoszforylációjának funkcionális jelentősége nem teljesen tisztázott (Hubbard és Sander, 1991). Wada és munkatársai (1986) szerint az *E. Coli* hsp70 homológ dnaK a dnaJ fehérjével részt vehet a Glu- és Thr-<sup>1</sup>RNS-szintetáz enzimek foszforylációjában, ami az enzim fehérje kináz aktivitására utalhatna. Ezt a feltételezést azonban direkt foszforylációs kísérletekkel eddig nem igazolták.



Annak ismeretében, hogy a hsp70 N-terminális részlete nagymértékben hasonlít az aktinhoz (Flaherty és mtsai, 1990) nem meglepő, hogy a hsp70 extenzív oligomerizációra hajlamos. ATP kötésére azonban csak a monomer hsp70 képes (Palleros és mtsai, 1991; Kim és mtsai, 1992). A hsp70 ATP-áz aktivitását a dnaJ fehérje (és eukarióta homológja) megnöveli (Langer és mtsai, 1992; Cyr és mtsai, 1992), ami a két fehérje *in vivo* kooperációjára enged következtetni. A dnaK prokarióta hsp70 homológhoz egy grpE fehérje is tapad, amely a nukleotid kicserélődést gyorsítja meg (Ang és mtsai, 1991). Véleményem szerint csak idő kérdése, hogy a hsp70-hez nagy affinitással tapadó ADP eleresztését katalizáló eukarióta grpE homológot felfedezzék. Végezetül Clark és Brown (1986) a hsp70 tubulinnal, vimentinnel és kalmodulinnal történő asszociációjáról számolt be. A hsp70 e komplexeinek szerepét a fehérje funkciójában még nem tisztázták.

Hasonló módon magyarázatra és további kutatásra várnak azok a jelenségek, amelyek szerint a hsp70 mesterséges membránokon is "át tud húzni" fehérjéket (Alder és mtsai, 1990), receptora az immunosuppresszív deoxy-spergualin-nak (Nadler és mtsai, 1992) és (a BiP-pel és a fehérje diszulfid-izomerázzal együtt) a sejtközi térbe is szekretálódik (Davis és mtsai, 1986; Takemoto és mtsai, 1992).

### BiP

A BiP (immunoglobulin nehéz lánc kötő-fehérje, grp78) az endoplazmatikus retikulum lumenében lévő, a hsp70-nel nagyfokú szerkezeti azonosságot mutató fehérje (Munro és Pelham, 1986). A többi hsp70-hez hasonlóan a BiP is köt ATP-t, Ca-ATP jelenlétében pedig ATP-áz és autofoszforilációs aktivitással bír. Hasonlóképpen a BiP is képes az oligomerizációra, amelyet az ATP jelenléte gátol (Kassenbrock és Kelly, 1989; Leustek és mtsai, 1991; Carlino és mtsai, 1992). A BiP a 11. ábrán lévő m-hsp70-hez hasonlóan részt vesz az endoplazmatikus retikulumba kerülő fehérjék "behúzásában" és "egyengetésében" (Rapoport, 1992). A folyamat ATP jelenlétét igényli, amelyet speciális transzport mechanizmus juttat be az endoplazmatikus retikulum lumenébe (Dorner és mtsai, 1990; Clairmont és mtsai, 1992). A BiP-et mind defoszforilációval, mind a hozzátapadó ADP-ribóz részek eltávolításával aktiválni lehet (Freiden és mtsai, 1992; Staddon és mtsai, 1992). Végezetül a BiP (a hsp90 analóg grp94-hez hasonlóan) egy KDEL C-terminális szekvenciával rendelkezik, amely a Golgi-ből az endoplazmatikus retikulumba való visszajuttatását teszi lehetővé (Lodish, 1988).

### 90 kDa körüli hő-sokk fehérjék

#### hsp90

A 90 kDa molekulatömegű hő-sokk fehérje leginkább kivételesen nagy asszociációs hajlamával tűnik ki a többi hő-sokk fehérje közül. A hsp90-nel asszociáló fehérjéket a 9. táblázatban foglaltam össze. A hsp70 fehérjékhez hasonlóan a hsp90 is képes az önasszociációra: alfa és béta izoformája homodimereket képez (Radanyi és mtsai, 1989; Minami és mtsai, 1991). Hőmérsékletemelés és nem ionos detergenssek hatására a hsp90 oligomerizációja zajlik le (Lanks, 1989). A fehérje a citoszolban a hsp59-cel és a hsp70-nel együtt egy nagyobb komplex része (Perdew és Whitelaw, 1991).

A hsp90 kölcsönhatásba lép mind a mikrofilamentális, mind pedig a mikrotubuláris rendszerrel (Koyasu és mtsai, 1986; Sanchez és mtsai, 1988; Redmond és mtsai, 1989). A filamentáris aktinhoz a hsp90 1:5 mólárányban köt, a folyamat függ a hsp90-hez kötődő kalciumtól és kalmodulintól (Nishida és mtsai, 1986).

## Asszociálódó fehérje

## Irodalmi hivatkozás

### *Hő-sokk fehérjék*

hsp90  
hsp59, hsp70

Radanyi és mtsai, 1989; Lanks, 1989  
Perdew és Whitelaw, 1991

### *Filamentális fehérjék*

aktin  
tubulin

Koyasu és mtsai, 1986  
Sanchez és mtsai, 1988; Redmond és mtsai, 1989

### *Fehérje kinázok*

#### Ser/Thr-kinázok

fehérje kináz C  
kazein kináz II

Lindquist és Craig, 1988  
Dougherty és mtsai, 1987; Miyata és Yahara, 1992

eIF-2-alfa kináz

Rose és mtsai, 1987; Matts és Hurst, 1989

dsDNS-aktivált fehérje kináz

Lees-Miller és Anderson, 1989

#### Tyr-kinázok

src (c-src: kevesebb komplex)  
fps, yes (mérsékelt asszociáció)

Oppermann és mtsai, 1981  
Lipsich és mtsai, 1982; Adkins és mtsai, 1982

fes, fgr

Ziemiecki, 1986; Ziemiecki és mtsai, 1986

### *Egyéb fehérjék*

szteroid receptor

Sanchez és mtsai, 1985; Catelli és mtsai, 1985

kalmodulin

Nishida és mtsai, 1986

9. táblázat A hsp90 asszociációja más fehérjékkel Az egyes jelek a következő vírusok tirozin kinázait jelölik: src = Rous sarcoma; fps = Fujinami, PRC II sarcoma; yes = Yamaguchi sarcoma; gag, fes, fgr = feline sarcoma

A hsp90 különösen nagy asszociációs hajlamot mutat a fehérje kinázokkal. A fehérje szerin/treonin és tirozin kinázokra gyakorolt hatása eltérőnek látszik: a hsp90 mind az eIF-2-alfa kinázt, mind a kazein kináz II-öt aktiválja (Rose és mtsai, 1989; Miyata és Yahara, 1992), ezzel szemben az src és a fes tirozin kinázok aktivitása csökken hsp90 hatására (Brugge és mtsai, 1981; Courtneidge és Bishop, 1982; Ziemiecki, 1986). Az fps tirozin kináz aktivitása a hsp90-nel képzett komplexben nem változik (Adkins és mtsai, 1982).

A hsp90 ezen utóbbi hatásai már funkciójának eddig feltárt elemeihez is elvezetnek. Egyrészt a hsp90 modulálja bizonyos fehérje kinázok aktivitását, részt vehet pl. a v-src tirozin kináz membránba épülésében (Courtneidge és Bishop, 1982). Más-



részt asszociatív hajlamával megvédi a vele komplexet képző fehérjét a denaturációtól (Miyata és Yahara, 1992; Wiech és mtsai, 1992). Harmadrészt pedig a szteroid receptorral komplexet képezve részt vesz a nukleáris receptor hatásmechanizmusában. A hsp90 ezen utóbbi hatását a 2.2.4.2. fejezetben fogom részletezni.

#### hsp94

A hsp94 fehérje a hsp90 *E. Coli* homológja, amely az eukarióta hsp90-hez hasonlóan egy dimer struktúrájú foszfoprotein (Bardwell és Craig, 1987; Spence és Georgopoulos, 1989). A grp 94 (endoplazmin) pedig a hsp90 endoplazmatikus retikulumban előforduló változata. A fehérje a BiP-hez hasonlóan köti a kalciumot és az ATP-t és asszociál a félkész immunoglobulin láncokkal (Clairmont és mtsai, 1992; Melnick és mtsai, 1992). A grp94 (vagy bizonyos változata) köt az endoplazmatikus retikulum membránjához, de membránbeli elhelyezkedése még nem kellőképpen tisztázott (Mazzarella és Green, 1987; Welch, 1992). Ahluwalia és munkatársai (1992) egy 88 kDa-os, kalcium-kötő endoplazmatikus retikulumbeli chaperon-ról számoltak be. Jelenleg még nem tisztázott, hogy az általuk megtalált fehérje milyen viszonyban áll a grp94-gyel.

#### hsp110

A hsp110 két nukleotidkötőhellyel rendelkező, a bakteriális ClpA/ClpB proteázokkal hasonlóságot mutató, 100 és 110 kDa közötti molekulatömegű hő-sokk fehérje (Parsell és mtsai, 1991). A fehérje a hsp90-hez hasonlóan, kalcium és kalmodulin segítségével az aktin filamentumokhoz asszociál (Koyasu és mtsai, 1986; Koyasu és mtsai, 1989).

Összefoglalva el lehet mondani, hogy a hő-sokk fehérjék mintegy "gardedám"-ként (chaperone-ként) viselkednek, más fehérjékhez hozzátapadva, azokat a helyükre irányítva. A helytelen "viselkedésű" (konformációjú) fehérjéket megrendszabályozzák, vagy a "parti"-ról proteolízis révén eltávolítják. A sérült fehérjék felismerésére a felszínre került, hidrogénhidakat nem képező peptidkötéseik révén kerülhet sor, "helyretekérésük" aminosavanként kb. 1 molekula ATP-t igényel (Hubbard és Sander, 1991).

A hő-sokk fehérjék eddig részletezett funkcióinak ismertetésében érthető, hogy miért van e fehérjékre nagy szükség a sejtet ért stressz esetén. A sejtkárosodás után mind a részlegesen denaturált fehérjék fokozott kiszűrése, mind pedig a károsodást nem szenvedett fehérjék minél egyenletesebb elosztása a sejt számára alapvető feladat. Ugyancsak magyarázzák e funkciók azt a tényt, hogy a miért vannak jelen a hő-sokk fehérjék a nyugalmi állapotú, stresszmentes sejtben is olyan nagy mennyiségben. A sérült fehérjék javítása és eltávolítása, valamint a sejt belső membránjain keresztül haladó fehérjetranszport a sejt számára életének bármely fázisában nélkülözhetetlen, alapvető feladat.

### **2.2.2. A sejtmag hő-sokk fehérjei**

A hő-sokk fehérjék funkcióinak fenti összefoglalásából kitűnik, hogy kitüntetett szerepük van a fehérjeszerkezetek átalakításában. Számos tagjuk ATP-áz aktivitása révén lehetővé teszi, hogy a más struktúrába rendeződő fehérjék elég energiát kapjanak a kedvezőtlen átmeneti állapotukon való "átlendülésre". Ezzel párhuzamosan a hő-sokk fehérjék megvédik a konformációváltó fehérjéket attól, hogy az átlakulásuk során felszínrekerülő hidrofób részeik egymással kölcsönhatásba lépve aggregációt okozzanak.

foszfo-hsp27 (*)	Kim és mtsai, 1984
alfa-B-krisztallin (*)	Klemenzenz és mtsai, 1991; Voorter és mtsai, 1992
hsp56	Gasc és mtsai, 1990; Ruff és mtsai, 1992
hsp70 (*,n)	Pouchelet és mtsai, 1983; Welch és Feramisco, 1984
BiP	Lee és mtsai, 1984
hsp90	Collier és Schlessinger, 1986; Gasc és mtsai, 1990; Akner és mtsai, 1992
grp94 (*)	Welch és mtsai, 1983
hsp110 (n)	Subjeck és mtsai, 1983

10. táblázat Hő-sokk fehérjék a sejtmagban A zárójelbe tett "\*" a hő-sokk utáni nukleáris transzlokációra, az "n" a nukleoluszra, a sejtmagvacskára utal

A sejtmag a 16. oldalon frottaknak megfelelően a sejt legkompaktabb, legmagasabban struktúrált része. Ugyanakkor a DNS transzkripciója és replikációja során, a sejtciklus különböző fázisaiban a sejtmag mikro- és makro-szerkezetében egyaránt gyökeres változásokon megy keresztül. Könnyen megjósolható/belátható, hogy a molekuláris "chaperone" (gardedám) aktivitással rendelkező fehérjéknek (így a hő-sokk fehérjéknek) a sejtmag szerkezeti átalakulásaiban mással nem pótolható, kitüntetett szerepük van.

Hő-sokk hatására több mint 50 különböző frissen szintetizált fehérje jelenik meg a sejtmagban (Reiter és Penman, 1983; Laszlo és mtsai, 1992). Ezek közül/mellett jónéhány ismert hő-sokk fehérje képes a sejt alapállapotában, vagy a sejtet ért stressz esetén bejutni a sejtmagba. E fehérjéket a 10. táblázatban foglalom össze.

A hő-sokk fehérjék szinte minden fontos képviselőjét magában foglaló lista ellenére megdöbbenően keveset tudunk a hő-sokk fehérjék lehetséges szerepéről a sejtmagban. A két, sejtmagvacskában előforduló hő-sokk fehérje, a hsp70 és a hsp110 részt vehet a riboszómák "összeszerelésében" és transzportjában. Erre utal az is, hogy a hsp70 ATP-függő módon "ingázik" a citoplazma és a sejtmagvacska között (Lewis és Pelham, 1985). Ciavarra és munkatársai (1992) a hsp70 szerepét feltételezték a sejtmagvacskában felszaporodó topoizomeráz I hő-sokk utáni reaktiválásában. A hsp70 ATP-függő asszociációt mutat a p53-as nukleáris antionkogénnel is, amelynek feltételezhetően az aktivációjában játszik szerepet (Clarke és mtsai, 1988; Hupp és mtsai, 1992; Agoff és mtsai, 1993).

A hő-sokk fehérjék egy további sejtmagbeli szerepére utalhat, hogy hőkezelés, vagy vírusfertőzés esetén a sejtmagban aktin filamentumok jelennek meg (Welch és Suhan, 1985; Iida és mtsai, 1986; Volkman és mtsai, 1992). Az nukleáris aktinszálak organizációjában a prenilált prelamin A és lamin B vehet részt (Fenton és mtsai, 1992). Mivel mind a hsp90, mind hsp110 aktinkötő fehérje (Koyasu és mtsai, 1986), a hő-sokk fehérjék részt vehetnek a nukleáris aktinszálak kialakításában, illetve azokra tapadva a sejtmag szerkezetének átalakításában a sejtet ért stressz esetén.



A molekuláris "chaperonok" (így a hő-sokk fehérjék) talán egyik leglátványosabb szerepe a sejtmagok osztódás utáni összeszerelésében adódik. A kondenzált kromatin kitékerése, a laminszerkezet felépülésének segítése, a nukleáris pórusok, a sejtmag-membrán alkotórészeinek egymásratalálása már nem csak gardedámi, de egyenesen kerítő-női gyakorlatot követel. A nyolcvanas évek elejétől egyre több tanulmány látott napvilágot, amely a transzkripció- és transzport-tulajdonságait tekintve ép sejtmag "spontán" összeállásával foglalkozott (Gerace és Blobel, 1980; Lohka és Masui, 1983; Forbes és mtsai, 1983; Burke és Gerace, 1986; Newmeyer és mtsai, 1986; Newport, 1987; Sheenan és mtsai, 1988). A "spontán" szó azonban megtévesztő, hiszen az összeszerelő rendszerek legtöbbször *Xenopus* oocita "extraktummal" dolgoztak, amely --sok más mellett-- a hő-sokk fehérjéknek is gazdag tárháza. Szinte megdöbbentő, hogy ebben a folyamatban a hő-sokk fehérjék szerepét még nem fedezték fel.

A hő-sokk fehérjéknek a sejtmag transzportfolyamataiban, a DNS replikációjában és transzkripciójában játszott szerepét (beleértve a hsp27/hsp59/ hsp70/hsp90 komplex szerepét a szteroid receptorok hatásmechanizmusában) a 2.2.3. és a 2.2.4. fejezetekben fogom tárgyalni.

### 2.2.3. Hő-sokk fehérjék szerepe a sejtmag transzportfolyamataiban

Azok után, hogy 1988-ban bizonyították a hsp70 részvételét az endoplazmatikus retikulumba, illetve a mitochondriumba irányuló fehérjetranszportban (ld. 11. ábra; Deshaies és mtsai, 1988; Chirico és mtsai, 1988) igen kézenfekvő volt a feltételezés, hogy a hsp70 részt vesz a sejtmagba irányuló fehérjetranszportban is. E feltételezés alátámasztására Jeoung és munkatársai (1991) szolgáltatották az első konkrét bizonyítékot azzal, hogy az SV40 T antigénjének egy "elrontott", a sejtmag helyett a citoplazmában koncentrálódó változatát a hsp70-nel a magba lehetett juttatni. Shi és Thomas (1992) valamint Imamoto és munkatársai (1992) pedig nemrégiben a sejtmagba irányuló fehérjetranszport gátlásáról számoltak be a hsp70 kiűritése után. Az eukarióta dnaJ homológ a hsp70 ATP-áz aktivitását segítve feltételezhetően részt vesz a sejtmagba irányuló fehérje transzportban is (Sadler és mtsai, 1989; Blumberg és Silver, 1991). Számomra igen valószínűnek látszik, hogy mind az endoplazmatikus retikulum, mind a mitochondrium, mind pedig a sejtmag esetén a hsp70/dnaJ komplex messze nem az utolsó citoplazmatikus hő-sokk fehérje, amely részt vesz a transzportfolyamatban. Így nem kizárható egy nukleotid kicserélő grpE-homológ felfedezése és a nemrégiben leírt citoplazmatikus hsp60-komplex részvétele sem. Ez utóbbi feltételezés annál is inkább valószínű, hiszen a citoplazmatikus hsp60 komplex (TCP1) nagy affinitással bír az aktin iránt, amely a sejtmagba irányuló transzportfolyamatok aktív részese (Schindler és Jiang, 1986; Gao és mtsai, 1992). A sejtmag felé (sejtmagba) irányuló aktin trajektorákat használhatják esetleg a hsp90 és a hsp110 aktin-kötő hő-sokk fehérjék is. A hsp90-aktin kölcsönhatások szerepét a szteroid receptorok szállításában a 2.2.4.2. fejezetben fogom érinteni.

A sejtmag RNS transzportjában részvevő fehérjéket (nukleolin, numatrin, sejtmag NTP-áz: a lamin A és C N-terminális 46 kDa fragmentuma; lásd 2.1.2.3. fejezet) nem szokták hő-sokk fehérjéknek nevezni. A "szokták" itt nem fogalmazásbeli pongyolaság, hanem azt kívánja érzékeltetni, hogy elég nehéz eldönteni, hogy a számtalan proteo-

tikus fragmentumot is magában foglaló fenti három fehérje vajon benne van-e abban az ötvenvalahány sejtmagbéli hő-sokk fehérjében, amelyet Reiter és Penman (1983), valamint Laszlo és munkatársai (1992) megtaláltak.

Direkt bizonyíték hiányában is számos jel utal arra, hogy a nukleolin, a numatrin és a lamin A/C szintézisének szabályozása a hő-sokk fehérjékével nagymértékben azonos. A nukleolin, a lamin A/C és a hsp70 mRNS szint párhuzamosan változik a sejtciklusban, a májregeneráció és neuroblasztoma, valamint HL-60 sejtek differenciációjában (Lu és mtsai, 1988; Paulin-Levasseur és mtsai, 1989; Ohmori és mtsai, 1990; Murakami és mtsai, 1991). A numatrin és a hsp70 együttes szintézise pedig a B és T limfociták aktiválása során, valamint növekedési faktorok hatására figyelhető meg (Feuerstein és Mond, 1987; Feuerstein és mtsai, 1988; Ferris és mtsai, 1988; Ting és mtsai, 1989; Spector és mtsai, 1989; Hansen és mtsai, 1991). Végezetül a nukleolin élesztőben előforduló homológja egyike azoknak a fehérjéknek, amelyek szintézise "hideg-sokk" hatására megnő (Kondo és mtsai, 1992).

Szintézisük szabályozásán kívül a nukleolin (C23), a numatrin (B23) és a lamin A és C (sejtmag NTP-áz) számos más tulajdonságukban is hasonlóságot mutatnak a hő-sokk fehérjékkel. A fenti három fehérjének a hsp70-nel és hsp90-nel való összehasonlítását az irodalmi hivatkozásokat is tartalmazó 11. táblázat tartalmazza.

A nukleolin [aminosav: 141-167, 188-213], a numatrin [120-132] és a hsp90 [229-255, 257-274] hosszabb, Glu és Asp részletekben gazdag savas szekvenciát tartalmaz, amely köztes szerinjei a fehérjék egyik leggyakrabban foszforilált oldalláncai. Ez a nukleoplazmin-szerű fehérjerészlet részt vehet a kromatinszerkezet "ki- és betérésében" (ld. bővebben az 5.2.4. és a 6.3. fejezetekben).

Mind a lamin A/C, mind a hsp70, mind pedig a hsp90 kalcium és kalmodulin kötésére képes. A kalcium és kalmodulin szerepet játszik a fehérjék asszociációjának, autoproteolízisének és ATP-vel való kölcsönhatásának szabályozásában. A nukleolin [aminosav: 7-9, 278-280, 426-428, 456-458, 519-521 és 549-551] a hsp70 [137-139] és a hsp90 [539-541] ATP-kötő GK(R)T(S) szekvenciát tartalmaz, a lamin A- és C-ről, valamint a három hő-sokk fehérjéről pedig kísérletes úton is sikerült belátni, hogy képesek az ATP kötésére (ld. 11. táblázat). A numatrin és a nukleolin nukleinsav kötő hellyel rendelkezik, amely szerkezeti és funkcionális hasonlóságot mutat az ATP-kötő helyekkel (Feuerstein és mtsai, 1990; Olson és mtsai, 1983; Bugler és mtsai, 1987). A lamin A és C N-terminális fragmentuma, a hsp60 és a hsp70 ATP-ázként viselkedik; a nukleolin, a hsp70 és a hsp90 autoproteolízisre képes. A lamin A és C egy szorosan asszociált Ca-függő szerin proteáz hasítja el. A nukleolin kivételével mindegyik fehérje oligomerizációját leírták már, a nukleolin, a hsp70 és a hsp90 képes a nukleáris lokalizációs szignál megkötésére. A nukleolin és a numatrin részt vesz a kromatin kondenzációs és dekonzenzációs folyamataiban és így a hő-sokk fehérjékéhez hasonló molekuláris chaperone-ként működik.



Tulajdonság	C23	B23	lamin A/C	hsp60	hsp70	hsp90	Irodalmi hivatkozások
foszforilálható savas szekvencia	+	+	-	-	?	+	Lapeyre és mtsai, 1987; Chang és mtsai, 1988; McKeon és mtsai, 1986; Fisher és mtsai, 1986; Zeilstra-Ryalls és mtsai, 1991; O'Malley és mtsai, 1985; Moore és mtsai, 1989
kálciumkötőhely	?	?	+	?	+	+	Madsen és mtsai, 1990; Zylicz és mtsai, 1983; Yamamoto és mtsai, 1991
kalmodulin-kötőhely	?	?	+	?	+	+	Madsen és mtsai, 1990; Clark és Brown, 1986; Nishida és mtsai, 1986
ATP-kötőhely	+	-	+	+	+	+	Lapeyre és mtsai, 1987; Schwartz és Clawson, 1991; Gao és mtsai, 1992; Welch és Feramisco, 1985; Csermely és Kahn, 1991
ATP-áz aktivitás	?	?	+	+	+	-	Clawson és mtsai, 1988; Gao és mtsai, 1992; Zylicz és mtsai, 1983; Csermely és Kahn, 1991
autoproteolízis	(+)	?	+	?	+	+	Chen és mtsai, 1991; Tökes és Clawson, 1989; Mitchell és mtsai, 1985; 5.2.3. fejezet
affinitás az NLS-hez	+	?	?	?	+	+	Lee és Mélése, 1989; Imamoto és mtsai, 1992; Chambraud és mtsai, 1990
oligomerizáció	?	+	+	+	+	+	Yung és Chan, 1987; Gerace és Blobel, 1980; Lissin és mtsai, 1990; Kim és mtsai, 1992; Lanks, 1989
molekuláris chaperone	+	+	?	+	+	+	Erard és mtsai, 1988; Sipos és Olson, 1991; Hügle és mtsai, 1985; Schmidt-Zachmann és mtsai, 1987; Welch, 1992

11. táblázat A nukleolin (C23), numatrin (B23) és a lamin A/C (sejtmag NTP-áz), valamint a hsp60, hsp70 és a hsp90 tulajdonságainak összehasonlítása; NLS = nukleáris lokalizációs szignál

Látható tehát, hogy a nukleolin, numatrin, a lamin A és C számos tulajdonságukban megegyeznek a hősokk fehérjék egymáshoz is hasonló három legfontosabb képviselőjével, a hsp60-nal, a hsp70-nel és a hsp90-nel. A bemutatott, meglepően széleskörű azonosságok alapján nem csak az kézenfekvő, hogy a sejtmag RNS transzportjában részt vevő nukleolint és numatrint, valamint az e mellett még transzkripció szerkezeti szabályozásában is szerepet játszó lamin A-t és C-t molekuláris chaperone-ként tekintsük, hanem felmerül annak az esélye, hogy a 11. táblázat kérdőjelei mentén az analógia tovább bővíthető. Így érdemes vizsgálatokat folytatni a hsp70 esetleges szerepére a kromatin kondenzációs folyamataiban, kísérletet tenni a nukleolin, a numatrin és a hsp60 kalcium- és kalmodulinkötésének felderítésére, vizsgálni a nukleolin és a numatrin esetleges ATP-áz aktivitását, a numatrin és a hsp60 autoproteolízisét, a nukleolin oligomerizációját és a numatrin, a lamin A és C, valamint a hsp60 szerepét a sejtmagba irányuló fehérjetranszportban.

#### 2.2.4. Hősokk fehérjék szerepe a replikációban és a transzkripcióban

##### 2.2.4.1. Hősokk fehérjék a replikációban

###### Prokarióták

A prokarióta DNS polimeráz III holoenzim teljes aktivitását csak számos más fehérjével komplexet képezve nyeri el. A vezető és a követő szálon működő DNS polimeráz III-nak a hélix destabilizáló fehérjékkel, a rep és a dnaB helikázokkal, a dnaC fehérjével, a dnaG primázzal, DNA girázzal és számos más polipeptiddel képzett komplexét repliszómának hívjuk (Rawn, 1989; pp. 707-726). Könnyen belátható, hogy a kb. 1,6 mega-Dalton molekulatömegű repliszóma kialakulása bő terepet kínál a molekuláris chaperonok (bakteriális hősokk fehérjék) működéséhez.

A bakteriális (*E. Coli*) genom replikációja a dnaA fehérje tetramerjeinek az oriC kezdőszakaszhoz való kötődésével indul. A dnaA fehérje a baktériumban foszfolipidekkel képzett aggregátum formájában tárolódik. Az aggregátumból a tetramerré összeálló, replikációban aktív dnaA monomer felszabadulása vagy foszfolipáz  $A_2$ -vel, vagy a dnaK hősokk fehérjével érhető el (Hwang és mtsai, 1990). A dnaK/dnaJ hősokk fehérjék segítségével a repA helikáz inaktív, dimer alakjából az aktív, monomer formába való átalakulásában is bizonyították (Wickner és mtsai, 1991).

Kísérletes rendszerekben a bakteriális genom mellett leggyakrabban a lambda bakteriofág, valamint a P1 és F plazmidok replikációjának mechanizmusát vizsgálták. E vizsgálatokból kitűnt, hogy dnaK/dnaJ/grpE hősokk fehérje komplex együttes hatása szükséges a dnaB helikáz disszociációjához a lambda fág replikációjának startpontjához kötődő lamda-O/P komplextől. A disszociáció révén a helikáz aktiválódik és a replikáció megindul (Alfano és McMacken, 1989/a,b; Zyllicz és mtsai, 1989).

Minden bizonnyal a közeli jövőben a bakteriális hősokk fehérjéknek (így a dnaK/-dnaJ/grpE komplexen kívül a groEL/groES komplexnek is) számos más hatását sikerül felfedezni a repliszóma összeállásának és átalakulásának segítségével.



## Eukarióták

Az eukarióta replikáció szerkezetileg két alapvető vonásában különbözik a prokariótákban megfigyelhető folyamattól. Az egyik, hogy az eukarióta DNS nem "pucér", hanem hisztonokkal összetapadva nukleoszómakat képez. A másik alapvető különbség, hogy az eukarióta DNS egy magasan szervezett rendszerben, a sejtmagban tárolódik, ahol az egyes kölcsönhatások korántsem olyan véletlenszerűen mennek végbe, mint a térbelileg jóval rendezetlenebb prokarióta citoplazmában. A DNS térbeli rendezettségének e növekedése csökkentheti a hő-sokk fehérjék (molekuláris chaperon-ok) működése iránti igényt az eukarióta replikáció során. Ugyanakkor a nukleoszómakba rendezett szerkezet a DNS kicsavargatásával, a hisztonok az iniciációs helyről való eltávolításával, majd a replikáció után a hisztonok visszahelyezésével és a DNS becsavargatásával új feladatokat hárít a sejtmag molekuláris chaperon-jaira.

Az eukarióta DNS replikációjának mechanizmusáról viszonylag keveset tudunk (Alberts és mtsai, 1989; Darnell és mtsai, 1990; Thömmes és Hübscher, 1990; Jindal és mtsai, 1991). Csak a dnaA fehérjéhez hasonló "kezdő-komplex" kb. egy évvel ezelőtti felfedezése (Bell és Stillman, 1992) után vált lehetővé, hogy az eukarióta DNS replikációnak az SV40 virális DNS replikációjához hasonló *in vitro* modellrendszerét megalkossák. Az egyes fehérjék összetapadásának mechanizmusát (és ebben a hő-sokk fehérjék esetleges szerepét) tisztázó munka --gondolom-- jelenleg folyik.

A nukleoszómak magját képező hiszton oktamert legalább részben el kell távolítani ahhoz, hogy a replikáció az adott DNS szakaszon megindulhasson (Ishimi, 1992), az újonnan keletkezett két DNS szálát pedig nukleoszómakba kell "csomagolni". A két folyamat közül az utóbbit, a kromatin "összeállítását" (assembly) tanulmányozták részletesen. Ennek nem a területen dolgozó kutatók személyes szimpátiája az oka, hanem egyrészt az, hogy kölcsönhatásuk erőssége miatt a hisztonokat a DNS-ről fiziológiai körülmények között eltávolítani nem lehet. Így arról is vita folyik, hogy mennyire szükséges a hisztonok leválasztása a DNS replikációjához. Így jelenleg "duplán" feltételezés, hogy a kromatin összeállításában segédkező --alább részletezett-- molekuláris chaperon-ok a replikáció előkészítőként a hisztonok átmeneti leválasztásában is szerepet játszanak (Dilworth és Dingwall, 1988; Laskey és mtsai, 1989).

"Nascens" DNS-t H2A, H2B, H3 és H4 hiszton 1:1 arányú elegyével 0.8 M-os NaCl-nál töményebb sóoldatban elkeverve, majd az oldatot lassan, gondosan dializálva a nukleoszóma szerkezet megalkotható. Izotóniás oldatban azonban a hisztonok irreverzibilis aggregációja következik be (Stein, 1989). Fiziológiai körülmények között tehát szükség van egy olyan katalizátorra (hiszton-karrier-re), amely a hisztonok aggregációját meggátolva, segíti asszociációjukat a DNS-sel. A nukleoszómak kialakulását segítő, eddig leírt molekulákat a 12. táblázatban foglalom össze. A molekulákat összehasonlítva megállapítható, hogy kivétel nélkül rövidebb-hosszabb savas szekvenciát tartalmaznak, amely segít a bázikus hisztonok megkötésében (Dingwall és mtsai, 1987; Burglin és mtsai, 1987; Ishimi és Kikuchi, 1991; Schmidt-Zachmann és mtsai, 1987; Walker és mtsai, 1980; Kleinschmidt és mtsai, 1986).

Nukleoszóma-kialakulást segítő molekula	Ms (kDa)	Irodalmi hivatkozás
<i>Nukleoplazmin-szerű molekulák</i>		
nukleoplazmin	29	Laskey és mtsai, 1978
NAP-I	58	Ishimi és mtsai, 1984
nukleoplazmin S	40	Cotten és Chalkey, 1987
CAF-I	150,62,60,58,50	Smith és Stillman, 1989
numatrin (B23)	38	Schmidt-Zachmann és mtsai, 1987
<i>Más molekulák</i>		
N1/N2	105/110	Kleinschmidt és Franke, 1982
HMG1	28	Bonne-Andrea és mtsai, 1984
RNS, poli-Glu		Nelson és mtsai, 1981

12. táblázat A nukleoszómák kialakulását segítő molekulák vázlatos összefoglalása Ms = a monomer molekula molekulatömege; NAP-I = nukleoszóma assembly protein I; nukleoplazmin S = szomatikus nukleoplazmin; CAF-I = humán kromatin assembly faktor-I; N1/N2 = hisztion-szállító fehérjék *Xenopus* oocitákban

A leginkább tanulmányozott *Xenopus* oocitákban az N1/N2 fehérjéhez kötött hisztion-H3/H4 dimer asszociál először a "nascens" DNS-sel, majd a nukleoplazminhoz kötött H2A/H2B követi. *Xenopus* oociták esetén a folyamatban a HMG1 részvétele nem valószínű. (Kleinschmidt és mtsai, 1985; Dilworth és mtsai, 1987; Kleinschmidt és mtsai, 1990). A nukleoplazmin szerepét a topoizomeráz I is átvállalhatja (Zucker és Worcel, 1990), a folyamat feltehetően hasonlóan zajlik le szomatikus sejtekben is (Ishimi és mtsai, 1987).

A nukleoszómák kialakulásának szabályozásáról viszonylag keveset tudunk. A nukleoplazmin foszforilációja a fehérje aktiválódásához vezet (Cotten és mtsai, 1986). A szomatikus nukleoplazmin is foszfofehérje (Cotten és Chalkey, 1987), a cdc2 kináz leválasztja a HMG-1-es fehérjét a DNS-ről (Reeves és mtsai, 1991), és a numatrin is foszforilálódik mind a cdc2 kináz, mind pedig inzulin hatására (Feuerstein, 1991; Feuerstein és Randazzo, 1991). Ezen utóbbi folyamatok hatása a fehérjék molekuláris chaperone szerepére azonban még nem tisztázott.

#### 2.2.4.2. Hő-sokk fehérjék a transzkripcióban -- transzkripció hő-sokk esetén, magreceptorok

Annak ellenére, hogy a transzkripció mind prokariótákban, mind eukariótákban a replikációhoz hasonlóan bonyolult fehérjekomplexek összeállítását és disszociációját igényli, érdekes módon eddig még egyetlen hő-sokk fehérje, illetve sejtmagbéli molekuláris chaperone általános hatását sem írták le a folyamatban (Sawadogo és Sentenac, 1990; Georgopoulos, 1992). Ez a helyzet



minden bizonnyal rövid időn belül változni fog. A sejtmagbeli molekuláris chaperonok "konformációegyengető", fehérjekomplex "összeterelő" szerepére minden bizonnyal mind az általános, mind a génspecifikus transzkripció faktorok esetén szükség van. Jelenleg a hő-sokk fehérjék részvétele csak két specifikusabb transzkripció folyamatban, a hő-sokk által kiváltott génexpresszióban és a magreceptorok hatásmechanizmusában bizonyított. Az alábbiakban ezek rövid ismertetésével fogok foglalkozni.

#### **Transzkripció hő-sokk esetén prokariótákban**

Hő-sokk esetén a prokarióta RNS polimeráz a szokásos 70 kDa-os szigma faktor helyett egy 32 kDa-os szigma faktorról képez komplexet, amely az enzimet a hő-sokk fehérjéket kódoló génszakaszokhoz irányítja. Normál körülmények között a 32 kDa-os szigma faktor a dnaK/dnaJ/grpE hő-sokk fehérje komplex-szel asszociáltan fordul elő. Ilyen állapotban a 32 kDa-os szigma komplex igen instabil, féleletideje kb. 1 perc. Hő-sokk hatására azonban a dnaK/dnaJ/grpE komplex a sérült fehérjék kijavítására kötődik le, így a 32 kDa-os szigma faktor szabadon marad, stabilitása és ezáltal koncentrációja megnő. Mivel a 70 kDa-os szigma faktor is egy hő-sokk fehérje, bizonyos idő elteltével eredményes kompetitorává válhat a 32 kDa-os szigma faktornak, visszaállítva a "normál" fehérjék szintézisét (Tilly és mtsai, 1989; Straus és mtsai, 1990; Georgopoulos, 1992).

#### **Transzkripció hő-sokk esetén eukariótákban**

Eukariótákban a hő-sokk fehérjéket kódoló gének expresszióját a hő-sokk faktor (HSF) indítja el. "Normál" sejtekben a 32 kDa-os prokarióta szigma faktornal hasonlóan a HSF a hsp70-hez kötött állapotban fordul elő. A hsp70 (esetleg a dnaJ és grpE fehérjék eukarióta homológjaival közösen) meggátolja, hogy a HSF a sejtmagba jusson és kössön a DNS-hez (Craig és Gross, 1991; Morimoto és mtsai, 1992; Abravaya és mtsai, 1992; Beckmann és mtsai, 1992; Baler és mtsai, 1992). A HSF "elérésztése" és aktivációja még nem teljesen tisztázott folyamatok alapján megy végbe. Az aktiváció során a HSF konformációváltozása, oligo(tri)merizációja és foszforilációja figyelhető meg (Zimarino és mtsai, 1990; Westwood és mtsai, 1991; Rabinrdan és mtsai, 1993; Sorger és mtsai, 1987; Sorger és Pelham, 1988). A fehérje konformációváltozása hypoxia, pH változás, nemionos detergenssek és kalcium hatására is bekövetkezik (Benjamin és mtsai, 1990; Mossler és mtsai, 1990).

#### **A magreceptorok hatásának mechanizmusa**

##### *A szteroid receptorok genetikai családja*

A szteroid receptorok eddig felderített genetikai családjába a tényleges szteroid receptorokon (glükokortikoid, mineralokortikoid, androgén, progeszteron, ösztadiol) kívül a D vitamin receptor, a tiroid hormon receptor, a v-erbA onkogén, a retinoid receptor, a csirke ovalbumin "upstream promoter", a rovarokban található ecdizon receptor és még vagy húsz kevésbé felderített fehérje tartozik (Evans, 1988; O'Malley, 1990; Amero és mtsai, 1992). Az aril-hidrokarbon receptor --annak ellenére, hogy hő-sokk fehérjékkel a szteroid receptorokhoz hasonlóan komplexet képez-- a szteroid receptoroktól genetikailag különbözik (Burbach és mtsai, 1992). A "szélesebben vett" szteroid receptorok közös vonása, hogy a DNS-hez két "cink-ujj"-jal kötődnek (Evans, 1988; Amero és mtsai, 1992). Mivel a szorosán vett szteroid receptorokon kívül a többi magreceptor nem, vagy nem közelebbről nem tisztázott módon köt hő-sokk fehérjéket, a továbbiakban csak a "szorosán" vett szteroid receptorokkal fogok foglalkozni.

#### *A hsp27/hsp59/hsp70/hsp90 komplex kötődése a szteroid receptorokhoz*

A szteroid receptorok transzkripciójuk során, a hsp90 tárgyalásánál a 35-36. oldalon már említett, citoszolbeli (hsp27)/hsp59/hsp70/hsp90 komplex-szel asszociálnak (Sanchez és mtsai, 1985; Dalman és mtsai, 1989; Sanchez és mtsai, 1990/a; Rexin és mtsai, 1991). A 23-27 kDa-os fehérjéről nemrég látták be hogy az ösztrogén receptor-komplex részeként azonos a hsp27-tel (Mendelsohn és mtsai, 1991), de a citoszolbeli hsp59/hsp70/hsp90 komplex-ben való részvétele még nem tisztázott. A szteroid receptorral a hsp90 dimer és a hsp70 lép közvetlen kölcsönhatásba, a hsp59 a hsp90-en keresztül vesz részt a kötésben (Denis és mtsai, 1987; Kost és mtsai, 1989; Renoir és mtsai, 1990/a). A hsp90 dimer mind a szteroid receptorban, mind a citoszolban azonos arányban tartalmazza az alfa és a béta hsp90 izoformát, azaz a receptor "nem válogat" (Mendel és Orti, 1988). A szteroid receptor komplex-szel a hő-sokk fehérjéken kívül még számos más fehérje is asszociál, így 14, 38 és 50 kDa molekulatömegű fehérjék kötődését figyelték meg (Rexin és mtsai, 1991; Alexis és mtsai, 1992). Az 50 kDa-os fehérje a hsp90/v-src komplexnek is része (Pratt és mtsai, 1992). Az eddig azonosíthatatlan fehérjék közül lehet, hogy egyik-másik a hsp70 aktivítását növelő eukarióta dnaJ, vagy grpE homológ, illetve a mindhárom azonosított hő-sokk fehérjével komplexet képző kalmodulin, aktin, vagy tubulin (ld. 2.2.1. fejezet). Az is megeshetik, hogy a kisebb molekulatömegű fehérjék egyike-másika a szteroidreceptor, vagy a hozzá kapcsolódó hő-sokk fehérjék limitált proteolízise révén keletkezik.

Az aril-hidrokarbon receptor különbözik a szteroid receptoroktól, ugyanis a hsp90 monomer-en kívül (a többi hő-sokk fehérje helyett) egy 87 kDa-os ún. nukleáris transzlokátor fehérjét tartalmaz, amivel a receptor ligandum kötő alegysége egy hélix-hajtú-hélix részletet kialakítva képessé válik a DNS-hez való kötésre (Reyes és mtsai, 1992).

A hsp90 és a hsp70 kötésében a glükokortikoid és a progeszteron receptor hormon-kötő régiójának több, eléggé diffúz szegmense vesz részt (Pratt és mtsai, 1988; Schowalter és mtsai, 1991). Az ösztrogén receptor esetén a hsp90 kötéséhez a hormunkötő régió mellett a receptor nukleáris lokalizációs szignálját tartalmazó rövid részlet is szükséges (Chambrud és mtsai, 1990).

#### *A hő-sokk fehérjék lehetséges szerepe a szteroid receptorok aktiválásában*

A hő-sokk fehérjéknek a szteroid receptorok aktiválásában játszott szerepe ma sem tisztázott teljesen. A hő-sokk fehérjék részt vehetnek/vesznek

- a szteroid receptorok DNS-kötőhelyének elfedésében;
- a szteroid receptorok bejuttatásában a sejtmagba;
- a nagy affinitású szteroidkötőhely kialakításában;
- a szteroid receptor a DNS-hez való kötéséhez szükséges instabil konformációjának megőrzésében.

A szteroidreceptorok hatásmechanizmusa megértésének kulcslépése volt, amikor a hsp90-nel való asszociációjuk felfedezése után több laboratóriumban szellemes módszerekkel bebizonyították, hogy szteroidhormon hatására a hsp90 disszociál és az "apo"-receptor a DNS-kötésre alkalmassá válik (Groyer és mtsai, 1987; Denis és mtsai, 1988; Pickard és mtsai, 1988). A hő-sokk fehérjék azonban nem csupán 'maszkírozó' szerepet töltenek be. Picard és munkatársai (1990) olyan élesztőbe ültettek be



szteroidreceptorokat, amelyben a hsp90 szint a normálisnak kb. 1/20-a volt. A hsp90 mentes receptorok lényegesen lecsökkent transzkripció hatása a hő-sokk fehérjéknek a receptorokat aktiváló szerepéről tanúskodott.

A szteroidreceptorok hő-sokk fehérjékkel asszociált "holo" formájuk sejten belüli elhelyezkedése szerint és a hő-sokk fehérjéknek a szteroidkötőhely "megteremtésében" játszott szerepe szerint két osztályba sorolhatók (Pratt, 1990). A glükokortikoid és a mineralokortikoid receptorok holo-formájának lokalizációja nem teljesen tisztázott. Izolálás során a receptorok a citoszolban dúsulnak fel, de több jel utal arra, hogy *in vivo* laza kötésben a sejtmagon belül helyezkednek el (Renoir és mtsai, 1990/b; Sanchez és mtsai, 1990/b). ATP deplécio hatására, vagy hő-sokk után a holo-glükokortikoid receptor egyértelműen a sejtmagba vándorol (Mendel és mtsai, 1986; Sanchez, 1992). E kísérletek is közvetetten az ATP-kötő hő-sokk fehérjék szerepét támasztják alá a receptorok sejtmagba juttatásában. A progeszteron, ösztadiol és androgén receptorok hő-sokk fehérjékkel asszociált holo-alakja egyértelműen a sejtmaggal asszociál (Pratt, 1990).

A szteroidreceptorokban két nukleáris lokalizációs szignál (NLS) található. Az egyik a második "cink-ujj" tövénél helyezkedik el, a másik pedig a szteroidkötő régió részét képezi (Pickard és Yamamoto, 1987). A szteroidkötő helyen lévő NLS "darabokból" épül fel a szteroid kötése és a hsp90 távozása után. A "cink-ujj" melletti, ún. konstitutív NLS-t a hormonkötő-domain a glükokortikoid és a mineralokortikoid holo-receptorban elfedi, hormon hatására a receptor "kitekeredik" és az NLS szabadon elérhető lesz. A szexuáliszteroid receptorok esetén a konstitutív NLS mindig elérhető formában van jelen. Ezzel a receptor-konformációbeli különbséggel magyarázható a kétféle holo-receptor eltérő sejten belüli lokalizációja is (Pratt, 1990; Ylikomi és mtsai, 1992).

A hő-sokk fehérjék szerepet játszhatnak a szteroid receptorok sejtmagba juttatásában. Keresztkötes kísérletek tanulsága szerint a szteroidreceptorok feltételezhetően ugyanazt a nukleáris transzport-mechanizmust használják, mint a többi fehérje (LaCasse és Lefebvre, 1991). A hsp70 (amely a magba irányuló fehérjetranszport-rendszer része, ld. 2.2.3. fejezet) feltehetően segíti a meglehetősen pufók holo-receptor átjutását a nukleáris póruson (Sanchez és mtsai, 1990/b). Nem teljesen tisztázott, hogy részt vesz-e a mikrofilamentáris, mikrotubuláris rendszer a szteroid receptorok sejtmagba juttatásában. Egyrészt a holo-receptor a hsp90-en keresztül köt mind az aktin, mind a tubulin hálózathoz (Akner és mtsai, 1990; Miyata és Yahara, 1991), másrészt a sejtmagba való bejutás előtt közvetlenül a holo-receptor más természetű struktúrákkal (feltehetően a nukleáris pórus "halcsapda"-szerű citoplazmatikus képződményeivel, ld. 2.1.2.2. fejezet) asszociál (Perrot-Applanat és mtsai, 1992). A hsp70 mellett egy 40 kDa körüli, eddig még nem azonosított fehérjét is leírtak, amely segíti a szteroidreceptorok transzportját a sejtmagba (Okamoto és mtsai, 1988).

A szteroidreceptorok két osztálya, a glükó- és mineralokortikoid receptorok, valamint a szexuáliszteroid receptorok abban is eltérnek egymástól, hogy szükséges-e a hő-sokk fehérjék részvétele a szteroidkötőhely kialakításában. A kortikoidreceptorok és az aril-hidrokarbon receptor a hsp90 nem szteroidfüggő (pl. hőhatással elért) disszociációja során "rossz" konformációba kerül és nem lesz képes a szteroid köté-

sére (Bresnick és mtsai, 1989; Pratt, 1990; Pongratz és mtsai, 1992). A szexuálszteroid receptorok esetén a szteroidkötő képesség javarészt független a hő-sokk fehérjék előzetes hatásától (Pratt, 1990; Nemoto és mtsai, 1992). McNaught és munkatársai (1990) azonban ösztadiol receptor esetén is izoláltak egy közelebből meg nem határozott, 40 kDa molekulatömegű citoplazmatikus fehérjét, amely képes volt az ösztadiol kötés segítésére.

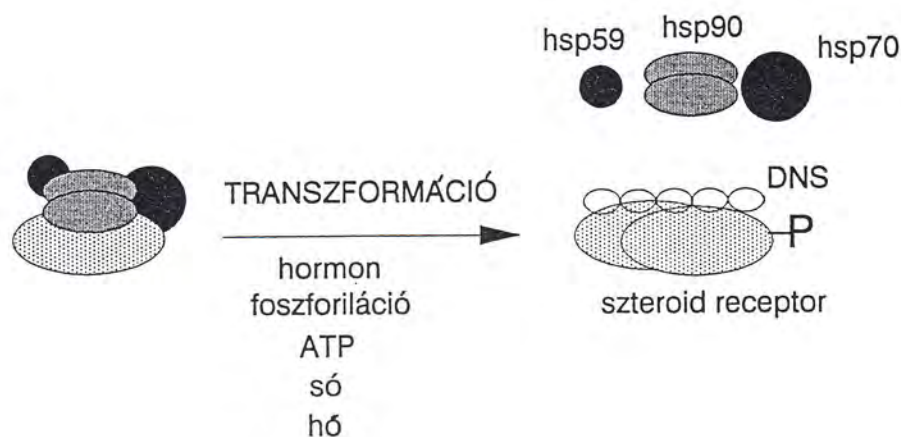
A hsp90 nem "szabályos", nem szteroidfüggő disszociációja a glükokortikoid receptornak nem csak a szteroidkötő helyét "teszi tönkre", hanem az így felszabadult apo-receptorok nem kis részében a szteroidkötő domain "ráhajlik" a DNS-kötő régióra és a receptor a hsp90-tól való "megszabadulása" ellenére változatlanul képtelen a DNS-kötésre (Hutchinson és mtsai, 1992). Ezek a kísérletek is igazolják, hogy (különösen a glükokortikoid és a mineralokortikoid receptorok esetén) a hő-sokk fehérjék a szteroidreceptorok instabil konformációját "tartják fogva". A fenti eredmények annak a feltételezésnek is közvetett bizonyítékaiként szolgálnak, amely szerint a hsp90 csak a kromatinhoz kötött holo-receptorról távozik. Kézenfekvő ugyanis, hogy a meglehetősen instabil, ilyen-olyan "helytelen" konformációba könnyen betekeredő apo-receptort valaminek "kifeszítve" kell tartania a hsp90 távozása után is. Erre a feladatra a kromatin nagyszerűen alkalmas.

#### *A szteroidreceptorok transzformációjának feltételezett mechanizmusa*

Különösen a régebbi szteroid-irodalomban nagy zavar uralkodott a "szteroidreceptor aktivációja" (értsd leginkább: glükokortikoid receptor aktivációja) fogalom körül. Aktiváción sokan azt a jelenséget értették, amikor a helytelen konformációba tekeredett, szteroidkötésre képtelen holo-, vagy apo-receptor visszanyerte szteroidkötő képességét, mások pedig azt a folyamatot jelölték ezzel a szóval, amikor a hsp90 disszociálásával a szteroidreceptor (glükokortikoid receptor) képessé vált a DNS-hez való kötődésre. Ezen *utóbbi* folyamatot az összezavarodás elkerülése végett transzformációnak fogom nevezni. A szteroidreceptorok transzformációját számos tényező befolyásolja. Ezek hatásait a 12. ábrán foglaltam össze. Az ATP a transzformáció meggyorsítása mellett elősegíti a receptorok szteroidkötő képességének megőrzését is. Ezzel összhangban Mendel és munkatársai (1986) ATP-szegény sejtekben a glükokortikoid receptort szteroid kötésére képtelen formában, a sejtmaghoz szorosan kötötten találták meg.

A szteroid receptorok transzformációjának legfontosabb lépése a hormon kötése után a hsp90-dimer disszociációja a holo-receptor komplexről. Ez azonban messze nem az egyetlen folyamat, amely a DNS-kötésig "vezető úton" lezajlik. A hormonkötődés a disszociációval párhuzamosan a receptor konformációjának megváltozásához (Sabbah és mtsai, 1991; Allan és mtsai, 1992) és az apo-receptor dimerizációjához vezet (Guiochon-Mantel és mtsai, 1989; DeMarzo és mtsai, 1991). A transzformáció során a receptor hormonfüggően foszforilálódik (Auricchio, 1989) és feltételezhetően részleges proteolízise zajlik le (Grody és mtsai, 1982). Annak ellenére, hogy a receptorok foszforilációjára és proteolízisére *in vitro* szinte minden fehérje kináz és proteáz alkalmas, a folyamatokért *in vivo* felelős enzimek felderítése (a könyvtárnyi irodalom tanulsága szerint) mindeztidáig nem sikerült. Bagchi és munkatársai (1992), valamint Takimoto és munkatársai (1992) nemrégiben közzétett eredményei sze-





12. ábra A szteroidreceptorok transzformációját befolyásoló körülmények (Grody és mtsai, 1982; alapján)

rint a foszforiláció DNS-függő, amely elképzelhetővé teszi a foszforilációs folyamatokban részt vevő hő-sokk fehérjék, vagy a 19. oldalon ismertetett kromatoszóma kináz részvételét a folyamatban. A szteroidreceptor foszforilációjának tisztázásához hasonlóan a transzformáció mechanizmusának megértése is további kutatásokat igényel.

#### *Szteroidreceptorok kölcsönhatása a kromatinnal*

A magreceptorok népes családjának egyik legkonzervatívabban megőrzött szerkezeti eleme az a két, egymást követő "cink-ujj", amely felelős az apo-receptor DNS-hez való kötődéséért (Evans, 1988; O'Malley, 1990). Ezzel összefüggésben számos szerző mutatott rá arra, hogy cink ionok hozzáadása akár 50 nM szabad  $Zn^{2+}$  koncentrációban is jelentősen fokozza a szteroid receptorok kötődését a DNS-hez (Colvard és Wilson, 1984; Predki és Sarkar, 1992). Mindezek ellenére a cink szerepével foglalkozó tanulmányok jelentős részét erős kritikával kell fogadnunk, ugyanis a cinkionok eltávolítására olyan kelátorokat használtak (pl. o-fenantrolint), amelyek hidrofób sajátosságaiknál fogva a szteroid-receptor/hsp, szteroidreceptor-dimer és a szteroid-receptor-szteroidhormon kölcsönhatásokat is megzavarják (Grody és mtsai, 1982; Mahon és Gasiewicz, 1992).

A szteroidreceptorokban található két "cink-ujj" közül az N-terminális felőli inkább a DNS-kötés specificitásáért, a C-terminális felőli pedig a kötés erősségeért felelős (Carson-Jurica és mtsai, 1990). A cink-ujjak a DNS-en az ún. szteroid-kötő szakaszhoz (SRE, steroid response element) kötnek. A szteroid receptor a kötésben dimer formájában vesz részt, de gátlást okozó reguláció esetén leírtak trimer struktúrát is, sőt, a megfelelő kötéserősség kialakításához általában két, egymással kooperáló dimer is szükséges (O'Malley, 1990; Drouin és mtsai, 1993). A szteroidre-

ceptor transzkripció aktivitásához a fehérje két különálló szakaszára van szükség, amelyek a szteroidhormon hatására megfelelő konformációba kerülnek és a TFIIB általános transzkripció faktorral kölcsönhatásba lépve a TATA-box-hoz kötő TFIID-vel segítik az RNS polimeráz II megkötését, aktiválását (O'Malley, 1990; Bagchi és mtsai, 1991; Ing és mtsai, 1992).

A szteroidreceptor-dimerek nem csak egymással, hanem az adott gén promoter régiójához kötő más specifikus transzkripció faktorokkal is kölcsönhatásba lépnek. E kölcsönhatások első példjaként nemrégiben a fos/jun heterodimer és a glükokortikoid receptor egymáshoztapadásáról és ebből következő kölcsönös gátlásáról számoltak be (Yang-Yen és mtsai, 1990; Hass és mtsai, 1991).

A szteroidreceptorok nem a pucér DNS-hez, hanem a hisztonokra tekeredő, H1 hisztonnal "körülbástyázott" kromatinhoz kötnek. Más transzkripció faktorokkal ellentétben a nukleoszómaszerkezet a szteroid receptorok kötődését nem gátolja, sőt, a receptorok dimerizációjának elősegítésével még segíti is. A kötődés nagyobb valószínűséggel és affinitással megy végbe, ha a szteroid-kötő DNS szakasz az adott nukleoszóma "szélén", semmint ha a közepén helyezkedik el.

A jelenlegi ismeretek szerint kérdéses, hogy szteroidreceptor kötődése önmagában elég-e a nukleoszómaszerkezet transzkripciót segítő kellő fellazításához (Zaret és Yamamoto, 1984; Pina és mtsai, 1990; Pham és mtsai, 1992). Nagyon valószínű, hogy a hisztonszerkezet átrendezéséhez a receptorokon kívül más faktorok hatása is szükséges. Ilyen nem hiszton-típusú nukleáris faktorokat (nukleáris receptorokat) egyelőre a szexuálszteroid receptorok, a D vitamin receptor és a tiroid hormon receptor, tehát azon hormonreceptorok esetén írtak le, amelyek holoreceptorként is a sejtmagban helyezkednek el, vagy hő-sokk fehérjékkel nem asszociálnak (ld. 13. táblázat és Liao és mtsai, 1990). A glükokortikoid és a mineralokortikoid receptorok esetén a receptorok asszociációját segítő nukleáris faktorok felfedezése még várat magára.

Molekula- tömeg (kDa)	Receptor	Irodalmi hivatkozás
6,10 (+)	progeszteron	Goldberger és Spelsberg, 1988; Rejman és mtsai, 1991
20 (+)	androgén	Rennie és mtsai, 1987
33 (+)	androgén	Bruchovsky és mtsai, 1975
60 (+)	ösztradiol	Feavers és mtsai, 1987
70 (+)	ösztradiol	Feavers és mtsai, 1987
65 (+)	tiroid	Burnside és mtsai, 1990
(-)	ösztradiol	McDonnell és mtsai, 1992
	progeszteron	

13. táblázat A szteroidreceptorok hatását befolyásoló nukleáris faktorok (+) = aktiváló faktor; (-) = gátló faktor



A szteroidreceptorok 48-49. oldalon ismertetett hormon- és DNS-függő foszforilációja nem csak a receptorok transzformációját segíti elő, hanem transzkripciós hatásukat is aktiválja. A foszforiláció a receptorok transzkripciós kölcsönhatásokért felelős régiójában zajlik le, és minden bizonnyal szerepet játszik a szteroid receptor/transzkripciós faktor/nukleoszóma komplexek kialakításában (Hoeck és Groner, 1990; Denner és mtsai, 1990; Lin és mtsai, 1992/a).

#### *A szteroidhatás terminációja*

Elég keveset tudunk arról, hogy a transzkripció "végeztével" a szteroidreceptor minek a hatására hagyja el a DNS-t és kerül ki a citoplazmába. Jelenlegi ismereteink egyetlen biztos pontja, hogy a szteroidhatás terminációjához a receptor defoszforilációja szükséges (Auricchio és Migliachio, 1980; Auricchio és mtsai, 1982; Orti és mtsai, 1989; Pongratz és mtsai, 1991).

A szteroidreceptorok és a kromatin kölcsönhatásának vizsgálata során az első kísérletes rendszerek pucér, hisztonmentes DNS-t alkalmaztak. A valósághoz közelebb álló, nukleoszómákat is tartalmazó modellrendszerek kidolgozása és alkalmazása csak néhány éves múltra tekint vissza. Így nem meglepő az sem, hogy a tudományos kutatás mindaddig méltatlanul megfigyelte a szteroidreceptorok transzformációja során leszakadó, a DNS közelében "kószáló" hő-sokk fehérjék, így a hsp59, a hsp70 és a hsp90 szerepének vizsgálatáról a szteroidreceptorok transzkripciós folyamataiban és a szteroidhatás terminációjában.

### **2.2.5. Hő-sokk fehérjék az orvostudományban**

#### **2.2.5.1. A hő-sokk fehérjék szerepe a fertőzések leküzdésében és az autoimmun betegségekben**

##### *Hő-sokk fehérjék a fertőzések leküzdésében*

A hő-sokk fehérjék aminosavsorrendje egyike az élővilág legváltozatlanabbul továbböröklődő struktúráinak (Lindquist, 1986; Lindquist és Craig, 1988; Schlessinger, 1990; Welch, 1992). Emiatt a szervezetet érő bakteriális és más mikroorganizmusok által okozott fertőzésekben az immunrendszer számára egy nagy hatékonyságú, "kényelmes" megoldást jelent a mikroorganizmusokban közös antigén, a mikrobiális hő-sokk fehérjék ellen irányuló immunválasz. A szervezetbe jutott patogéneket stresszhatások egész sora éri. Élelemmegvonás, pH változás, emésztőenzimek, peroxidok és nem utolsósorban hőmérsékletváltozás, adott esetben láz. Nem csoda, hogy a mikroorganizmus erre az "inzultussorozatra" hő-sokk fehérjék szintézisével (is) válaszol. Az immunválasz során e hő-sokk fehérjékből származó antigének megjelennek a fertőzött sejtek felszínén és az immunrendszert e sejtek elpusztítására sarkallják (Young és Elliott, 1989; Latchman, 1991; Garbe, 1992; Jäättelä és Wissing, 1992; Csermely és Somogyi, 1992). Azon fertőzések néhány példáját, amelyben szervezetünk a mikroorganizmus által termelt hő-sokk fehérjéket antigénként használja fel, a 14. táblázatban mutatom be.

Patogén	Betegség	hő-sokk fehérje család
<i>Borellia burgdorferi</i>	lyme-kór	hsp60
<i>Brugia malayi</i>	filiariázis	hsp70
<i>Candida albicans</i>	szájpenész	hsp90
<i>Chlamydia trachomatis</i>	trachoma	hsp60, hsp70
<i>Coxiella burnetii</i>	Q-láz	hsp60
<i>Legionella pneumophila</i>	légionárius betegség	hsp60
<i>Leishmania major</i>	leishmaniasis	hsp70
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	tuberkulózis	hsp27, hsp60, hsp70
<i>Mycobacterium leprae</i>	lepra	hsp27, hsp60, hsp70
<i>Onchocerca volvulus</i>	filiariázis	hsp70
<i>Plasmodium falciparum</i>	malária	hsp70, hsp90
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		hsp60
<i>Rickettsia tsutsugamushi</i>		hsp60
<i>Schistosoma mansoni</i>		hsp27, hsp70, hsp90
<i>Treponema pallidum</i>	szifilisz	hsp60
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Chagas-kór	hsp70, hsp90

14. táblázat Mikrobiális hő-sokk fehérjék, mint antigének különböző fertőzések esetén (Nene és mtsai, 1986; Shinnick, 1991; Jäättelä és Wissing, 1992; Matthews és Burnie, 1992 alapján)

#### *Hő-sokk fehérjék az autoimmun betegségekben*

A szervezet saját, a bakteriális antigénnel hasonlóságot mutató hő-sokk fehérjéi is megjelenhetnek ép, nem fertőzött sejtek felszínén, ha a sejteket valamilyen károsodás (stressz) éri. Ha az egyébként igen sokrétűen ellenőrzött immunválasz "kibicsaklik" és a szervezet saját hő-sokk fehérjéit, vagy más, hasonló saját fehérjéket bakteriális antigénként ismer fel, viharos lefolyású autoimmun betegségek alakulhatnak ki (Dubois, 1989; Latchman, 1991; Csermely és Somogyi, 1992).

Az autoimmunitás régi elmélete, amely a szervezet saját antigénjei ellen fellépő T limfociták negatív szelekcióját, elhalását feltételezte, nem tudja megmagyarázni azt, hogy rendkívül sok mikrobiális fertőzés esetén miért éppen a szervezet saját antigénjeihez nagymértékben hasonló mikrobiális molekulák ellen alakul ki a legnagyobb erősségű immunválasz. Ez a felismerés készítette Irun R. Cohen-t az autoimmunitásról vallott elképzelés újrafogalmazására (Cohen és Young, 1991). Elmélete szerint a szervezet antigénjei ellen a szokásosnál éppen hogy nem gyengébb, hanem erősebb immunválasz létezik mindannyiunkban, csak ez az immunválasz nem agresszív, "vad", hanem "házasított", azaz kontrollált. Szervezetünk a leggyakrabban előforduló saját molekulák (Cohen megfogalmazása szerint az immunológiai homunculus) ellen egy-egy T és B sejtek szabályozott kölcsönhatásán alapuló hálózatot épített fel. E hálózatokban mind az antigénnel, mind pedig az antigén-receptorral reagáló sejtek megtalálhatók. A hálózatok kontrollált működése alapján a szervezet saját molekulái elleni immunválasz nem agresszív, hanem szabályozott. Ez a szabályozás persze nem mindig tökéletes. Néha a negatív szabályozás által meghagyott immunválasz



Betegség	Antigén/autoantigén
lupus erythematosus reumatoid arthritis	/ubikvitin, hsp70, hsp90 b-hsp65/kollagén II; porcszövet proteoglikán
inzulinfüggő diabetes mellitus	b-hsp65/glutaminsav dekarboxiláz, hsp60
skizofrénia	/hsp60

15. táblázat **Hő-sokk fehérjék szerepe az autoimmun betegségekben** (Backkesov és mtsai, 1990; Latchman, 1991; Winfield és Jarjour, 1991; Yang és Feige, 1992; Brudzynski és mtsai, 1992; Kilidireas és mtsai, 1992, valamint Csermely és Somogyi, 1992 nyomán) b-hsp65 = 65 kDa-os bakteriális hő-sokk fehérje

kevésnek bizonyul: a szervezetbe jutott baktérium "álcázza" magát és fertőzést okoz. Néha pedig a saját molekulák elleni immunválasz kisiklik a mégoly erős kontroll alól: autoimmun betegség alakul ki. A "túlpörgött"/kisiklott immunválasznak nagyon nagy szerepe van az egyes fertőzések után jelentkező szövôdmények kialakulásában (Winfield és Jarjour, 1991).

A hő-sokk fehérjékkel, mint antigénnel kapcsolatos autoimmun betegségeket a 15. táblázatban foglalom össze. A táblázat adataihoz két megjegyzés kívánczik. Egyrészt a humán hsp60 az inzulinfüggő diabetes mellitusban játszott autoantigén szerepe jelenleg még vitatott (Siddle és mtsai, 1989), másrészt az autoimmunitás a skizofrénianak minden bizonnyal csak egyik kiváltó oka (Kilidireas és mtsai, 1992).

Az autoimmun betegségekben szerepet játszó autoantigének és ezek immunogén epitopjainak felderítése megnyitja az utat a betegségek gyógyítása felé (Yang és Feige, 1992). Így például a bakteriális 65 kDa-os hő-sokk fehérje nem immunogén változatával, mint "vacciná"-val, a rákövetkező fertőzés által kiváltott arthritis, vagy inzulinfüggő diabetes mellitus súlyossága csökkenthetőnek bizonyult (Van Eden és mtsai, 1988; Van den Broek és mtsai, 1989; Elias és mtsai, 1990).

#### 2.2.5.2. Hő-sokk fehérjék a rákos megbetegedésekben

Rákos sejtekben számos hő-sokk fehérje indukcióját lehet megfigyelni. Az eddig leírt példák között mind a hsp32 (hem oxigenáz), mind a hsp70, mind pedig a hsp90 (különösen annak alfa izoformája) szerepel (Kageyama és mtsai, 1988; Yufu és mtsai, 1992; Ferrarini és mtsai, 1992). A hsp27 esetén az eddig kialakult kép meglehetősen ellentmondásos, a fehérjének mind az indukciója, mind csökkent szintje előfordul rákos sejtekben (Zantema és mtsai, 1989; Delhay és mtsai, 1992). Mivechi és munkatársai (1992) a hő-sokk faktor csökkent DNS-kötődéséről számoltak be leukémia sejtekben. A hő-sokk fehérjék --a sejt életében betöltött általános szerepüknél fogva-- jónéhány, egymástól gyökeresen különböző és a rákos sejt sorsa szempontjából meglehetősen ellentétes hatású folyamatban részt vesznek a transzformált sejtekben. Ezek közül néhányat a 16. táblázatban foglalom össze.

### *A rák kialakulását, terjedését gátló funkciók*

hsp27	proliferáció-gátlás	Spector és mtsai, 1992; Knauf és mtsai, 1992
hsp70	tumor antigén	Kanno és mtsai, 1989; Ferrarini és mtsai, 1992
hsp70	p53 anti-onkogén aktiválása	Clarke és mtsai, 1988; Hupp és mtsai, 1992; Agoff és mtsai, 1993
hsp90	tirozin kináz gátlás	Brugge és mtsai, 1981; Ziemiecki, 1986
hsp90	tumor antigén	Ullrich és mtsai, 1986
hsp110	tumor antigén	Srivastava és mtsai, 1986; Ferrarini és mtsai, 1992

### *A rák kialakulását, terjedését segítő funkciók*

hsp27	foszforilációja gyógy-szerrezisztenciát okoz	Huot és mtsai, 1992
hsp70	tumor nekrozis faktor hatásának gátlása	Jäättelä és mtsai, 1992

### *A rák kialakulása, terjedése szempontjából eddig nem vizsgált funkció*

hsp90	kötés egy 68 kDa-os TPA-receptorhoz	Hashimoto és Shudo, 1991
-------	-------------------------------------	--------------------------

16. táblázat Hő-sokk fehérjék eddig felderített speciális funkciói rákos sejtekben (Srivastava és Maki, 1991 nyomán)

#### 2.2.5.3. Hő-sokk fehérjék és ischaemia

Amióta Currie és mtsai (1988) kimutatták, hogy a hő-sokk fehérjék előzetes szintézise megvédi a szívmot az átmeneti ischaemiás oxigénhiánytól szintúgy, mint az oxigénellátás helyreállása utáni oxidatív károsodástól, a hő-sokk fehérjéknek a szív védelmében játszott szerepe az érdeklődés középpontjába került. A szív hő-sokk fehérjéi közül eddig a hsp70 szintézisét vizsgálták a legalaposabban. A hsp70 mRNS fokozott szintézisét sikerült kimutatni hypoxia, koronária elzáródás, nyomás-túlterhelés, fokozott izommunka és béta-adrenerg agonisták hatására (Latchman, 1991; Williams és Benjamin, 1992). A hsp70 mellett az antioxidáns bilirubin termelő hem-oxigenáz is egy olyan hő-sokk fehérje, amelynek fokozott szintézise segíthet a szív reperfüziója során fellépő oxidatív károsodás kivédésében (Thorne és mtsai, 1992). Olyan gyógyszerek kikísérletezésével, amelyek szelektíven és károsodásmentesen a szívmot fokozott hő-sokk fehérje szintézisét idéznék elő, hatékonyan mozgósítani lehetne a szív saját védekező mechanizmusát infarktusveszélynek kitett, vagy infarktuson átesett betegekben.



A gyulladásban lévő ízület oxigénellátás szempontjából nagymértékben hasonlít az ischaemiás szívre: a reumás ízület is hypoxiás, hyperkapnikus, lokális acidózis jellemzi, és mozgás közben igen nagy nyomásváltozásoknak lehet kitéve (Winrow és Blake, 1991). Caltabiano és munkatársai (1988) megfigyelték, hogy a reuma ellen használatos auranofin egy 32 kDa molekulatömegű hő-sokk fehérje (hem oxigenáz?) szintézisét segíti elő a gyulladásban lévő ízületekben. Az auranofin hatásmechanizmusának ezen eleme jó példája a hő-sokk fehérjék mobilizációján alapuló gyógyítási eljárásnak.

A hsp70 fokozott szintézisét figyelték meg az agyban bekövetkező ischaemia után is (Dwyer és Nishimura, 1992; Welsh és mtsai, 1992). Ezek a megfigyelések is alátámasztják, hogy a hő-sokk fehérjék ischaemiában és az utána következő reperfüzióban történő fokozott szintézise az egész szervezetre kiterjedő, általános jelenség lehet.

#### 2.2.5.4. Prionok: molekuláris anti-chaperonok?

A prionok a *Gerstmann-Sträussler-* és *Creutzfeld-Jakob*-szindrómákat, valamint más, degeneratív encephalopátiákat okozó fehérjetermészetű anyagok (ú.n. proteo-vírusok; Prusiner, 1991; Weissmann, 1991). *Jean-Pierre Liautard* (1991) vonzó, de kísérleti tényekkel még nem kellőképpen alátámasztott hipotézise szerint a prionok fertőzést kiváltó része tulajdonképpen egy olyan "anti-hő-sokk fehérje", amely ahelyett, hogy a helyes konformáció irányába terelne más fehérjéket, éppen a helytelen konformációjukat stabilizálja. A helytelen konformációjú fehérjék újabb helytelen konformációjú fehérjék stabilizálásában segédkeznek és így tulajdonképpen egy fehérjével közvetített, a sejt pusztulásához vezető károsodás zajlik le.

#### 2.2.5.5. Hő-sokk fehérjék az autodegeneratív betegségekben

A sejtek auto-degradációjával járó számos betegségben, a sejteken belül speciális zárványok koncentrálnak a sérült, részlegesen lebontott fehérjéket. A zárványokkal számos hő-sokk fehérje asszociál (ld. 17. táblázat; Mayer és mtsai, 1991). A hsp27 családba tartozó krisztallin a fehérjék koncentráálásában, kristályosításában vehet részt (Forsdyke, 1985; Horwitz, 1992), az ubikvitin és a hsp70 pedig a fehérjelebontó folyamatok eredményeként/előkészítőjeként lehet a zárványok alkotóeleme (Hershko és Ciechanover, 1992; Chiang és mtsai, 1989).

Betegség/Zárvány	Hő-sokk fehérje	Irodalmi hivatkozás
Alzheimer kór	ubikvitin	Mayer és mtsai, 1991
Alexander kór/Rosenthal fonal	ubikvitin	
	hsp27	Iwaki és mtsai, 1989
Parkinson-kór/Lewy test	ubikvitin	
	hsp27	Lowe és mtsai, 1992
cirrózis/Mallory test	ubikvitin	
	hsp27	Lowe és mtsai, 1992
Creutzfeld-Jakob szindróma	hsp27	Renkawek és mtsai, 1992

17. táblázat Hő-sokk fehérjék az autodegeneratív betegségekben hsp27 = alfa-B-krisztallin

#### 2.2.5.6. A hő-sokk fehérjék az öregedésben

Az öregedés elméletei közül jelentős helyet foglalnak el azok, amelyek a szervezet "javító" mechanizmusainak (immunrendszer, DNS repair, szabadgyökök elimináció, stb.) kopását teszik felelőssé az észlelt változásokért (Behnke és mtsai, 1978). A hő-sokk fehérjék nagy szerepet játszanak a sejt fehérjei "helyes" konformációjának fenntartásában, a fehérjék "ragadós", hidrofób részletei felszínrekerülésének és ezáltal nem kívánt aggregációjának megakadályozásában akár a fehérje lebontása árán is (ld. 2.2.1. fejezet). Ez a sejten belüli tisztogató funkció jól beleillik azok sorába, amelyek elromlása az öregedéshez hozzájárulhat.

Ezen elképzeléssel összhangban ismert néhány olyan adat, amely egyrészt a helytelen konformációjú fehérjék felszaporodásáról, másrészt a hő-sokk fehérjék indukciójának megváltozásáról, zavaráról számol be idősödő szervezetekben. Reiss és Rothstein (1974) az izocitrát-liáz, Yuh és Gafni (1987) a foszfoglicerát-kináz öregedéssel együttjáró inaktiválódását az enzim hő-labilis, "helytelen" konformációjú formájának felszaporodásával tudták összefüggésbe hozni. Fleming és mtsai (1988) arról számoltak be, hogy öreg gyümölcslegyeken alkalmazott hő-sokk teljesen más fehérjéket indukált, mint fiatal társaikban. Végül mind patkányokban (Fargnoli és mtsai, 1990; Pardue és mtsai, 1992), mind emberben (Deguchi és mtsai, 1988; Blake és mtsai, 1991) a 70 kDa-os hő-sokk fehérje aktivációjának öregedéssel együttjáró zavaráról számoltak be. E megfigyelések arra utalnak, hogy idősödő szervezetek sejtjeiben a helytelen konformációjú fehérjék feldúsulhatnak és az e fehérjéket "helyreterelő", illetve eltávolító mechanizmusok csökkent működésűek lehetnek.



## 2.3. Az inzulin növekedési hormon jellegű hatásai mint a sejtmagban lezajló jelátviteli folyamatok egy példája

### 2.3.1. Inzulin hatásai a plazmamembránban

#### *Az inzulinreceptor szerkezete*

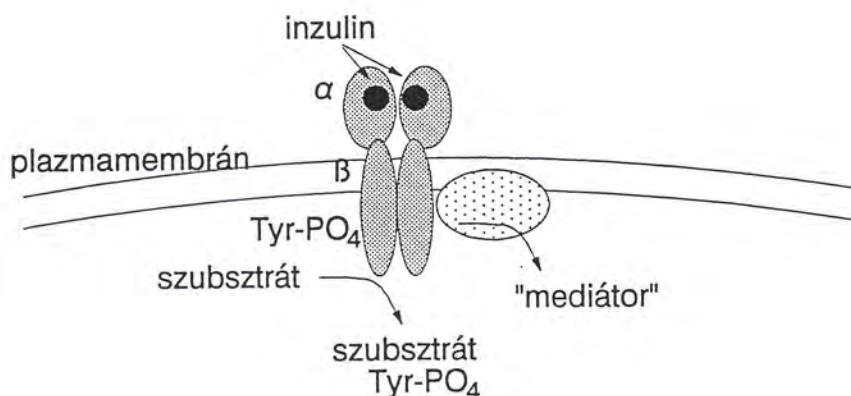
Csaknem ötven év telt el az inzulin tisztítása és a cukorbetegség leküzdésében való gyógyító alkalmazása után, amíg a hetvenes évek elején fény derült arra, hogy a hormon a plazmamembránban elhelyezkedő receptorához kötve fejti ki hatását (Freychet és mtsai, 1971; Cuatrecasas, 1972; Bliss, 1982). Az inzulinreceptor vázlatos szerkezetét és az inzulin hatásmechanizmusának két lehetséges módját a 13. ábrán mutatom be. Mint látható, az inzulinreceptor 2 alfa és 2 béta alegységből álló heterotetramer. Az extracelluláris alfa alegységek SH-csoportokban gazdag részletei felelősek az inzulin kötéséért, a béta alegységek tartalmazzák a receptor hidrofób, transzmembrán részeit és a más kinázokkal homológ szerkezetű tirozin kináz domaint (Kahn és White, 1988). Az alfa alegység erőteljesen glikozilált, a cukor oldalláncok pontos szerkezetét és szerepét azonban jelenleg még nem ismerjük (Zick, 1989). A béta alegységnek a plazmamembránhoz közeli régiója (juxtamembrán-domain) szerepet játszik az ATP kötésében és inzulinreceptornak más effektor molekulákkal/szubsztrátjaival való asszociációjában, kölcsönhatásában (White és mtsai, 1988/a; Backer és mtsai, 1991/a). A receptor C terminális részletében található tirozin oldalláncok mutációja segíti az inzulin proliferatív hatásait, aminek egyik magyarázata lehet, hogy ez a "lebegő" receptorrészlet is szerepet játszhat az inzulinreceptor más fehérjékkel való kölcsönhatásaiban (Takata és mtsai, 1991).

Az inzulinreceptorok keresztkötése antitestekkel, vagy lektinekkel fokozott aktivációjukhoz vezet (O'Brien és mtsai, 1987/c; Shiba és mtsai, 1990). A receptor-oligomerek kialakulása más növekedési faktorok, így az inzulin-szerű, vagy az epidermális növekedési faktor (IGF-1, EGF) receptorával is megvalósulhat, ami a különböző mediátorok által közvetített jelek keresztreakcióit teszi lehetővé (Lammers és mtsai, 1990; Soos és mtsai, 1990).

Az inzulin receptor bioszintézise során a receptor alfa és béta alegysége közös peptidlánc formájában képződik, amely többlépéses glikoziláció után a 720-723-as RKRR részletnél hasad el a két végső alegységre (Zick, 1989).

#### *Az inzulinreceptor kináz aktivitása és foszforilációja*

Az inzulinreceptor izolálása után több mint tíz évvel, 1982-ben fedezték fel, hogy a receptor tirozin kináz aktivitással bír (Kasuga és mtsai, 1982). Az inzulin receptorhoz való kötődése után a receptor-kináz aktiválódásának egyik első eleme a receptor autofoszforilációja a juxtamembrán domain-hoz, a C-terminálishoz és a katalitikus domain 1146-1150-1151 triádjához tartozó tirozin oldalláncokon (White és mtsai, 1988/b). A receptor egy allosztérikus enzimként viselkedik, amelynek béta alegységében lévő kináz aktivitását az alfa alegység (feltehetően a béta alegység extracelluláris részével kölcsönhatásban) inzulin távollétében általános gátlás alatt tartja (Shoelson és mtsai, 1988; Gherzi és mtsai, 1989).



13. ábra Az inzulinreceptor vázlatos szerkezete és az inzulin hatásmechanizmusának két lehetséges iránya (Kahn és White, 1988 után)

Az inzulinreceptor-kináz aktivitását jelenlegi ismereteink szerint is ezer és egy körülmény befolyásolja. Ezek vázlatos összefoglalására a 18. táblázatban tesztek kísérletet. A befolyásoló tényezők egyikeként az aktiváció során (a receptor tirozin oldalláncokon megvalósuló auto-foszforilációja mellett) inzulin hatására a receptor szerin- és treonin-foszforilációja is megnő. Mind több eredmény utal arra, hogy ezen utóbbi folyamatokat több fehérje kináz együttesen katalizálja, beleértve magának az inzulin receptornak a Ser/Thr oldalláncokon megvalósuló autofoszforilációját is (Smith és Sale, 1988; Duronio és Jacobs, 1990; Pillay és Siddle, 1991; Rapuano és Rosen, 1991; Baltensperger és mtsai, 1992).

Bázikus polikationok (pl. poli-lizin) mind az inzulinreceptor-tirozin kináz, mind a receptorral asszociált szerin kináz aktivációjára képesek (Sacks és McDonald, 1988; Biener és Zick, 1990). Különböző fehérjék megváltoztatják az inzulinreceptor tirozin kináz szubsztrát-specifitását (Yonezawa és Roth, 1990), valamint leírtak a receptor-kinázt gátló fehérjéket és peptideket is (Auberger és mtsai, 1989; Hansen és mtsai, 1989). A fenti eredmények valószínűvé teszik, hogy az inzulin-receptor tirozin (és szerin-treonin) kináz aktivitását számos vele asszociált fehérje szabályozza *in vivo*. Ezen kölcsönhatások felderítése és jellemzése javarészt a jövő feladata.

Az inzulinreceptor "aktív", foszforilált formája foszfortirozin foszfatázok hatására alakul vissza a kezdeti, alapállapotba. Noha saját kísérleteink tanulsága szerint is a receptort *in vitro* szinte minden foszfortirozin-foszfatáz defoszforilálja, az *in vivo* defoszforilációban szerepet játszó foszfatázok azonosítása, pon-



## Szabályozó mechanizmus

## Irodalmi hivatkozás

## Aktiválás

receptor oligomerizáció

O'Brien és mtsai, 1987/c;  
Shiba és mtsai, 1990transzfoszforiláció más  
tirozin kinázzalLammers és mtsai, 1990;  
Soos és mtsai, 1990

poli-lizin

Sacks és McDonald, 1988

Ki-ras

Gatica és mtsai, 1987

foszfatidil-inozitol

Sweet és mtsai, 1987

## Gátlás

Ser/Thr foszforiláció

Takayama és mtsai, 1988

P-Tyr foszfatázok

Meyerovitch és mtsai, 1992

MHC-I peptidek

Hansen és mtsai, 1989

63 kDa gátlófehérje

Auberger és mtsai, 1989

GTP-kötő fehérje

Davis és McDonald, 1990;

Burdett és mtsai, 1990

N-ras, Ha-ras

O'Brien és mtsai, 1987/b

gangliozidok

Nojiri és mtsai, 1991

## 18. táblázat Az inzulinreceptor tirozin-kináz aktivitását szabályozó mechanizmusok

tos jellemzése eddig nem sikerült (Goldstein és mtsai, 1991; Sale, 1991). Faure és munkatársai (1992) egy, az endoszómákhoz kötött foszfortirozin-foszfatáz aktivitásról számoltak be, ami azt sugallja, hogy az inzulinreceptorok defoszforilációja a receptorok internalizációja során (is) lejátszódó folyamat. Saját kísérleteinkben inzulin hatására bizonyos membránkötött foszfortirozin-foszfatázok aktivitásának növekedését figyeltük meg, amely az inzulinreceptorok inzulin hatására végbemenő "ön-inaktivációjára" enged következtetni (Meyerovitch és mtsai, 1992).

Az inzulinreceptor aktivációja során foszforilálódó különböző tirozin oldallán-cok kicserélésével, elhagyásával keletkezett mutánsok könyvtárnyi irodalma nem igazán vezetett a kísérletezők reményei szerinti eredményekre, hogy t.i. rá lehessen mutatni bizonyos tirozin oldallán-cokra, amelyek foszforilációja az inzulin ilyen vagy olyan hatásaiért lenne felelős. Annak ellenére, hogy a kináz-aktivitásukban gátolt inzulinreceptor-mutánsok igen sok szempontból képtelenek az inzulin hatásai-nak közvetítésére (Kahn és White, 1988) szinte bizonyos, hogy az inzulin hatásainak legalább egy része a receptor-kinázt megkerülő útvonalon (is) végbemehet (Espinal, 1988; Soos és mtsai, 1989; Hawley és mtsai, 1989). A továbbiakban ezen útvonalak közül a plazmamembránt érintőeket fogom vázlatosan bemutatni. A tárgyalás során a GTP-kötő fehérjék szerepére, az inzulinnak a különböző foszfolipázok aktivitására, valamint a foszfatidil-inozitol/kalcium/fehérje kináz C metabolizmusra gyakorolt hatására és a Na-K ionok szerepére fogok kitérni.

*A GTP-kötő fehérjék szerepe az inzulin hatásmechanizmusában*

A GTP-kötő fehérjék és az inzulinreceptor jelenleg ismert kölcsönhatásait a 19. táblázatban foglalom össze. Mint látható, az inzulinreceptor és a GTP-kötő fehérjék kölcsönhatásaira utaló adatok meglehetősen sokrétűek és helyenként ellentmondásosak. E helyzet oka leginkább a kísérleti metodikákban kereshető. A permeabilizált sejteket, izolált membránokat, illetve többé-kevésbé pucolt inzulinreceptort használó kísérleti rendszerek egymással nehezen összehasonlíthatóak, a Gs és Gi fehérjék azonosítására használt kolera és pertussis toxin aspecifikus hatásai miatt, kellő kontroll kísérletek híján, veszélyeket rejt magában, végezetül pedig igen sok közleményben éppen azok a kísérletek hiányoznak, amelyek más irodalmi adatokkal való egybevetésüket lehetővé tennék. E limitációkat is figyelembe véve az a (minden bizonnyal elég szubjektív) kép alakult ki bennem, hogy az inzulinreceptor feltehetőleg három GTP-kötő fehérjével, a ras-sal, a Gi-vel és egy 60-66 kDa-os, eddig még nem teljesen jellemzett specifikus fehérjével áll kölcsönhatásban. (A Gs asszociációjára utaló adatok erősen megkérdőjelezhetők, ld. Burdett és mtsai, 1990.)

Hatás/GTP-kötő fehérje	Irodalmi hivatkozás
<i>Inzulin hatásai a GTP-kötő fehérjékre</i>	
in vitro foszforiláció/Gi,Gx, transzducin	Zick és mtsai, 1986; O'Brien és mtsai, 1987/a
in vivo foszforiláció/60 kDa Gx	O'Brien és mtsai, 1989
GTP-kötés fokozás/66 kDa Gx,Gs, Gi, Ha-ras	Srivastava és Singh, 1990; Kellerer és mtsai, 1991; Pröfrock és mtsai, 1991; Burgering és mtsai, 1991
ADP-ribosziláció csökkentés/Gs,Gi	Heyworth és mtsai, 1985; Rothenberg és Kahn, 1988; Pröfrock és mtsai, 1991
<i>GTP-kötő fehérjék hatásai az inzulinreceptorra</i>	
inzulinkötés csökkentés/40,66 kDa Gx	Srivastava és Singh, 1990; Davis és McDonald, 1990; Kellerer és mtsai, 1991
inzulinreceptor-kináz gátlás/ /Gx,N-ras,Ha-ras	O'Brien és mtsai, 1987/b; Davis és McDonald, 1990; Burdett és mtsai, 1990
inzulinreceptor-kináz aktiválás/ /Ki-ras	Gatica és mtsai, 1987

19. táblázat Az inzulinreceptor kölcsönhatásai GTP-kötő fehérjékkel Gi = adenilát cikláz gátló (pertussis toxin érzékeny) GTP-kötő fehérje; Gs = adenilát cikláz aktiváló (kolera toxin érzékeny) GTP-kötő fehérje; Gx = közelebbről meg nem határozott GDP/GTP-kötő fehérje; Ha-ras, Ki-ras, N-ras = Harvey-, Kirsten- és Normál- ras fehérjék



Az inzulinreceptor (talán a 60-66 kDa-os GTP-kötő fehérje kivételével) a GTP-kötő fehérjéket *in vivo* nem foszforiláció, hanem feltehetően direkt asszociációjukból következő konformációváltozás révén aktiválja. Az aktiválás hatására a Gi egy foszfatidil-inozitol-glikán specifikus foszfolipáz C aktiválásában és a sejtmagba transzlokálódva bizonyos magi folyamatokban vehet részt (ld. alább és 2.3.3. fejezet; Lutrell és mtsai, 1988; Crouch és mtsai, 1990). A ras fehérje az inzulin-függő fehérje kináz kaszkád elindításában (ld. 2.3.2. fejezet; Korn és mtsai, 1987; Deshpande és Kung, 1987; Burgering és mtsai, 1991; de Vries-Smith és mtsai, 1992) és a foszfatidil-kolin specifikus foszfolipáz C aktiválásában játszhat szerepet (de Herreros és mtsai, 1991). A 60-66 kDa-os, specifikus inzulin-függő GTP-kötő fehérje szerepéről pedig mindeztidáig semmit sem tudunk.

A GTP-kötő fehérjék aktiválódása az inzulinreceptor inzulin-kötésének csökkenéséhez és tirozin kináz aktivitásának gátlásához vezet (ld. 19. táblázat). Ez a hatás fontos szerepet tölthet be mind az inzulin kiváltotta jel terminációjában, mind pedig az egymással "rivalizáló" jelátviteli utak (ld. 13. ábra) keresztszabályozásában. A Ki-ras inzulinreceptor tirozin kinázt aktiváló hatásának jelentősége még nem tisztázott (Gatica és mtsai, 1987).

#### *Inzulin hatása a foszfatidil-inozitol-glikán specifikus foszfolipáz C-re*

Az inzulinreceptorhoz kötődő Gi fehérje egy speciális foszfolipáz C-t aktivál (Lutrell és mtsai, 1988). E foszfolipáz a plazmamembrán külső rétegében feldúsuló speciális glikolipideket, az ú.n. foszfatidil-inozitol-glikánokat hasítja el. Az enzimreakció diacil-glicerol és az extracelluláris térbe távozó foszfo-inozitid-glikánok keletkezéséhez vezet. Mivel számos extracelluláris fehérje (pl. alkalikus foszfatáz, 5'-nukleotidáz, lipoprotein lipáz, stb.) foszfatidil-inozitol-glikánokon keresztül köt a plazmamembránhoz, inzulin hatására ezen fehérjék, enzimek "elérésztése" és ezáltal aktiválása figyelhető meg (Saltiel és mtsai, 1986; Chan és mtsai, 1988/a; Romero, 1991). A felszabaduló foszfo-inozitid-glikánok egyik változata *chiro*-inozitolt tartalmaz és a piruvát dehidrogenáz aktiválásában vesz részt, a másik *myo*-inozitolt tartalmú és a cAMP-függő fehérje kinázt gátolja (Romero, 1991). Egyre nő azon *in vivo* és *in vitro* hatások listája, amelyeket ezen inzulinomimetikumok befolyásolni képesek. A fenti jelátviteli mechanizmus az extracelluláris térbe távozó foszfoinozitid-glikánoknak a sejt belsejébe juttatását lehetővé tevő transzporter létezésével is számol, amelyet azonban mind a mai napig kimutatni nem sikerült.

#### *Inzulin hatása a sejtek kalcium metabolizmusára*

A GTP-kötő fehérjék által "általában" regulált foszfolipáz C foszfatidil-inozitolt hasít diacil-glicerolra és inozitol-triszfoszfátra. Ezen utóbbi jelátvivő kalciumot szabadít fel a sejten belüli kalciumraktárakból. Az inzulinfüggő jelátvitel és a sejtek kalcium metabolizmusa között megfigyelt kölcsönhatások azonban meglehetősen ellentmondásosak.

Folyamat	Irodalmi hivatkozás
<i>Az intracelluláris kalciumszintet növelő folyamatok</i>	
Ca-ATP-áz gátlás	Pershadsingh és McDonald, 1979
foszfolipáz-C aktivitásnövekedés	Koepfer-Hobelsberger és Wieland, 1984; Farese és mtsai, 1986
<i>Az intracelluláris kalciumszintet csökkentő folyamatok</i>	
Ca-ATP-áz aktiválás	Hope-Gill és Nanda, 1979; Levy és mtsai, 1986; Nagy és mtsai, 1990
növekvő membránkötött kalcium	McDonald és mtsai, 1976
Na/Ca-csere rendszer aktiváció	Gupta és mtsai, 1986; Mene és mtsai, 1991

## 20. táblázat Inzulin hatása a sejtek kalcium metabolizmusára

Az extracelluláris kalcium jelenléte szükséges mind az inzulin kötéséhez (Desai és mtsai, 1978), mind a receptor-kináz aktivációjához (Plehwe és mtsai, 1983), mind pedig az inzulin sejten belüli hatásaihoz (Bonne és mtsai, 1978). A sejten belüli kalciumkoncentráció lecsökkenése ugyancsak meggátolja az inzulin metabolikus hatását (Pershadsingh és mtsai, 1987). A különböző munkacsoportok az intracelluláris kalcium szint emelkedéséről és változatlanságáról egyaránt beszámoltak inzulinkezelés hatására, sőt, inzulin képes volt a más agonisták által kiváltott intracelluláris kalciumkoncentráció növekedés meggátlására is (Thomas és mtsai, 1985; Cheung és mtsai, 1987; Klip és Ramlal, 1987; Draznin és mtsai, 1987). Az egyes közleményeket mérlegelve úgy tűnik, hogy a citoplazmatikus szabad kalciumkoncentráció nem sokat változhat inzulin hatására.

A sejten belüli szabad kalciumkoncentráció számos folyamat eredőjeként marad minden valószínűség szerint változatlan inzulinkezelés után. E folyamatokat a 20. táblázatban tüntettem fel. Az említett folyamatok közül a "szokványos" (foszfatidil-inozitol specifikus) foszfolipáz C aktivációja éppúgy vitatott, mint a sejten belüli Ca-szint inzulinfüggő változásai (Etindi és Fain, 1989). Inzulin hatására a sejten belüli kalciumraktárakból nem szabadul fel számottevő mennyiségű kalcium (Klip és Ramlal, 1987), ami ugyancsak a foszfatidil-inozitol specifikus foszfolipáz C aktiválódása ellen szól. A Ca-ATP-áz inzulinfüggő aktivitásváltozásai is laborfüggő jelenségnek tűnnek (ld. 20. táblázat).

### *Inzulin hatása a plazmamembrán lipid-összetételére*

Az eddig ismertett foszfatidil-inozitol-glikán specifikus foszfolipáz C mellett az inzulinreceptorhoz feltételezhetően a ras fehérjén keresztül egy foszfatidil-kolin specifikus foszfolipáz C (esetleg foszfolipáz D) is kapcsolódik (de Herreros és mtsai, 1991; Farese és mtsai, 1992; Baldini és mtsai, 1992). A foszfatidil-kolin reszintézisében fontos szerepet játszó foszfatidsav *de novo* szintézisét az inzulin a foszfo-inozitid-glikán segítségével aktiválja, ami az inzulinfüggő lipidmetabolizmus átfogó szabályozására utal (Farese és mtsai, 1992). Bizonyos kísérleti eredményekből arra lehet következtetni, hogy a foszfolipáz-C-k (D-k) mellett az inzulin egy foszfolipáz-A<sub>2</sub> enzim aktiválásában is szerepet játszik (Southorn és Palmer, 1990).



#### *Inzulin hatása a fehérje kináz C-re*

A fentiekben láhattuk, hogy inzulin hatására mind a foszfatidil-inozitol-glikán specifikus, mind pedig a foszfatidil-kolin specifikus foszfolipáz C aktiválódik. Mindkét enzim működésének közös terméke a diacil-glicerol, ami a fehérje kináz C egyik aktivátora. Mindezek ellenére a sejten belüli kalciumkoncentráció inzulinfüggő változásaihoz hasonló kusza helyzet uralkodik a fehérje kináz C inzulin hatására bekövetkező aktiválódása körül. A laboratóriumok kb. kétharmada az enzim aktiválódása mellett tör lándzsát, egyharmada ez ellen van (Egan és mtsai, 1990; Farese és mtsai, 1992). A különböző eredmények az egyes sejtípusok különbségei mellett néhány metodikai buktatóból akadhatnak, mint a nem megfelelő szubsztrátválasztás, a fehérje kináz C preparátum szennyezettsége az inzulin hatására növekvő mennyiségű diacil-glicerollal és a fehérje kináz C "down-regulációjára" szokásosan alkalmazott forbol-észter kezelés alkalmatlansága az enzim teljes "down-regulációjára" (Farese és mtsai, 1992). A fehérje kináz C ellenes antitestekkel végzett újabb vizsgálatok inkább az "aktiváláspártiak" igazát bizonyítják. A sejt kalciumszintjének inzulin hatására bekövetkező csekély, vagy elhanyagolható mértékű változásai érthetővé tesszik, hogy a fehérje kináz C izoenzimek közül leginkább a kalciumra nem érzékeny epsilon forma transzlokációját figyelték meg inzulinkezelés után (Heidenreich és mtsai, 1990; Ishizuka és mtsai, 1992).

Sokkal egyértelműbb eredmények támasztják alá az inzulin receptor fehérje kináz C által történő foszforilációját és inaktiválódását (Takayama és mtsai, 1988). Így a fehérje kináz C részt vehet az inzulinhatás terminációjában is.

#### *Inzulin hatása a $H^+$ , $Na^+$ és $K^+$ ionok koncentrációjára*

Inzulin hatására a kalcium ionokénál sokkal egyértelműbb változások zajlanak le az egyértékű kationok sejten belüli metabolizmusában. A  $Na^+$  ionok fokozott beáramlását legalább három mechanizmus segíti elő: inzulin aktivált kation-csatorna (McGeoch és Guidotti, 1992),  $Na^+/Ca^{2+}$ - és  $Na^+/H^+$ -exchanger (Mene és mtsai, 1991; Klip és mtsai, 1988). Az utóbbi két ioncsere-folyamat hozzájárul a sejten belüli kalciumkoncentráció csökkentéséhez (ld. 20. táblázat) és a sejt inzulin hatására bekövetkező alkalinizációjához is. A megnövekedett  $Na^+$ -influx ellenére a sejten belüli  $Na^+$  koncentráció feltehetően csak kismértékben változik inzulin hatására, hiszen a hormon a  $Na^+/K^+$ -ATP-áz alfa-2/béta-1 izoformáját egy eddig közelebbről meg nem határozott sejten belüli "pool"-ból a plazma-membránba juttatja, ami a sejtfelszíni  $Na^+$ -pumpa aktiválásához vezet. A  $Na^+/K^+$ -ATP-áz aktiválódásának hatására az inzulin által stimulált sejtek  $K^+$  felvétele is megnő (Hadden és mtsai, 1972; Omatsu-Kanbe és Kitasato, 1990; Hundal és mtsai, 1992).

### 2.3.2. Az inzulin kiváltotta jel lehetséges útjai a sejtmagig

Az inzulinreceptort a hormon kiváltotta jel két lehetséges úton képes elhagyni: vagy a receptor inzulinfüggő tirozin-kináz aktivitását felhasználva a tirozin-kináz szubsztrátjain keresztül terjed tovább, vagy a receptor konformációváltozását érzékelő effektorok (pl. a 2.3.1. fejezetben részletezett GTP-kötő fehérjék) segítségével fejt ki hatását (ld. 58. old., 13. ábra). Az alábbiakban először az inzulinreceptor tirozin kináz szubsztrátjainak szerepét foglalom össze a jelátviteli mechanizmusban, majd az inzulinfüggő fehérje kináz kaszkádot ismertetem, röviden kitérek a hormon citoplazmatikus ("metabolikus") hatásaira és a fejezet végén áttekintem a receptor internalizációjának szabályozását.

#### *Az inzulinreceptor tirozin kináz szubsztrátjai*

A közel egy évtizede folyó szorgalmas kutatások lassan de biztosan szinte minden szóbaejöhető fehérjéről bebizonyítják, hogy valamilyen körülmények között az inzulinreceptor szubsztrátjaként viselkedik. Sokkal nehezebb annak az eldöntése, hogy az adott fehérje vajon részt vesz-e az inzulinfüggő jelátviteli folyamatokban, vagy tirozin-foszforilációja csak véletlen egybeesés, esetleg a kísérletező rafinériáját bizonyító műtermék. Az eddig felderített szubsztrátok (szubsztrát-jelöltek) messze nem teljes listáját a 21. táblázatban adom meg.

Szubsztrát	Lehetséges szerep
<i>Fontosabb in vivo szubsztrátok</i>	
inzulinreceptor béta alegység	receptoraktiválás
IGF-I receptor	keresztaktiválás
pp185 (IRS-I)	PI-3-kináz kötés
pp180 (foszfortirozin-foszfataáz?)	szignál-termináció
pp120 (ekto-ATP-áz)	? (epesavtranszport?)
pp60 (GTP-kötő fehérje ?)	?
pp15 (zsírsav/Ca-kötő fehérje)	?
lipokortin 1	?
kalmomodulin (?)	Ca-affinitás-változás (?)
cAMP-foszfodiészteráz	cAMP-lebontás
<i>Fontosabb in vitro szubsztrátok</i>	
tubulin, fodrin	
klatrin	
progeszteron receptor	
GTP-kötő fehérjék	

21. táblázat Az inzulinreceptor szubsztrátjai (Beguinot és mtsai, 1988; Zick, 1989; Kasuga és mtsai, 1990; Formisano és mtsai, 1991; Goren és Boland, 1991; Goren és mtsai, 1991; Roth és mtsai, 1992; alapján) IRS I = inzulin receptor szubsztrát I; PI-3-kináz = foszfati-dil-inozitol-3-kináz



A 21. táblázatban természetesen nem tüntettem fel azokat a szerin/ /treonin oldalláncokon foszforilálódó fehérjéket, amelyek a későbbiekben ismertetett inzulin-aktivált fehérje kináz-kaszád működésének eredményeként változtatják meg foszforilációs állapotukat. Az táblázatban szereplő *in vivo* szubsztrátok többségét metodikai okokból molekulatömegük alapján nevezték el. Ez sok esetben zavarokhoz is vezet, hiszen különböző sejtekben az egyes szubsztrátok SDS-poliakrilamid gélen mutatott mozgékonyága más (így a "pp185" 155-től 190-ig bármi lehet), és az egyes "családok" (pp185, pp120, pp60) több, egymástól különböző fehérjét is tartalmaznak.

A 21. táblázat *in vivo* szubsztrátjai közül az első maga az inzulinreceptor béta alegysége. Mint a 2.3.1. fejezetben említettem, a receptor nagymértékű autofoszforilációja tirozin-kináz aktivitásának elengedhetetlen feltétele. Ugyancsak az előző fejezetben volt szó arról, hogy az inzulinreceptor más növekedési faktor receptorokkal, így pl. az inzulinszerű növekedési faktor (IGF-I) receptorral heterodimert képezhet. Ilyen esetben a receptorok keresztfoszforilációja is végbemegy.

Az inzulinreceptor szubsztrátjai közül a 185 kDa körüli molekulatömegűről (IRS-I) tudunk a legtöbbet. A fehérjét Sun és munkatársai (1991) klónozták és szekvenálták. Az IRS-I vizsgálata során kiderült, hogy a fehérje számos YXXM részletet tartalmaz, amely tirozinon foszforilált formában az SH2 (src tirozin kináz 2-es homológ) domain-t tartalmazó fehérjék kötésére alkalmas. Hasonló YXXM motívumokat a PDGF és más növekedési faktor receptorokban korábban már felfedeztek. Azokban az esetekben a foszforilált YXXM részletek a foszfolipáz-C-gamma, a GTP-áz aktiváló fehérje és a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI-3-kináz) megkötésére voltak alkalmasak. A kötött fehérjék ezáltal könnyen elérhetővé váltak a receptor-tirozin kináz számára, amely tirozinon foszforilálva aktiválta működésüket. Az inzulin receptor nem csak abban különbözik a többi növekedési faktor receptortól, hogy az YXXM motívumokat nem saját magán, hanem egyik legjelentősebb szubsztrátján hordozza, hanem abban is, hogy tartós asszociációt/ /tirozin foszforilációt és aktivációt a "szokásos" három fehérje közül csak a foszfatidil-inozitol-3-kináz mutat (Endemann és mtsai, 1990; Ruderman és mtsai, 1990; Lavan és mtsai, 1992; Yonezawa és mtsai, 1992; Backer és mtsai, 1992). Az inzulinreceptor juxtamembrán régiójának mutációi arra utalnak, hogy a pp185/PI-3-kináz komplex a receptor e régiójához kötődve vehet részt a jelátvitelben (Kapeller és mtsai, 1991). Pronk és munkatársai (1992) eredményei szerint a GTP-áz aktiváló fehérje is átmeneti, laza komplexet képezhet az inzulin receptorral. Az eddigi adatok a fenti két fehérjével szemben egyértelműen cáfolják a foszfolipáz C-gamma receptor/pp185-asszociációját, foszforilációját és aktivációját inzulin hatására. Ezek a megfigyelések összhangban vannak azzal, hogy az inzulin legfeljebb csak marginális változásokat okoz a "klasszikus" foszfatidil-inozitol anyagcserében és ezáltal a sejten belüli kalciumkoncentrációban. A PI-3-kináz pontos szerepe a jelátviteli mechanizmusokban nem ismeretes. Újabb adatok arra utalnak, hogy a ras fehérjével asszociált formában működő enzim a citoskeleton növekedési faktorok hatására bekövetkező változásainak egyik fontos kiindulási pontja lehet (Sjolander és mtsai, 1991).

A fentiekben ismertetett IRS-I "sztori" a 185 kDa körüli inzulinreceptor szubsztrátok "történetének" csak az első fejezete, hiszen Miralpeix és munkatársai (1992) egy második pp185-öt (IRS-II) is karakterizáltak és nemrégiben egy hasonló molekula-tömegű foszfortirozin foszfatázt is azonosítani sikerült (Goren és Boland, 1991; Formisano és mtsai, 1991).

A 21. táblázat számos kérdőjelet tartalmaz. A közelmúltban az inzulinreceptor szubsztrátok körül kibontakozott viták egyik legérdekesebbike a kalmodulin *in vivo* tirozin-foszforilációját vitatta. A fehérje *in vitro* foszforilációjához egy bázikus kofaktor (pl. poli-lizin) jelenléte szükséges, amely eddig ismeretlen *in vivo* változatának sejtípusától és esetleg más szignáloktól is függő elérhetősége magyarázhatja a kalmodulin *in vivo* foszforilációja során kapott eltérő eredményeket (Colca és mtsai, 1987; Fujita-Yamaguchi és mtsai, 1989; Blackshear és Haupt, 1989; Sacks és mtsai, 1992).

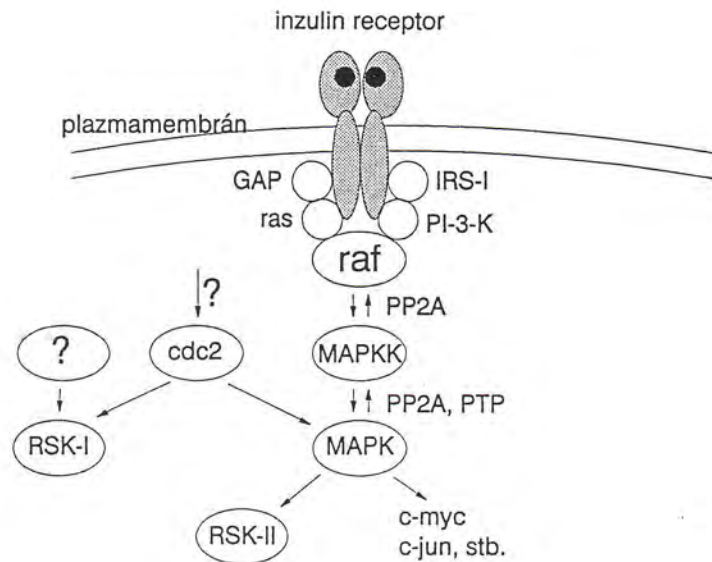
Összefoglalva megállapítható, hogy az inzulinreceptor szubsztrátjainak egyre növekvő családjában "még nem született meg a trónörökös", azaz egyelőre elég kevés fogalmunk van arról, hogy a különböző szubsztrátok pontosan milyen mechanizmussal járulnak hozzá az inzulinfüggő jelétviteli mechanizmusokhoz (ld. 21. táblázat kérdőjelei).

#### *Az inzulin által aktivált fehérje kináz kaszkád*

Az inzulin hatására végbemenő foszforilációs folyamatoknak a fentiekben ismertetett, közvetlenül az inzulinreceptor tirozin-kinázhoz kapcsolódó része csak elenyésző töredéke. A receptor hormonfüggő aktivációja egy fehérje kináz kaszkád aktivációjához vezet, amely felfedezése és részleges felderítése egyik oka volt annak, hogy 1992-ben az orvostudományi Nobel díjat Edwin Krebsnek és Edmond Fischernek ítelték oda.

Az inzulin által aktivált fehérje kináz kaszkád eddig felderített főbb elemeit a 14. ábrán mutatom be. Mint látható, az inzulinreceptorhoz kapcsolódó inzulin-receptor szubsztrát-I/foszfatidil-inozitol-3-kináz és a ras/ GTP-áz aktiváló fehérje komplexek, eddig pontosan fel nem derített mechanizmussal, együttesen vezetnek a raf kináz konformációváltozáson alapuló aktiválódásához. A raf kináz a mitogén aktivált protein kináz-kinázt (MAPKK) foszforilálja, amely ily módon aktiválódva hasonló mechanizmussal aktiválja a mitogén aktivált protein kinázt (MAPK-t). Ezen utóbbi enzimnek legalább négy különböző izoformája ismeretes, amelyek mind megnövekedett treonin/tirozin autofoszforilációra képesek a MAPKK által katalizált foszforilációjuk hatására. A MAPK centrális szerepet tölt be a jelátviteli folyamatokban. Tirozin-autofoszforilációjának felderítéséig ezt az enzimet hitték annak a "kapcsoló" (switch) enzimnek, amely a tirozin-kináz receptoroktól kapott direkt jelet (tirozin foszforilációt) szerin foszforilációvá alakítja (Seger és mtsai, 1991; Wu és mtsai, 1991). Mint a 14. ábra is mutatja, a helyzet az eddig megismert eredmények szerint némileg bonyolultabb. A MAPK az egyik (a 92 kDa-os) S6 kináz foszforilációja mellett közvetlenül vezet számos transzkripciósfaktor, így a myc és a jun foszforiláción alapuló aktiválásához (ld. 22. old. 4. táblázat). A MAP kináz a raf foszforilációjával segíti annak aktivációját, így egy pozitív visszacsatolással erősíti meg a kináz-kaszkád működésének fenntartását.





14. ábra Az inzulin által aktivált fehérje kináz kaszkád (de Vries-Smith és mtsai, 1992; Kyriakis és mtsai, 1992; Howe és mtsai, 1992, valamint Mukhopadhyay és mtsai, 1992 alapján) GAP = GTP-áz aktiváló fehérje; IRS-I = inzulin receptor szubsztát-I; PI-3-K = foszfatidil-inozitol-3-kináz; raf = raf kináz; PP2A = foszoprotein-foszfataz 2A; MAPKK = mitogén aktivált protein kináz-kináz; MAPK = mitogén aktivált protein kináz (másnéven erk -- extracelluláris szignál által regulált kináz); PTP = foszofotirozin-foszfataz; RSK-II = S6-kináz II (92 kDa); RSK-I = S6 kináz I (70 kDa)

A MAP kináz a MAP kináz-kináz mellett a cdc2 kináz is képes aktiválni (Thomas, 1992). A cdc2 kináz és más, eddig fel nem derített fehérje kinázok együttes foszforilációja vezet az I-es típusú S6 kináz (RSK-I, 70 kDa) pszeudoszubsztát-domain-ja által megvalósuló enzimgátlás alóli felszabadításához (Mukhopadhyay és mtsai, 1992). A sejtekben mindkét S6-os kináz időben kétfázisú aktivációja figyelhető meg (kb. 5-15 perc utáni maximummal és 60 perc körül kifejedő tartós hatással). A fehérje kináz C aktiválásához hasonlóan két hullámban megvalósuló aktiváció mechanizmusbeli különbségei nem ismeretesek (Szamel, 1992; Erikson, 1991).

Inzulin hatására a 14. ábrán bemutatottaknál jóval több szerin/treonin kináz aktivációja zajlik le. Sajnos a fennmaradó kinázok közül keveset jellemeztek annyira, mint pl. a kazein kináz II-öt, ahol az aktiváció feltehetően a foszfatidil-inozitol-glikán specifikus foszfolipáz C által felszabadított foszfoinozítid-glikánon keresztül valósul meg, így e kinázok beillesztése a fenti kaszkád-mechanizmusba ma még nem megoldható (Czech és mtsai, 1988; Alemany és mtsai, 1990).

A fehérje kináz kaszkád "kioltásáról" (az inzulin-okozta jel terminációjáról) mind foszfo-szerin(treonin), mind foszfo-tirozin támadáspontú foszfofehérje foszfátázok gondoskodnak. E foszfátázok némelyike inzulin hatására maga is aktiválódik, hatékonyan szolgálva a foszforiláción alapuló jel regulációját, illetve az S6-kinázoknál felfedezett bifázisos aktiváció kialakulását (Chan és mtsai, 1988/b; Meyerovitch és mtsai, 1992).

#### *Az inzulin hatásai a citoplazmában ("metabolikus" hatások)*

Értekezésem tárgykörétől egy kicsit távolabb esik az inzulin változatos citoplazmatikus hatásainak összefoglalása. Mégis, a terület fontossága miatt úgy éreztem, hogy nem tehetem meg, hogy legalább vázlatosan ne ejtsék szót az inzulin ezen hatásairól, amelyek a hormon élettani jelentősége és a cukorbetegség etiológiája szempontjából kulcsfontosságúak.

Inzulin hatására számos transzportfolyamat, így pl. az előző fejezetben ismertetett iontranszport, az aminosavtranszport és a cukortranszport aktiválódik. A fentiek mellett jónéhány, az intermediér anyagcsere szempontjából kulcsfontosságú enzim, így pl. a glikogén szintáz, a hormon szenzitív lipáz, a piruvát dehidrogenáz, az acetil-koenzim-A-karboxiláz és az ATP-citrát-liáz aktivitása módosul inzulinkezelés után. A hormon az intermediér anyagcsere módosításai mellett a fehérjeszintézis aktivációjára is képes (Rosen, 1987; Czech és mtsai, 1992).

#### *Az inzulinreceptor internalizációja*

A receptorok internalizációját ("down-regulációját") általában a receptorhatás extracelluláris szabályozásának egyik fontos elemeként szokták számon tartani. Az inzulin sejtmagbéli hatásaival foglalkozó fejezetben azért indokolt mégis e folyamat részletesebb tárgyalása, mivel az inzulin nukleáris hatásainak egy része minden bizonnyal a sejtmagba transzportálódó inzulin függvénye, az inzulinreceptorok internalizációja pedig az inzulin sejtmagba juttatásának mai ismereteink szerint kikerülhetetlen eleme (ld. még 2.3.3. fejezet).

Az inzulinreceptorok internalizációja két, egymástól részben független mechanizmussal folyik. Alapállapotban (kis -éhezési- inzulinkoncentráció) az internalizáció feltételezhetően a kaveolákon keresztül történik és nem igényel semmiféle különleges elemet a receptor szerkezetében. Inzulin hatására az internalizáció sebessége számottevően megnő, a többlet-internalizációért egy burkos vezikulákat (coated pit) igénybevevő aktív folyamat felelős, amely igényli az inzulinreceptor autofoszforilációját és a béta alegység érintetlen juxtamembrán domain-jét (Backer és mtsai, 1991/b; Rothberg és mtsai, 1992). A receptorok internalizációját keresztükötésük is elősegíti, feltételezhetően az első, kaveolákat "használó" folyamat aktiválásával (Knutson, 1991; Rothberg és mtsai, 1992).

Az endoszómákban a savasodó pH hatására az inzulin disszociál és egy SH-proteáz közreműködésével javarészt elemésződik. A receptorok jelentős részét "üres" állapotban a sejt a plazmamembrán felszínére juttatja vissza. Az inzulinreceptorok másik fele (a félig lebontott inzulinnal együtt) a lizoszómális fehérjelebontás "áldozata" lesz. Az internalizáció kezdeti szakaszában a "töltött" receptor aktív tirozin kinázként viselkedik, amely fontos eleme lehet az inzulinreceptor sejten belüli szubsztátjai foszforilálásának (Knutson, 1991). A sejtmagba jutó inzulin endoszómákból való "megszökésének" mechanizmusa jelenleg még nem ismeretes.



### 2.3.3. Inszulin hatásai a sejtmagban

#### *Inszulin a sejtmagban*

Először Lee és Williams (1954) számoltak be arról, hogy radioaktívan jelölt inzulin a mikroszómafrakción kívül májsejtek sejtmagjában is megtalálható. Kezdeti eredményeik után a hetvenes évek második felétől kísérletek egész sora bizonyította, hogy az inzulin eljuthat és nagy valószínűséggel el is jut a sejtmagba (Horvath és mtsai, 1975; Goldfine és Smith, 1976; Goldfine és mtsai, 1977/a, 1978; Vigneri és mtsai, 1978; Lolait és Toh, 1980; Smith és Jarett, 1987; Peralta-Soler és mtsai, 1989; Thompson és mtsai, 1989; Smith és Jarett, 1990; Harada és mtsai, 1992). Az inzulin sejtmagbéli elhelyezkedéséről alkotott kép a fenti nagyszámú adat ellenére sem teljesen egyértelmű, ugyanis pl. Carpentier és munkatársai (1979) nem találtak számottevő jelzett inzulint a sejtmagban.

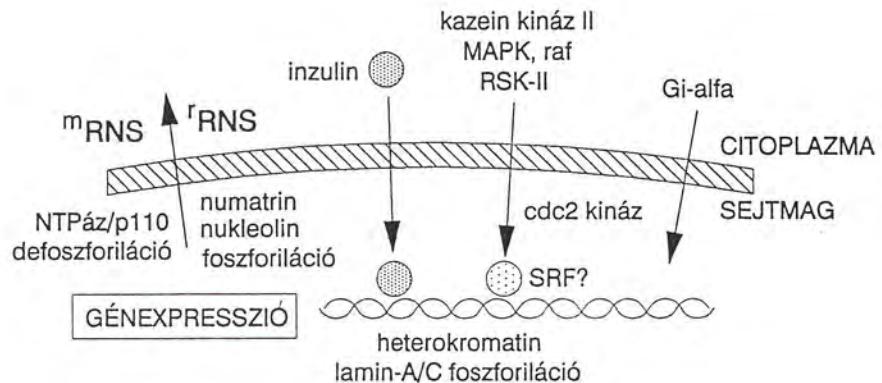
Az inzulin útja a sejtmagig nem ismeretes. Podlecki és munkatársai (1987) eredményei ellenére, akik az inzulinreceptornak a sejtmagba jutását mutatták ki izolált hepatocitákon nem valószínű, hogy a plazmamembránéhoz hasonló inzulinreceptorok eljutnának a sejtmagba (Goldfine és mtsai, 1977/b; Peralta-Soler és mtsai, 1989). Az inzulin felvétele mind receptormediáltan, mind pedig fluidfázisú endocitózis révén megvalósulhat. Az inzulin útját a citoplazmán keresztül valószínűleg több, egymással kompetáló, a lizoszómákat elkerülő, de a Golgi-rendszert részben érintő folyamat segítheti (Smith és Jarett, 1990; Harada és mtsai, 1992). A sejtmagba jutott inzulin nagy affinitású, fehérjetermészetű kötőhelyei a sejtmag mátrixához, a heterokromatinhoz asszociáltak (Vigneri és mtsai, 1978; Peralta-Soler, 1989; Thompson és mtsai, 1989).

A sejtmagba jutott inzulin hatásai egyelőre nem tisztázottak. Miller (1988) és Lin és munkatársai (1992/b) adatai szerint a nukleáris inzulin *közvetlenül* részt vesz az RNS-szintézisének aktiválásában, a génexpresszióban. Az idézett két kutatócsoport adatai azt a feltételezést valószínűsítik, hogy az inzulin nem (csak) a plazmamembrán-receptor aktiválásán keresztül szabályozza a génexpressziót, hanem a szteroidhormonokhoz hasonlóan transzkripciós faktorként, illetve transzkripciós faktort aktiváló anyagként is működik. Az inzulin hatására a sejtmagban lezajló folyamatokat a 15. ábrán foglalom össze.

#### *Inszulin hatásai a sejtmag transzportfolyamataira*

Inszulin hatására megnő a sejtmag pórusain keresztül a makromolekula (dextrán) transzport (Jiang és Schindler, 1986; 1988; Schindler és Jiang, 1987; Peralta-Soler és mtsai, 1992). A jelenség pontos mechanizmusa egyelőre nem ismeretes.

Többet tudunk az inzulin RNS-transzportot stimuláló hatásáról. Ahogy azt már a 15. oldalon említettem, az mRNS transzport szabályozásának fő eleme a 40 kDa-os nukleozid-trifoszfátázból (NTP-áz) és a 110 kDa-os poli-A felismerő fehérjéből (p110) álló transzport-komplex, amelyet egy eddig nem azonosított sejtmagbéli fehérje foszfátáz aktivál. A foszfátáz aktivitása --és így az mRNS transzport sebessége-- inzulin hatására megnő (Purello és mtsai, 1983; Schröder és mtsai, 1987; 1990).



15. ábra **Inzulin hatásai a sejtmagban** (Purello és mtsai, 1983; Schröder és mtsai, 1987; 1990; Friedman és Ken, 1988; Miller, 1988; Peralta-Soler, 1989; Crouch, 1991; Feuerstein és Randazzo, 1991; Lin és mtsai, 1992/b; Csermely és Kahn, 1992; valamint Csermely és mtsai, 1993/b; nyomán) NTPáz/pp110 = mRNS-transzport rendszer; MAP kináz = mitogén aktivált fehérje kináz; RSK-II = 92 kDa S6 kináz; Gi = pertussis toxin érzékeny adenilát cikláz gátló GTP-kötő fehérje

Saját eredményeink szerint (ld. 5.3.3. fejezet) inzulin kis koncentrációkban a nukleolin foszforilációját és ezzel párhuzamosan a (minden valószínűség szerint) rRNS transzport indukcióját okozza (Csermely és mtsai, 1993/b). Így az inzulin a sejtmagon belül feltételezhetően sztérikusan elválasztott, fehérjék foszforilációját és defoszforilációját igénylő folyamatokkal az rRNS és az mRNS transzportját egyaránt megnöveli (ld. részletesebben 6.4. fejezet).

#### *Inzulin hatásai a sejtmagbéli fehérje foszforilációra*

Folyamatosan növekszik azoknak az inzulin hatására a sejtmagban foszforilálódó fehérjéknek a száma, amelyeket azonosítani is lehetett. Az ismert fehérjék listájába jelenleg a lamin, numatrin, nukleolin és jónéhány kettősszalú DNS-hez kötődő fehérje tartozik (Friedman és Ken, 1988; Feuerstein és Randazzo, 1991; Suzuki és mtsai, 1991; Csermely és Kahn, 1992; Csermely és mtsai, 1993/b).

Inzulin hatására egy soklépéses fehérje kináz kaszkád aktivációja figyelhető meg (ld. 14. ábra). A szerepet játszó kinázok közül a kazein kináz II, a MAP kináz, a 92 kDa-os S6 kináz és a cdc2 kináz számottevő mennyiségét mutatták ki a sejtmagban (Krek és mtsai, 1992; Sanghera és mtsai, 1992; Pelech és Sanghera, 1992; Chen és mtsai, 1992; Riabowol és mtsai, 1989; Bailly és mtsai, 1989); a kazein kináz II, a



MAP kináz a 92kDa-os S6 kináz (RSK-II) és a raf pedig aktivációjuk után a sejtmagba rendeződnek át (Cochet és mtsai, 1991; Chen és mtsai, 1992; Blenis, 1991; Pelech és Sanghera, 1992; Rapp és mtsai, 1988). A fenti eredményeket a 14. ábrával összevetve látható, hogy az inzulin által aktivált kináz-kaszád szinte minden eddig felderített tagja a sejtmagban is előfordul, illetve inzulin hatására oda bejut. Nagy valószínűséggel megjósolható, hogy a lánc hiányzó "darabjainak", a MAP-kináz-kináz-nak, illetve a 70 kDa-os S6 kináznak (RSK-I) a sejtmagbeli lokalizációja, illetve a sejtmagba való transzlokációja rövid időn belül bizonyítást fog nyerni. Mivel a transzlokálódó kinázok legtöbbje nukleáris lokalizációs szignált nem tartalmaz, a sejtmagba jutásuk mechanizmusa felderítetlen folyamat. Ugyancsak nem ismert, hogy vajon a raf kináz-e az inzulinreceptorról kiinduló szignál-kaszád első tagja, amely bejut a sejtmagba. Ebből a szempontból figyelemre méltó Crouch-nak (1991) az a megfigyelése amely szerint inzulin hatására a pertussis toxin érzékeny Gi fehérje alfa alegysége is a sejtmagba rendeződik át.

A fehérjefoszforilációs folyamatokat a kinázok mellett foszfofehérje foszfatázok is szabályozni képesek. Purello és munkatársai (1983) megnövekedett sejtmagbeli foszfofehérje foszfatáz aktivitásról számoltak be inzulinkezelés után. Az indukálódó enzimaktivitás legesélyesebben az inzulinfüggő foszfofehérje-foszfatáz 1-től származik, amelynek számottevő mennyiségét sikerült a sejtmagban is kimutatni (Chan és mtsai, 1988/b).

A fenti változások esetében nem minden esetben tisztázott az a kérdés, hogy a különböző enzimek aktiválódása a plazmamembránban helyet foglaló inzulin receptorról induló kaszkádfolyamat egyik végállomása, vagy a sejtmagba került inzulin "direktebb" hatásának következménye. Könnyen elképzelhető, hogy a következő évek kutatásai e két folyamat egymást kiegészítő és szabályozó szerepét fogják feltárni.

#### *Inzulin hatásai a génexpresszióra*

Inzulin hatására a már eddig megismertek közül is több tucat gén indukciója, vagy expressziója valósul meg (O'Brien és Granner, 1991). Az elmúlt években számos olyan génszekvenciát sikerült felismerni, amely az inzulinfüggő génexpresszióért felelős. Így a közelmúltban a fos, a foszfoenolpiruvát karboxikináz, a glicerinaldehidfoszfát dehidrogenáz és a glukagon gének inzulin-érzékeny szakaszát határozták meg (ld. 22. táblázat). A táblázatból látható, hogy a minimális konszenzus szekvencia a G(c)GCCTG(c) hexamer, amely mind az inzulin által indukált, mind pedig a represszált gének promoter régiójában megtalálható. Ebből az a következtetés is levonható, hogy (a szteroidreceptorhoz hasonlóan) az inzulin feltehetően ugyanannak a transzkripciósfaktornak a segítségével fejt ki ellentétes hatásokat különböző gének expressziójára. A fenti inzulinfüggő génszakasz egy sor más, inzulin által indukált, vagy gátolt gén promoter régiójában is megtalálható (Nasrin és mtsai, 1990; O'Brien és Granner, 1991).

Gén	Szekvencia	Irodalmi hivatkozás
<i>Indukció</i>		
fos	ATGGCCATATTAGGACATC	Stumpo és mtsai, 1988
GAPDH	GAGGCCTCAGG	Nasrin és mtsai, 1990
<i>Represszió</i>		
PEPCK	TGGTGTTTTG	O'Brien és mtsai, 1990; 1991
glukagon	CAGGCCTGACTG	Philippe, 1991

22. táblázat **Inzulin specifikus aktiváló szakaszok különböző gének promoter régióiban** PEPCK = foszfoenolpiruvát karboxikináz; GAPDH = glicerinaldehidfoszfát dehidrogenáz

Az előzőekben ismertetett sejtmagbéli foszforilációs folyamatok nagy szerepet játszhatnak az inzulin által szabályozott transzkripció faktorok aktiválásában (ld. 4. táblázat, 22. old.). Sajnálatos módon ilyen transzkripció faktorok megbízható azonosítása mind a mai napig nem sikerült. Mivel az inzulin-érzékeny génszakasz központi, konszenzus eleme a fos gén promoter szakaszának szérum válasz elemével (SRE) egybeesik, az inzulin által indukálható transzkripció faktorok egyik jelöltje mindenképpen a szérum response faktor (SRF). Az SRF szerepe az inzulinválaszban annál is valószínűbb, mivel DNS-kötése az inzulin által aktivált kazein kináz II hatására megnő (Gauthier-Rouviere és mtsai, 1991; Cochet és mtsai, 1991; Marais és mtsai, 1992). Nasrin és munkatársai (1990) valamint Prager és munkatársai (1990) gel-shift assay segítségével az inzulin-érzékeny génszakaszhoz kötő nukleáris fehérjét (fehérjéket) tudtak kimutatni. A fehérje (fehérjék) molekulatömege a növekedési hormon promotere esetén 70-80 kDa körüli volt (Prager és mtsai, 1990). Az inzulin-függő génexpresszió szabályozásának gyökeresen új mechanizmusát teszik valószínűvé Lin és munkatársainak (1992/b) eredményei, akik szerint az inzulin a sejtmagba jutva, transzkripció faktorként, vagy transzkripció faktort módosító tényezőként *direkt* módon is szabályozza az inzulinfüggő gének expresszióját.

### 2.3.5. Az inzulin sejtmagra gyakorolt hatásainak orvostudományi vonatkozásai

Az inzulin hatásmechanizmusának zavarával kapcsolatos leggyakoribb megbetegedés, az inzulin-rezisztencia és ezen belül a nem inzulinfüggő diabetes mellitus (non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) káros hatásainak egymáshoz viszonyított jelentősége sem tisztázott mind a mai napig (ld. McGarry, 1992). Még kevesebbet tudunk a betegség számos formájának okairól. Az eddigi megfigyelések valószínűvé teszik, hogy Murphy törvényének egy szomorú változata az NIDDM-re is alkalmazható: "ami az inzulin hatásmechanizmusában elromolhat, az el is romlik". (Tegyük hozzá: az emberiség szerencséjére nem egyszerre.) A disszertáció formai követelményei (meghatározott hossza) miatt engedtessek meg, hogy az NIDDM szerteágazó kóroktanából az alábbiakban csak azokat a biokémiai is értelmezhető elemeket ismertessem, amelyek az inzulin sejtmagbéli hatásaival valamilyen módon összefüggésbe hozhatóak (ld. 23. táblázat).



<i>Inzulinreceptor/receptor kináz</i>	
inzulin/inzulinreceptor ellenes	
autoantitestek	Becker és Roth, 1990
hibás inzulinreceptor-processzálas	Becker és Roth, 1990
csökkent inzulinkötés	Becker és Roth, 1990
inzulinreceptor-kináz deficiencia	Zick, 1989; Becker és Roth, 1990
megnövekedett foszfortirozin-	Boylan és mtsai, 1992;
foszfatáz aktivitás	Meyerovitch és mtsai, 1989
<i>Inzulinreceptorhoz kapcsolt hatások</i>	
Gi fehérje zavara	Gawler és mtsai, 1987
csökkent chiro-foszfoinozítid-	Kennington és mtsai, 1990
glikán szekréció	
<i>Inzulin/inzulinreceptor processzálas</i>	
csökkent receptor internalizáció	Becker és Roth, 1990
megnövekedett inzulin-degradáció	Becker és Roth, 1990
csökkent receptor reciklizáció	Kadowaki és mtsai, 1990
csökkent sejtmagbéli inzulinkötés	Goidl, 1979

23. táblázat Az inzulin sejtmagra gyakorolt hatásainak lehetséges zavarai nem inzulinfüggő diabetes mellitusban

A 23. táblázatban feltüntetett különböző mechanizmusbeli zavarok különböző betegségtípusokban, sőt különböző betegekben is másként fordulnak elő. Ugyanazon beteg esetén az egyes folyamatok "elromlásának" aránya mind szövetről szövetre, mind pedig a betegség különböző periódusaiban ugyancsak különböző (Zick, 1989; Becker és Roth, 1990). A táblázatban összefoglalt adatokból látható, hogy az inzulinreceptornak a (hasznos) mennyisége és/vagy kináz aktivitása egyaránt lecsökkenthet az NIDDM különböző formáiban. Ez a inzulinreceptor tirozin kináz szubsztátjainak csökkent foszforilációján keresztül gátolhatja a receptor-asszociált kináz kaszkád aktiválódását és ezáltal a sejtmagbéli fehérje foszforilációt, valamint zavarokat okozhat az inzulinreceptor konformációs változásaiban, amelyek más jelátviteli utak gátlását okozhatják.

Ezen utóbbi, az inzulinreceptor konformációváltozásaitól függő jelátviteli folyamatok zavarára "jó" példa a sejtmagba is átrendeződő Gi fehérje diszfunkciója, valamint a feltételezhetően a sejtmagbéli kazein kináz II aktiválásában is szerepet játszó *chiro*-foszfoinozítid-glikán NIDDM-ben lecsökkent mennyisége.

A sejtmaghoz direkt módon kötődő inzulinnak a jelátviteli folyamatokban betöltött jelentőségére utal az is, hogy keletkezése feltételezett mechanizmusának bármilyen zavara esetén az NIDDM valamilyen formájának megjelenése valószínűsíthető.

### 3. Célkitűzések

A sejtmagban lezajló folyamatok szabályozásában a citoszolban megszokott elemeken (kompetitív és allosztérikus kölcsönhatások, poszttranszlációs módosítások, enzimkomplexek, stb.) túl két alapvetően új mechanizmus is jelentkezik: a szabályozásban részt vevő molekulák elérhetősége (transzportja) és a sejtmag hihetetlenül komplex, háromdimenziós rendezettségéből fakadó szabályozási lehetőségek. Az értekezésben bemutatott kísérletekben e folyamatok szerepét vizsgáltuk a sejtmag jelátviteli rendszereiben.

Az eukarióták nagy evolúciós előnyeinek egyike, hogy a fehérjeszintézis a DNS replikációjától és transzkripciójától elkülönítetten megy végbe. Így mód nyílik arra, hogy e folyamatok egymást a működésükhöz szükséges molekulák (RNS, illetve hisztonok és transzkripció faktorok) elérhetőségével, a sejtmagmembránon keresztül történő transzportjával kölcsönösen szabályozni tudják. A sejtmagmembrán lehetőséget teremt arra is, hogy kisebb molekulák (ionok, glutathion, stb.) egyenlőtlen eloszlásával a sejt más körülményeket teremtsen a sejtmagon belül, mint a körülölelő citoplazmában (ld. 2.1. fejezet). Kísérletes munkámban ezek közül a kétértékű fémek megoszlását és az RNS transzportját vizsgáltam részletesebben.

A sejtmagot a citoplazmától leginkább a benne összezsúfolt makromolekulák kompaktsága különbözteti meg. A citoplazmához képest a sejtmagban nincs hely (egyedül a fehérjekoncentráció mintegy 200 mg/ml-es), így mind a transzkripció, mind a replikáció szabályozásában az elemi részfolyamatok térbeli rendezettsége különös jelentőséget kap. A "helyspórolás" és a védelem végett a DNS-t és (kisebb mértékben) az RNS-t "össze kell csomagolni". A replikáció és a transzkripció során az egyes szerkezeti elemek folyamatos "ki- és becsomagolása" zajlik le az eukarióta sejtekben. Könnyen belátható, hogy ezekben a folyamatokban a makromolekulák korrekt elhelyezkedését segítő molekuláris chaperonok aktivitására még a citoplazmában tapasztalhatónál is nagyobb szükség van (ld. 2.2. fejezet). A sejtmag molekuláris chaperonjai közül a laminnal, a nukleolinnal és a 90 kDa-os hő-sokk fehérjével foglalkoztam.

Amennyiben szabályozási folyamatokat kívánunk vizsgálni, legtöbbször az eredeti egyensúly megzavarása után beálló változásokat követjük nyomon. Az értekezésben összefoglalt kísérletek során két olyan "zavaró hatást" (a fehérje kináz C-t aktiváló forbol észtert és az inzulint) választottam, amely közismerten mélyreható változásokat okoz a sejtmagban.



Az előzőekben leírtakból kiindulva az elmúlt években folytatott és jelenlegi kutatásainkban az alábbi két kérdésre kerestük/keressük a választ:

1. Mi szabályozza a sejtmag transzportfolyamatait, ezen belül különösen az ionok- és az RNS transzportját? (ld. 5.1. és 5.3.3. fejezetek)
2. Hogyan járulnak hozzá a sejtmag molekuláris chaperonjai a sejtmagbeli jelátviteli folyamatokhoz? (ld. 5.2. és 5.3. fejezetek)

Kutatásaink jelen fázisában a sejtmag transzportfolyamatai közül a kétértékű fémek megoszlásával és az rRNS transzportjával foglalkoztunk részletesebben. A szóba jöhető molekuláris chaperonok (hő-sokk fehérjék, hiszton-kötő fehérjék, RNS-kötő fehérjék, DNS-kötő fehérjék, ld. 2.2.2. fejezet) közül pedig az eddigiekben a saját kutatási eredményeink előtt biokémiaiul kevésbé jellemzett 90 kDa-os hő-sokk fehérjét, valamint a nukleolint és a lamin A/C-t szerepét és szabályozását vizsgáltuk.

Az értekezésben leírt kísérletek *módszertanilag* leginkább a fehérjefoszforyláció köré csoportosíthatók. A fehérjék foszforylációs módosításai talán a legelterjedtebb szabályozó mechanizmust jelentik a sejtben belül. A sejtmagbeli fehérjefoszforyláció vizsgálata szervesen egészíti ki azokat a nagy intenzitással folyó kutatásokat, amelyek a fehérje kináz C sejtmagba való transzlokációjának felfedezése után, valamint a növekedési hormonok (EGF, PDGF, inzulin, stb.) által aktivált fehérje kináz kaszkád sejtmagbeli elemei kimutatásával párhuzamosan beindultak.

Célkitűzéseink egy "tradicionális" (transzportfolyamatok) és egy gyökeresen új (sejtmagbeli molekuláris chaperonok) kutatási irány köré csoportosulnak. Mindkét megközelítés számos olyan eredménnyel szolgált és szolgálhat az elkövetkezendőkben, amely közelebb vihet minket a sejtmag legalapvetőbb folyamatai, a replikáció és a transzkripció szabályozásának pontosabb megértéséhez.

A 2.2.5, valamint a 2.3.5. fejezetekben vázlatosan összefoglaltam a hő-sokk fehérjéknek (molekuláris chaperonoknak), valamint az inzulin sejtmagbeli hatásainak eddig feltárt orvostudományi jelentőségét. E kiragadott példák is bizonyítják, hogy a célkitűzéseinkben megfogalmazott kutatási irányok nagymértékben segíthetik számos kóros elváltozás, így a fertőzésekkel, mérgezésekkel, hypoxiával, rákos elváltozásokkal és az öregedéssel együttjáró zavarok, valamint a nem inzulinfüggő diabetes mellitus etiológiájának megértését és --reményeink szerint-- korrekcióját.

## 4. A felhasznált vizsgálati módszerek összefoglalása

Bevezetésképpen elnézést szeretnék kérni az olvasótól, hogy az egyes felhasznált módszerek részletes leírását az itt következő fejezetben nem ismétlem meg, mivel azok a mellékletként csatolt közleményekben megtalálhatóak. (A kísérleteket összefoglaló 5. részben az egyes "receptek" mellékletbeli helyét pontról pontra jelölni fogom.) A módszerekkel foglalkozó fejezetben a receptúrák helyett inkább az egyes módszerek beállítása során szerzett tapasztalatainkról, az adott módszer kiválasztásának okáról, a vizsgálati módszer előnyeiről és hátrányairól szeretnék egy rövid összefoglalást adni. Az alábbiakban az egyes módszereket a tárgyalás egységének megőrzése céljából *jellegük* (biokémiai, sejtbiológiai és analitikai) szerint csoportosítottam. Amellett, hogy a tudomány interdiszciplinárizálódásának korában egy ilyen csoportosítás természetszerűleg csak önkényes lehet, az 5. részben található kísérletekhez tartozó módszerek "összevadászását" e csoportosítás megnehezítheti. Az ebből fakadó esetleges kényelmetlenségekért újólág az olvasó elnézését kérem.

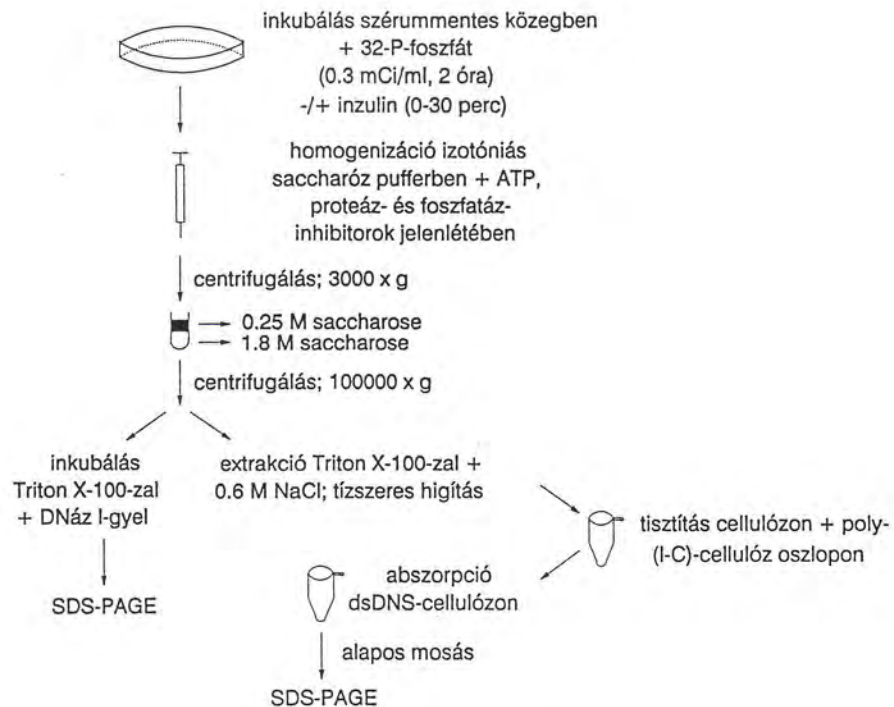
### 4.1. Biokémiai módszerek: sejtfrakcionálás, fehérjeizolálás, fehérjefoszforiláció, fehérje kináz aktivitás vizsgálata, foszfoaminosav-analízis, immunprecipitáció, immunoblot

#### *Sejtfrakcionálás*

A sejtmaggal foglalkozó biokémiai vizsgálatoknak talán legkritikusabb pontja a sejtmag megbízható elkülönítése a sejt többi részétől. Mivel a sejtmag mind az endoplazmatikus retikulummal, mind pedig az intermediális filamentumokkal szoros kapcsolatban áll (ld. 2.1.1. fejezet), ezt a feladatot maradéktalanul megoldani sajnos nem lehet. A biokémikus ilyenkor ésszerű kompromisszumot kénytelen kötni, amely az esetek többségében (így az ismertetett vizsgálatok során is) a markerenzimekkel és elektronmikroszkóposan jellemzett sejtmagpreparátum 5-10 %-os szennyezettségét jelenti (ld. Csermely és Kahn, 1992; melléklet 31. oldal).

Tapasztalataink szerint a kis kiterjedésű endoplazmatikus retikulummal (nagy sejtmag/citoplazma aránnyal) rendelkező sejtek, így pl. a timociták esetén a differenciálcentrifugáláson alapuló sejtmagfrakcionálás a fenti kritériumok szerint "elegendően tiszta" preparátumot eredményez (ld. Csermely és mtsai, 1987/b; melléklet 11. oldal). Kiterjedt citoplazmatikus organellumokkal rendelkező sejtek (pl. hepatociták, adipociták) esetén Blobel és Potter (1966) módszerét követve, legalább még egy tisztítási lépést, a sejtmagok nem folyamatos cukorgradiensén keresztüli ülepítését alkalmazni kell ahhoz, hogy a fenti kritériumoknak megfelelő tisztaságú sejtmagpreparátumhoz jussunk (Csermely és Kahn, 1992; melléklet 31. oldal).





16. ábra DNS-kötő foszfofehérjék izolálásának vázlatos menete (Alberts és Herrick, 1971; valamint Lee és mtsai, 1988 alapján; ld. Csermely és Kahn, 1992; melléklet 31. oldal)

#### Fehérjeizolálás

A kísérleteinkben alkalmazott 90 kDa-os hő-sokk fehérjét (hsp90) Yonezawa és munkatársai (1988) által leírt módszer szerint tisztítottuk (ld. Csermely és Kahn, 1991; melléklet 16. oldal). A módszer nagy előnye, hogy felhasználva a hsp90 hidrofób sajátosságait már az első két (butil- Sepharose-t és DEAE-cellulózt alkalmazó) oszlopkromatográfiával igen tiszta termékhez lehet jutni. Segítségével egy patkány májából 5-10 mg, 90-95 %-nál tisztább hsp90 nyerhető, amely nem csak a biokémiai, hanem az anyagigényesebb analitikai és biofizikai vizsgálatokra is elegendő.

Az inzulin hatására bekövetkező sejtmagbeli fehérjefoszforiláció vizsgálatára a szokásos analitikai módszerek (pl. SDS-PAGE) a foszforilálódó fehérjék nagy száma miatt nem nyújtanak kellő felbontást (ld. 5.3.1. fejezet). Ilyenkor vagy bonyolultabb analitikai módszereket alkalmazunk (2 dimenziós gél, 2 dimenziós óriásgél, 3 dimenziós gél, stb.), vagy a vizsgálandó mintát előzetes tisztításnak vetjük alá. Mi (kellő türelmünk az előzőhöz nem lévén) ez utóbbi eljárást választottuk. Abban a reményben, hogy az inzulin hatására foszforilálódó fehérjék közül a génexpresszióban fontos szerepet játszóak (pl. transzkripció faktorok) képesek a DNS-hez való kötésre, a 32-P-foszfáttal jelzett sejtmag-extraktumokat a 16. ábrán bemutatott folyamat-ábra szerint egy kettősszállú DNS-t tartalmazó cellulóz oszlopon előzetesen megtisztítottuk. Az eljárás nagymértékben alkalmas a zavaró "háttérfehérjék" kiszűrésére (vö. a 31. és 32. ábrákat, 99. oldal), de alkalmazása számos limitációt rejt magában: a "kihalászott" fehérjék némelyike nem csak a DNS-hez, hanem a cellulózhoz is köt (Csermely és Kahn, 1992; melléklet 33. oldal); az alkalmazott DNS borjú tímuszából származik, a sejtmag-extraktum egér (3T3-442A sejtek) eredetű; végezetül pedig a DNS "pucér", nem nukleoszómákba rendezett.

Minden bizonnyal a kísérleti metodika fenti limitációinak is köszönhető, hogy ezzel a módszerrel leginkább a sejtmagban nagyobb mennyiségben jelenlévő fehérjék (lamin, nukleolin) inzulinfüggő foszforilációját lehetett kimutatni és a génexpresszióban részt vevő specifikus fehérjék (transzkripció faktorok) kimutatása nem sikerült (Csermely és Kahn, 1992; Csermely és mtsai, 1993/b). (Alternatív magyarázatként természetesen az is elképzelhető, hogy az inzulin hatásáért felelős transzkripció faktorok, így esetleg maga az inzulin nem foszfofehérjék, illetve nem változtatják meg foszforilációs állapotukat inzulin hatására.) Az inzulin-specifikus aktiváló szakaszokat (ld. 22. táblázat, 72. oldal) tartalmazó affinitás oligo-DNS-oszloppal (ld. Kadonaga és Tijan, 1986) végzett kezdeti kísérleteink sajnos a foszforilált fehérjék túl magas háttérét eredményezték, így a további vizsgálatokat a 7. részben leírt irányban kívánjuk folytatni.

#### *Fehérjefoszforiláció, fehérje kináz aktivitás vizsgálata*

A foszfofehérjék analiziséről a fentiekben már szót ejtettem. Fehérjék foszforilációját *in vivo*, *in vitro* és "semi-*in vivo*" lehet nyomon követni. Az *in vivo* kísérletekben legtöbbször izolált sejteket inkubálunk 32-P-foszfát jelenlétében. A specifikus aktivitás megnövelése érdekében az inkubáció általában foszfátmentes médiumban folyik, ami különösen a hosszabb időtartamot vizsgáló kísérleteknél az *in vivo* jelleget erőteljesen megkérdőjelezi. A foszforilált fehérjék elkülönítése során végig magas radioaktivitású mintával kell dolgozni, ami speciális, eldobható eszközökkel is kivitelezhető módszerek alkalmazását igényli. (Lásd pl. a sejtek feltárása Lee és munkatársai, 1988 szerint egyszerhasználatos injekciós fecskendővel.) *In vitro* fehérjefoszforiláció vagy izolált fehérje szubsztrát és fehérje kináz segítségével, vagy részlegesen tisztított sejtfrakciókban, extraktumokban történhet. Ez utóbbi esetben a specifitást a foszforiláció körülményeinek alkalmas megválasztásával (pl. Ca-ATP, vagy Mg-GTP alkalmazása a szokásos Mg-ATP helyett, lásd 24. ábra, 91. oldal) fokozni lehet. A *semi-in vivo* módszer arra utal, hogy sejteknek pl. streptolysin-O-val történő permeabilizálása után gamma-32-P-ATP-vel is jó hatásfokkal lehet a sejt fehérjéit foszforilálni (Farkas és mtsai, 1993). A módszer azért csak "semi", mert ilyen esetben nem lehetünk minden esetben biztosak abban, hogy a kérdéses fehérje kináz és szubsztrátja *in vivo* is kölcsönhatásba lép-e egymással.

A fehérje kinázok aktivitásának meghatározása során a szokásos enzimológiai kérdéseket kell megválaszolnunk: milyen enzimmal, milyen szubsztráttal, és milyen körülmények között dolgozunk. Az enzim tisztításának kérdése különösen olyan körülmények között válik fontossá, mint pl. a fehérje kináz C mérése, ahol egy lipidaktiválható, részben membránkötött enzimet kell szolubilis, de lehetőleg nem denaturált formában kinyernünk. Az említett példában az extraháláshoz szükséges detergenskezelést több lépésben finomítottuk (ld. Csermely és mtsai, 1988/a; Csermely, 1988 és Csermely és mtsai, 1990). A kináz tisztításának nagy hatékonyságú módszerét jelenti enzimaktivitásának specifikus antitesttel adott immunkomplexében való meghatározása. A kellő specifitású szubsztrát megválasztása is létfontosságú lehet, így újabban a peptid-



szubsztrátokat részesítik előnyben a régebben alkalmazott fehérje-szubsztrátok (pl. hisztonok) helyett (Farkas és mtsai, 1993). A kísérlet körülményeinek helyes megválasztásával --a fehérjefoszforilációnál ismertetethez igen hasonló módon-- a specificitás tovább fokozható.

#### *Foszfoaminosav-analízis*

Amennyiben vizsgálataink során mintáinkban szerin/treonin és tirozin -kinázok egyaránt előfordulhatnak, létfontosságúvá válhat, hogy tudjuk, az adott fehérje foszforilációja milyen oldalláncon következett be. A kérdés megválaszolásának legkézenfekvőbb módszere az kérdéses foszfoaminosavakkal szemben termeltetett antitestekkel történő immunoblot vizsgálat. Sajnos azonban a foszfo-szerin és a foszfo-treonin még a foszfo-tirozinnál is rosszabb immunogén, így ilyen --nem-radioaktív-- vizsgálatok csak a tirozinon foszforilált fehérjék nyomkövetésére alkalmasak. A foszfoaminosavak arányát Cooper és munkatársai (1983) módszere szerint 6 N HCl-ban való hidrolízis után határoztuk meg. Az elválasztásra alkalmazott magasfeszültségű --néha érthető, néha érthetetlen okokból nem sikerülő-- elektroforézis helyettesítésére kísérletet tettünk a Neufeld és munkatársai (1989) által javasolt vékonyréteg-kromatográfiás eljárás bevezetésére is. Tapasztalataink ez utóbbi módszerrel még a hagyományos módszerrel szerettekénél is lesújtóbbnak mondhatók.

#### *Immunprecipitáció, immunoblot*

A modern biokémiai kutatás egyik nagy vívmánya az immunológiai módszerek alkalmazása egyes fehérjék kimutatásában és elválasztásában. Manapság már jópár esetben se szeri, se száma az adott fehérje ellen termeltetett, vásárolható, vagy kérhető ellenanyagoknak. Saját kutatásainkban eddig a hsp90, a lamin, a nukleolin, az S6 fehérje, a kazein kináz II, valamint a fos, jun, nukleáris faktor 1 (NF-1) és a szérum response faktor (SRF) transzkripció faktorok ellen termeltetett különböző ellenanyagokat alkalmaztuk immunprecipitációs, illetve immunoblot kísérletekben. Tapasztalataink igen változóak. Sok esetben (pl. AC-88 hsp90 ellenes antitest, lamin ellenes antitestek) az immunreakciók igen megbízhatóan, nagy érzékenységgel reprodukálhatóaknak bizonyultak, máskor viszont (pl. fos, jun ellenes antitestek) bármilyen értékelhető eredmény "kicsihilása" nagy nehézségbe ütközött.

Tapasztalataink szerint az immunprecipitációs kísérleteket minden esetben aspecifikus immunoglobulinnal is el kell végezni, az immunkomplexhez nem specifikusan kötődő fehérjék kiszűrésére. Az immunprecipitátumok "végső" eredménye a csapadék mosásával szinte korlátlan határok között változtatható. Így ezen kísérleteknél nagy gondot kell fordítani a mosási lépések kellő megtervezésére, körüljárására. A Pierce cég által forgalmazott akrilamid-protein A gömbök esetén a minták folyamatos rázása elengedhetetlen. Ugyanez a Calbiochem Pansorbinjával dolgozva nem szükséges.

Az immunoblot eljárással történő detektálás során a másodlagos (kísérleteinkben peroxidázzal konjugált) antitest az egyik kritikus pont. Tapasztalataink szerint a DAKO, vagy BioRad termékek minősége megbízható, ugyanezt azonban a legcsekélyebb

mértékben sem lehet elmondani a Sigma által szállított "antitestekről". A peroxidázos technikák közül a legérzékenyebbek és a legmegbízhatóbbnak az Amersham ECL detekciós kit-je bizonyult, de jó tapasztalataink vannak a kobalt-kloriddal érzékenyített diamino-benzidines módszerrel (Harlow és Lane, 1988, p. 509) és a szokásosan alkalmazott 4-kloro-1-naftol-os technikával is (Csermely és Kahn, 1992; Csermely és mtsai, 1993/a).

#### 4.2. Sejtbiológiai módszerek: sejtek tenyésztése és differenciációja; ionok sejten belüli koncentrációjának meghatározása fluoreszcenciás úton és mágneses rezonancia méréssel, fehérje kináz C lokalizációja digitális képfelbontással

##### *Felhasznált sejtek*

Kísérleteinket egér és nyúl timocitákkal, humán perifériális limfocitákkal, valamint az NIH-3T3-442A adipocitává differenciálódó sejtvonallal végeztük. Ez utóbbi (nem differenciálódott állapotukban fibroblaszt típusú) sejtek az inzulinnal kapcsolatos kutatások egyik kedvenc kísérleti objektumai, ugyanis különösen differenciálódott állapotban rendkívül sok inzulinreceptort tartalmaznak a felszínükön, valamint differenciálódásuk inzulinnal is kiváltható. Kísérleteinkben a szokásos 5 tf. % széndioxid koncentráció megduplázása a sejtek differenciációjához elengedhetetlennek bizonyult. A sejtek az inzulinhoz hasonlóan jó arányban differenciálódtak izobutil-metil-xantin és dexametazon együttes hatására, ha a termékeket a Calbiochemtől szereztük be. Sigma vegyszerek alkalmazása általános sejthalálhoz vezetett.

##### *Ionok sejten belüli koncentrációjának meghatározása*

Roger Tsien a nyolcvanas évek elején fejlesztette ki a quin2-öt és a fura-2-öt, az azóta gyors szaporodásnak indult, sejten belüli ionkoncentrációk meghatározására alkalmas fluoreszcens indikátorcsalád első két tagját. Korábbi kísérleteinkben felhívtuk a figyelmet a módszer lehetséges buktatóira mindkét indikátor használata esetén (Csermely és Somogyi, 1987; Csermely, 1988; Tóth és mtsai, 1989). E kísérletekben szerzett tapasztalataink jó alapot teremtenek arra, hogy jelenleg folyó vizsgálatainkban a Forbes és munkatársai (1992) által kifejlesztett zinquin, cink specifikus fluoreszcens indikátort teszteljük.

Cink ionok szabad koncentrációjának meghatározására a zinquin indikátor előtt két módszer, a Smith és munkatársai (1983) által kifejlesztett 19-F-NMR mérésen alapuló F-BAPTA technika, illetve cink specifikus elektódok (Lindner és mtsai, 1992) alkalmazása szolgálhatott. Sajnálatos módon a F-BAPTA indikátor acetoximetil-észterén alapuló eljárás kísérleteink tanulsága szerint nem volt elég érzékeny a sejten belüli cink koncentrációk detektálására, de a módszer szabad cinkkoncentráció *in vitro* analízisére kiválóan bizonyult (ld. 5.1.1. fejezet, valamint Csermely és mtsai, 1989). A Dr. Pungor Ernő munkacsoportjában kifejlesztett cink specifikus elektród jelenlegi formájának méréshatára sajnos a 100-200 nM-os mérési tartományban van, ami egy-két nagyságrenddel magasabb a sejten belüli cinkkoncentráció feltételezhető fiziológiás értékénél és a fehérje kináz C-t aktiváló szabad cink koncentrációknál (ld. 5.1.1. fejezet, valamint Lindner és mtsai, 1992).



#### *Fehérje kináz C lokalizációja digitális képfelbontással*

A fehérje kináz C sejten belüli lokalizációjára a "konvencionális", sejtfrakcionálással és a különböző izoenzimek ellen termeltetett antitestekkel történő analízisen kívül egyetlen *in vivo* módszer, a fluoreszcens TPA pl.: a 12(6-N-(7-nitrobenz-2-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)hexano-il-forbol-acetát (nitrobenz-TPA) fluoreszcencia mikroszkópos vizsgálata alkalmas (Liskamp és mtsai, 1985). Ezirányú kísérleteinket Dr. Philip Grimley-vel (Uniformed Services University, Bethesda, MD, USA) együttműködésben, egy ACAS 470-es készüléken (Meridian Instruments, Okemos, MI, USA) végeztük (ld. 5.1.1. fejezet).

#### **4.3. Analitikai módszerek: fehérjekoncentráció meghatározás, röntgenfluoreszcencia-spektrometria, plazmaemissziós spektrofotometria, cirkuláris dikroizmus mérések, Fourier-transzformált IR spektroszkópia**

##### *Fehérjekoncentráció meghatározás*

42 évvel Lowry és munkatársai (1951) talán a világon legtöbbet idézett cikke után nem gondolná az ember, hogy a biokémiai laboratórium egyik legfundamentálisabb problémája mind a mai napig a fehérjemeghatározás maradt. Mi magunk a kérdés komolyságára először az egyszerűsége és érzékenysége miatt közkedvelt Bradford (1976) eljárás kapcsán döbbsztünk rá, amelyet (mint az tapasztaltabb kutatók körében köztudott) szinte minden zavar. A fehérje kináz C meghatározás és a fehérjekoncentrációmérés összeegyeztetésére tett kísérleteink --hozzávetőleges-- eredményét két közleményünk (Csermely és mtsai, 1988/a; Csermely és mtsai, 1990) tartalmazza.

A fehérjekoncentrációmérés második, és még az elsőnél is maradandóbb fricskáját egy izolált, tiszta fehérje, a 90 kDa-os hő-sokk fehérje koncentrációjának meghatározása során kaptuk. A fehérjével végzett cirkuláris dikroizmus mérések számszerű kiértékelése során az abszolút fehérjekoncentrációtól nagymértékben függő kiértékelési módszer (Provencher és Glöckner, 1981; Provencher, 1982) a Bradford eljárással kapott adatokkal a cirkuláris dikroizmus spektrumok alakját és elemi biokémiai ismereteinket figyelembevéve hihetetlen eredményeket produkált (selyemszerű, csupa béta-redőből álló szerkezet). Végezetül három fehérjemeghatározási módszer és két fehérjestandard kombinálásával jutottunk olyan adatokhoz, amely elfogadható struktúrális összetételt eredményezett (ld. Csermely és mtsai, 1993/a, melléklet 24. oldal). A jövő kísérleti terveihez tartozik, hogy Kjeldahl-féle meghatározással eldöntsük (?), hogy a kiterjedt savas és bázikus szekvenciákkal, hidrofób részletekkel bíró fehérje tényleges koncentrációja megfelel-e az általunk jóhiszeműen feltételeztnek.

##### *Röntgen-fluoreszcencia-spektrometria, plazmaemissziós spektrofotometria*

Nyomelemek kimutatására és kvantitatív meghatározására számos nagyérzékenységű eljárás ismeretes. Mi ezek közül kettőt, a röntgen-fluoreszcencia-spektrometriát és a plazmaemissziós spektrofotometriát próbáltuk ki (Csermely és mtsai, 1987/a,b; melléklet 5-14. oldal). Az első eljárás előnye, hogy roncsolásmentesen képes bizonyos nyomelemek meghatározására, így néhány lépéssel kevesebb esély adódik a minták be-

szennyezésére, hátránya, hogy csak félkvantitatív adatokat szolgáltat. A plazmaemissziós spektrofotometria a nyomelemek kutatásának egyik legnagyobb hatású eszköze. Hihetetlenül nagy érzékenységében rejlik a hátránya is: az eredmények láttán az ember még ott is hajlamos nyomelemeket és azok változásait észlelni, ahol kósza molekulákon (fotonokon) kívül vajmi kevés tényleges észlelendő akad. E módszerrel végzett vizsgálataink során nagy megnyugvásunkra szolgált, hogy hat nyomelemet ki sem tudunk mutatni, 14 (nyom)elemben pedig nyomát sem láttuk semmiféle változásnak. További öröm forrása volt, hogy a vizsgálható elemek közül a maradék 6-ból egyedül a magnézium teljes sejtben mért koncentrációja változott forbol észterrel történő kezelés után (Csermely és mtsai, 1987/b, melléklet 11-12. oldal). Az eredmények fenti "sivársága" megbízhatóságukat támasztotta alá.

#### *Cirkuláris dikroizmus mérések*

Fehérjék cirkuláris dikroizmus mérésekkel történő szerkezetmeghatározásában az első tapasztalatokat a szarkoplazmatikus retikulum Ca-ATP-ázának vizsgálatával szerezttem (Csermely és mtsai, 1987/c). A 90 kDa-os hő-sokk fehérje ATP-függő konformációváltozásának vizsgálata jó alkalmat nyújtott e nagyhatású vizsgálati eljárás újbóli alkalmazására. A cirkuláris dikroizmus mérések sajnálatos limitációja, hogy nagy UV abszorpcióval rendelkező minták nem, vagy csak igen nagy pontatlansággal mérhetőek. Ez éppen a vizsgálni kívánt ATP magasabb koncentrációinak analízisét gátolta meg (Csermely és mtsai, 1993/a; melléklet 24. oldal). A spektrumok kvantitatív értékelésének problémáiról már a fehérjekoncentráció mérése kapcsán említést tettem.

A fehérjéken végzett cirkuláris dichroizmus mérésekkel szerzett kedvező tapasztalatok vezettek bennünket arra, hogy e módszert is alkalmazzuk a 90 kDa-os hő-sokk fehérje és a kromatin kölcsönhatásainak tanulmányozására (ld. 5.2.4. fejezet). A 240-től 300 nm-ig terjedő cirkuláris dikroizmus méréseket széleskörben használják a kromatin szerkezetének, a hisztonok asszociációjának jellemzésére. A módszer hátránya, hogy az egyes változásokat csak kevés esetben lehet a molekuláris történéseknek megfeleltetni (Fasman, 1978), így az észlelt hatások értelmezéséhez független kísérletek is szükségesek (ld. 7. rész).

#### *Fourier-transzformált IR spektroszkópia*

A nyolcvanas évek második felében (nem utolsósorban Henry Mantsch munkásságának köszönhetően) a Fourier-transzformált infravörös spektroszkópia is felzárkózott a cirkuláris dikroizmus mérések mellé a fehérjék másodlagos szerkezetének meghatározásában. A módszer előnye, hogy sok esetben olyan konformációátmenetek is kimutathatóak vele, amelyek cirkuláris dikroizmus méréssel nem észlelhetőek (Surewicz és Mantsch, 1988). A módszer következő hátrányait fedeztük fel a kísérletek során: nagymennyiségű fehérjét (mérésenként kb. 1 mg-ot) igényel, a mérést a spektrométerbe kerülő legkisebb légszennyeződés is zavarja, a méréseket csak nehézvízben lehet végezni, a nehézvíz háttérabszorpciójának levonása során a spektrumok alapvetően torzulhatnak, valamint a spektrumok adatainak kvantitatív kiértékeléséről nagy hitviták zajlanak a szakirodalomban (Surewicz és mtsai, 1993; Csermely és mtsai, 1993/a; melléklet 24., 26. és 30. oldalai).



## 5. A kísérleti eredmények összefoglalása

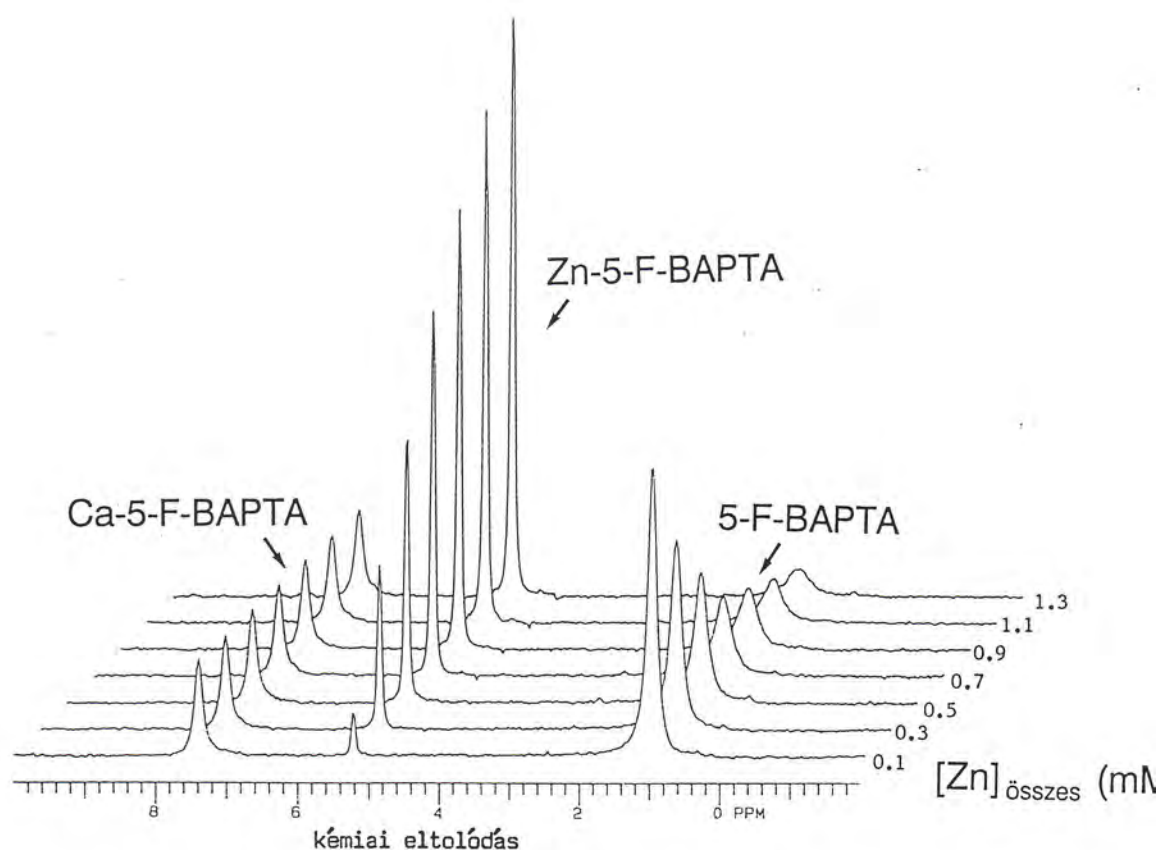
Mint azt már a bevezetőben is említettem, értekezésem jelen fejezete formájában kissé eltér a megszokottól. A kísérleti eredmények zömét a mellékletként bemutatott közlemények tartalmazzák, az értekezés "törzsébe" ezen eredmények legfontosabbjait, összefoglalását, illetve a még nem közölt, vagy közlés alatt álló új eredményeinket szerepeltettem. A disszertáció "törzsében" közölt, a mellékletben nem szereplő eredmények legtöbbje inkább jelenlegi kutatásaink irányait jelző előkísérlet, semmint cáfolhatatlan állítások bizonyító anyaga. E (szerencsés vagy szerencsétlen) formai újjításért, a melléklet adott oldalaira történő bő hivatkozásokból fakadó gyakori "lapozgatásokért" az olvasó megértését kérem.

### 5.1. A fehérje kináz C aktivációjának kapcsolata a sejtmagbéli jelátviteli folyamatokkal

#### 5.1.1. A cink szerepe fehérje kináz C aktivációjában és transzlokációjában

Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy cink ionok hatására a fehérje kináz C aktivációja következik be és hogy valamilyen nehézfém-ion (feltételezhetően a fehérje kináz C cink-ujjaiban komplexként jelenlévő cink) szükséges a fehérje kináz C sejten belüli átrendeződéséhez, transzlokációjához (Csermely és mtsai, 1988/a; ld. melléklet 1-4. oldal). Cink ionok számottevően megnövelték a citoszolbéli fehérje kináz C forbol észterek kötésében mutatott affinitását a citoszolban elérhető forbol dibutirát kötőhelyek mintegy kétharmadát "konvertálva" egy "alacsony affinitású" (kb. 27 nM-nak megfelelő kötődési konstanssal jellemezhető) állapotból egy "magas affinitású" (3-5 nM) állapotba. Cink ionok hozzáadása a membránkötött fehérje kináz C forbol észter kötésén számottevően nem változtatott (Csermely és mtsai, 1988/b).

Eredményeink diszkussziója során két fontosabb kérdés maradt nyitva: 1. vajon mekkora az a *szabad* cink koncentráció, amely hatására a fenti folyamatok lejátszódnak; hogyan viszonyul ez az *in vivo* mérhető intracelluláris szabad cink koncentrációhoz, és vajon változik-e a sejten belüli szabad cink koncentráció különböző stimulusok hatására, azaz összefoglalólag: van-e a kapott eredményeknek tényleges fiziológiai jelentősége? 2. fenti eredményeinket a fehérje kináz C aktiválódása során talált sejtmagbéli cink-koncentráció csökkenéssel és kalciumkoncentráció emelkedéssel (ld. 5.1.2. fejezet) összevetve felmerült a kérdés, hogy a cink szerepet játszik-e a fehérje kináz C-nek a sejtmagba történő átrendeződésében (Csermely, 1988; Csermely és Somogyi, 1989/a,b)? Az alábbiakban az e kérdések megválaszolására irányuló kezdeti kísérleteinket mutatjuk be.

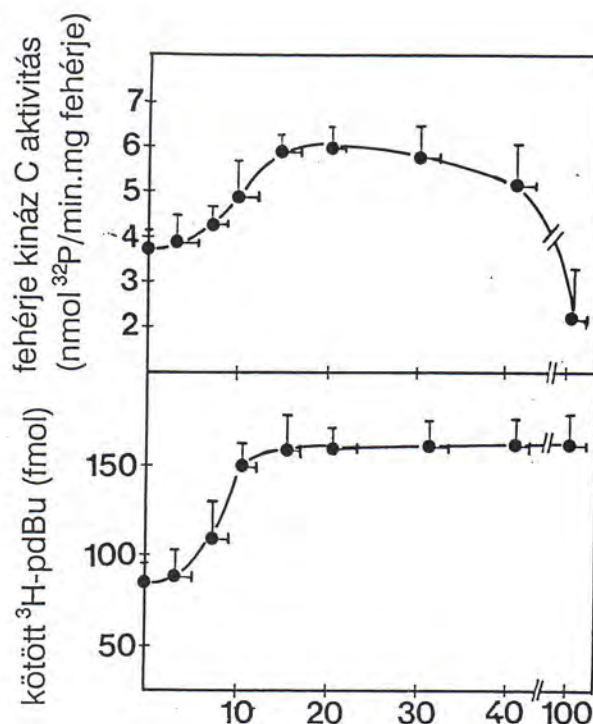


17. ábra Az 5-F-BAPTA indikátor  $^{19}\text{F}$ -NMR spektruma különböző cinkkoncentrációk esetén (Csermely és mtsai, 1989 nyomán) BAPTA = 1,2-bisz(orto-aminofenoxi)etán-N,N,N',N'-tetraecetsav

Mint azt már a 4.2. fejezetben is említettem, cink ionok szabad (egyensúlyi) koncentrációinak a nanomólos tartományban történő meghatározására a egészen a legutóbbi hónapokig, az Ian G. Forbes és munkacsoportja (1992) által kifejlesztett zinquin indikátor megjelenéséig egyetlen módszer, az 5-F-BAPTA indikátorral történő magmágneses rezonancia (NMR) mérés volt alkalmas (Smith és mtsai, 1983). A módszer azon alapul, hogy a különböző ionok (így a cink is) eltérő kémiai eltolódást okoznak a BAPTA idikátorhoz kötött fluor atom NMR-jelében az indikátorral történő komplexképzés esetén. Így a fluorral szubsztituált indikátor segítségével számos (akár 7-8) fémion szabad koncentrációjának egymás melletti meghatározása is lehetővé válik (Csermely és mtsai, 1989). Az indikátornak a cink különböző koncentrációi esetén mérhető NMR spektrumát a 17. ábrán mutatom be. A szabad és a cink-komplexben lévő indikátor koncentrációjának arányából (görbe alatti terület) a Zn-5-F-BAPTA asszociációs konstansának ismeretében (7,9 nM; Metcalfe és mtsai, 1985) az elegyben lévő szabad cinkkoncentráció kiszámolható.

Kísérleteinkben az 5-F-BAPTA indikátort (1 mM végkoncentráció) a fehérje kináz C aktivitásának, illetve a forbol dibutirát kötődésének meghatározására szolgáló elegybe (ld. melléklet 1-2 oldal) juttatva *párhuzamosan* mértük az adott elegyek szabad cinkkoncentrációját és fehérje kináz C aktivitását, valamint forbol észter kötő képességét. Méréseink eredményét a 18. ábrán mutatom be. Az ábra adataiból látható, hogy mind a fehérje kináz C aktivitás, mind a forbolészter kötés növekedése (a kötés affinitásának változása, ld. Csermely és mtsai, 1988/b) 5 és 15 nM-os szabad cink koncentráció között következik be. A görbék aktivációs szakaszának párhuzamos lefutása arra utalhat, hogy a fehérje kináz C hasonló szerkezeti elemei vesznek részt mindkét folyamatban.

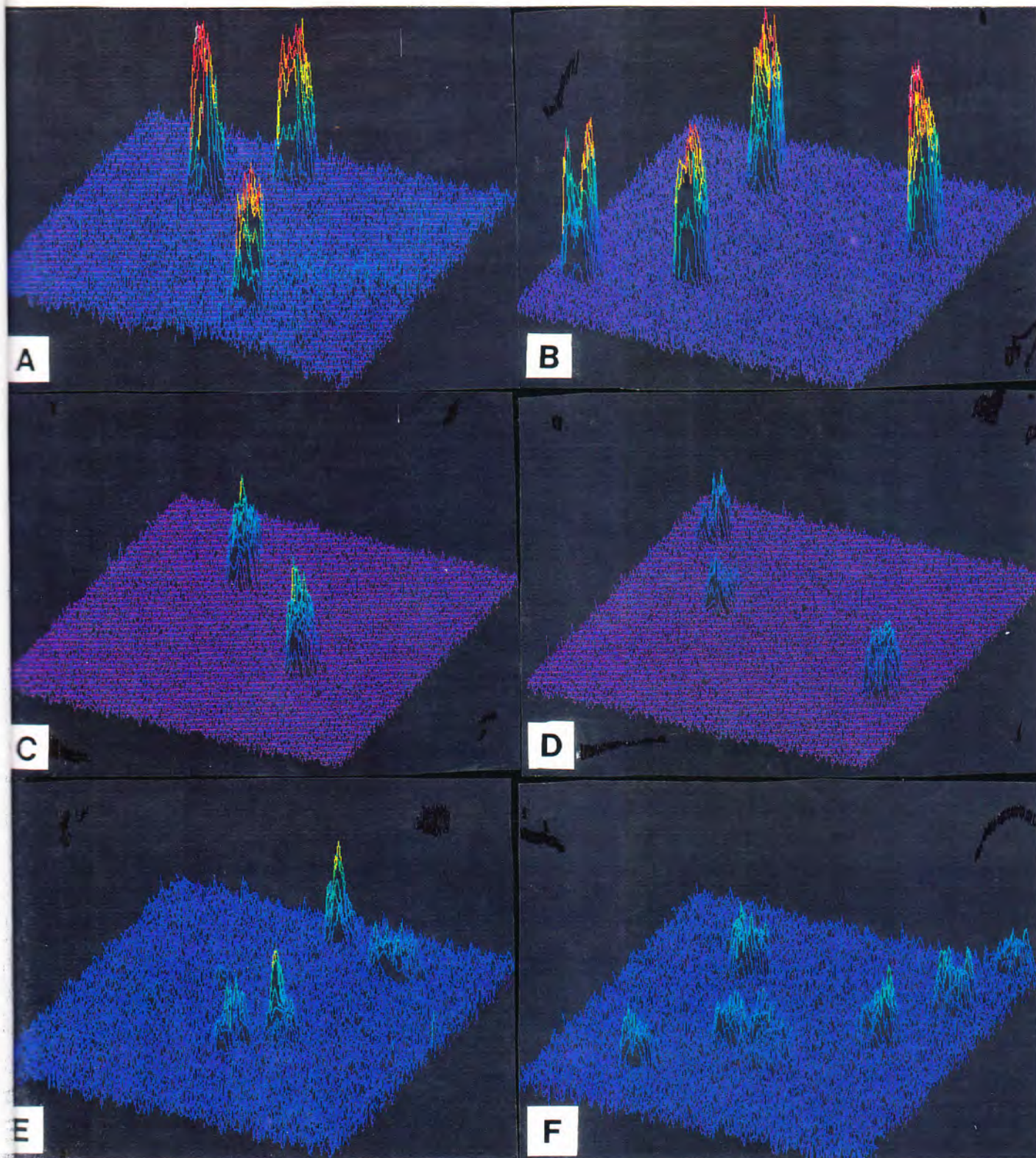




18. ábra A fehérje kináz C aktivitásának és forbol észter kötésének változása a szabad cinkkoncentráció függvényében (kísérleti körülményeket ld. melléklet 1-2. oldal, ill. a szövegben; az adatok három kísérlet átlagai  $\pm$  SD) pdBu = forbol-dibutirát

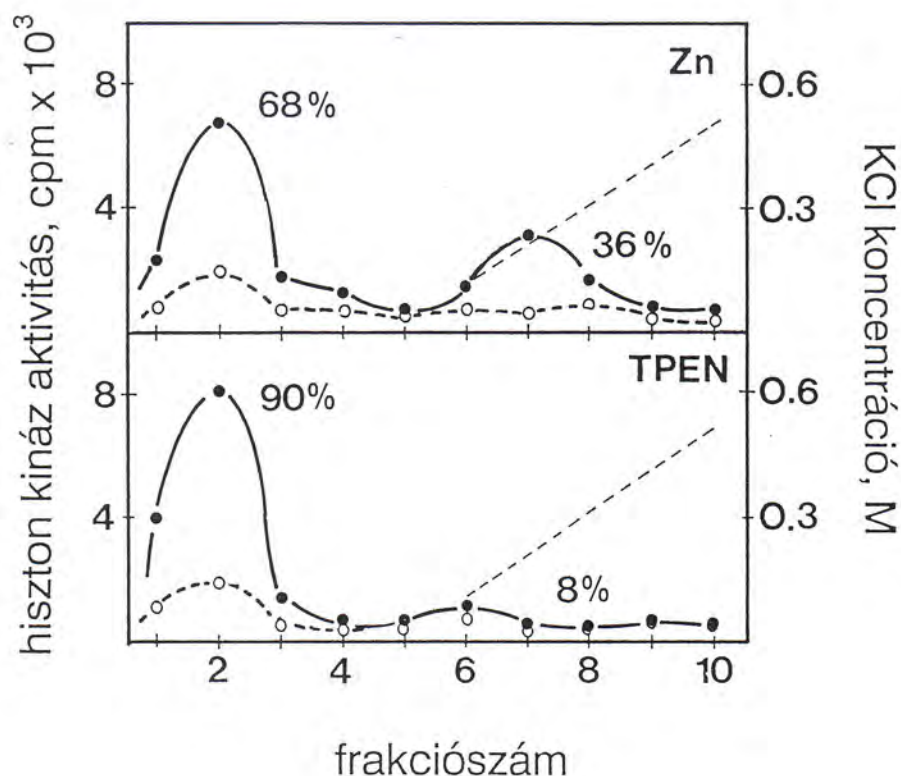
A fehérje kináz C sejten belüli megoszlását az U937-es promieloid sejtvonalon tanulmányoztuk. Előkísérleteink során tisztáztuk, hogy a fluoreszcens TPA analóg nitrobenz-TPA megoszlása a sejtekben 20 perces inkubálás után marad hozzátétőlegesen állandó (50 nM nitrobenz-TPA  $10^6$  U937 sejt/ml-hez). Az U937 sejtek hozzátétőlegesen ugyanannyi nitrobenz-TPA-t voltak képesek felvenni, mint a nehézfém kelátor, TPEN-nel előkezelt társaik (vö. 19/A-B. ábra). Annak a tisztázására, hogy a sejtmagok térségében, illetve a perinukleáris régióban lévő nitrobenz-TPA-ból mennyi asszociál ténylegesen a nukleáris mátrix oldhatatlan struktúráival, a sejteket 0.1 % Triton X-100-zal extraháltuk. A kontroll sejtek ilyen körülmények között is számottevően több nitrobenz-TPA-t kötöttek a sejtmagjaiknak megfelelő tartományban, mint TPEN-nel előkezelt társaik (vö. 19/C-D. ábra). A nitrobenz-TPA kötés jellegzetes különbsége a fluoreszcens TPA-val kezelt sejtekből Blobel és Potter (1966) módszere szerint izolált sejtmagok esetén is fennmaradt (vö. 19/E-F. ábra). Az U937 sejtek sejtmagjainak TPEN okozta nehézfémion (cink) deplécio hatására lecsökkent nitrobenz-TPA kötő képessége még szembetűnőbb volt akkor, ha TPEN-nel kezelt sejteket a kontroll sejtek helyett a cink-ionofór pirithionnal (20  $\mu$ M; Zalewski és mtsai, 1990) és cinkkel (50  $\mu$ M) előkezelt sejtekkel hasonlítottuk össze. A TPEN által okozott változásokat cink együttes adása megszüntette (nem bemutatott adatok). Eredményeink azt sugallják, hogy a nehézfémek (legvalószínűbben a cink) a szerepet játszanak a fehérje kináz C-nek a sejtmagba történő transzlokációjában (is).





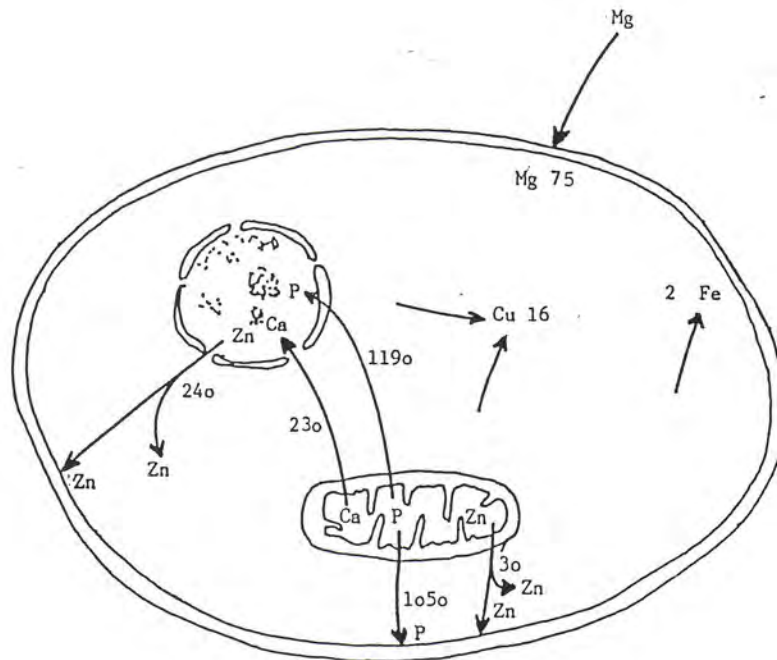
19. ábra A fluoreszcens TPA analóg, nitrobenz-TPA megoszlása U937 sejtekben  
A,C,E = kontroll sejtek; B,D,F 100  $\mu$ M TPEN-nel 10 percig előkezelt  
sejtek. A,B = intakt U937 sejtek; C,D = 0.1 % Triton X-100-zal ke-  
zelt sejtek; E,F = nitro-benz-TPA-val kezelt U937 sejtekből izolált  
sejtmagok. Az ábrákon az egyes sejtek nitrobenz-TPA-ra jellemző,  
ACAS 470 fluocitóméterben mért zöld fluoreszcenciáját tüntettem  
fel. Az egyes ábrák 5-5 kísérlet reprezentánsai.





20. ábra A fehérje kináz C kötődése DNS-cellulóz oszlophoz (kromatográfia: Alberts és Herrick, 1981 szerint) A kromatografáló médium összetétele: 10 mM Hepes, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 50 ug/ml leupeptin, 200 ug/ml foszfatidil-szerin, 40 nM TPA és 1.5 mM ZnCl<sub>2</sub>, vagy 0.1 mM TPEN. Az egyes frakciók KCl tartalmát vezetőképesség mérésével, fehérje kináz C aktivitását pedig a melléklet 1-2 oldalán leírtak szerint határoztuk meg. Üres körök: kináz aktivitás EGTA jelenlétében; töltött körök: kináz aktivitás a fehérje kináz C aktivátorai (CaCl<sub>2</sub>, foszfatidil-szerin és TPA) jelenlétében. A %-ok az egyes csúcsokban mérhető fehérje kináz C aktivitás értékét mutatják a felvitt 250 ug egér timocita citoszol fehérje kináz C aktivitásának %-ában. Az ábrán bemutatott kísérlet három független mérés reprezentánsa.

A cink szerepét a fehérje kináz C sejtmagba történő transzlokációjában DNS-cellulóz kromatográfia segítségével is vizsgáltuk. A fehérje kináz C két cink-ujjat tartalmazó, cink-kötő fehérje (Hubbard és mtsai, 1991; Quest és mtsai, 1992). Mivel a cink-ujjat tartalmazó domáinek a fehérjéket képessé teszik a DNS-hez való kötődésre, kíváncsiak voltunk, vajon képes-e a fehérje kináz C kötni a DNS-hez és játszik-e a cink valamilyen szerepet ebben a folyamatban. A 20. ábrán bemutatott adatok tanulsága szerint a citoszolbeli fehérje kináz számottevő mennyisége (közel egyharmada) képes a DNS-hez való kötődésre cink jelenlétében. Cink távollétében DNS-hez kötődő enzimaktivitás praktikusán nem detektálható (20. ábra, TPEN). A TPEN hatása cink együttes adásával kivédhetőnek bizonyult. A cinkionok jelenlétében tapasztalható DNS-kötéshez a fehérje kináz C aktivátorainak (Ca, foszfatidil-szerin, TPA) együttes jelenléte nélkülözhetetlen volt. A fehérje kináz C sem cinkionok jelenlétében, sem hiányukban nem mutatott számottevő kötődést a cellulóz mátrixhoz (nem bemutatott adatok).



21. ábra TPA hatása különböző elemek megoszlására nyúl timocitákban  
(Csermely és mtsai, 1987/b; ld. melléklet 12. old.)

#### 5.1.2. A fehérje kináz C aktivációjának hatása a cink sejten belüli megoszlására

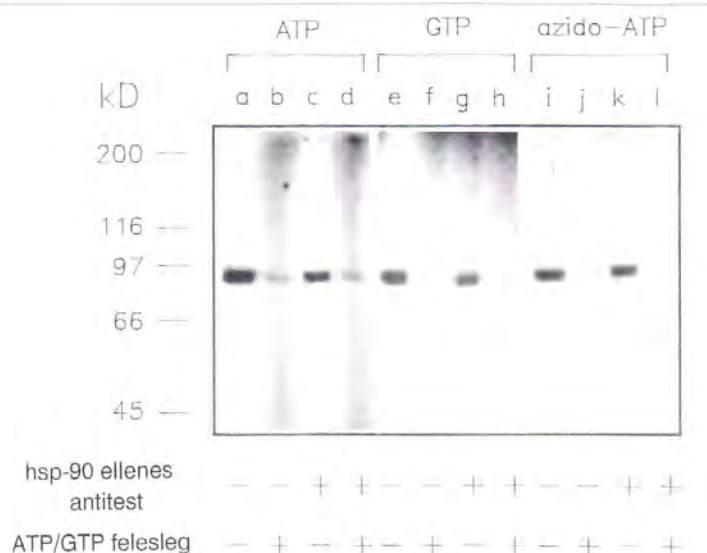
Az 5.1.1. fejezetben néhány olyan adatot mutattam be, amelyek azt sugallják hogy a cinkionok részt vehetnek a fehérje kináz C sejtmagba történő átrendeződésében. Ezek ismeretében még fontosabbá válik annak a kérdésnek a vizsgálata, hogy hogyan változik a különböző sejtbeli kompartmentumok, így a sejtmag cinkkoncentrációja a fehérje kináz C aktiválása során. Röntgenfluoreszcencia és plazmaemissziós spektroszkópiás vizsgálataink tanulsága szerint nyúl timocitáknak a fehérje kináz C-t aktiváló TPA-val történő kezelése számos elem, így a foszfor, a kalcium és a cink sejtmagon belüli összes mennyiségének megváltozásához vezet (ld. 21. ábra; Csermely és mtsai, 1987/a,b).

#### 5.2. A 90 kDa molekulatömegű hő-sokk fehérje (hsp90) lehetséges szerepe a sejtmag jelátviteli folyamataiban

##### 5.2.1. A hsp90, mint ATP-kötésre és autofoszforilációra képes fehérje

A hsp90 a legtöbb sejtben citoplazma fehérjéinek 1-2 %-át kitevő, konzervatív szerkezetű hő-sokk fehérje. Annak ellenére, hogy hatásairól, különböző fehérjékkel képzett komplexeiről elég sokat tudunk (ld. 2.2.1. és 2.2.4.2. fejezetek), a fehérje pontos funkciója és eddig felderített hatásainak mechanizmusa egyáltalán nem ismert. Saját kísérleteinkben a hsp90 *in vitro* foszforilációjának vizsgálatához nagytisztaságú hsp90-et állítottunk elő. Meglepetéssel tapasztaltuk, hogy a nagytisztaságú fehérje a kontrollkísérletben (kívülről adott kináz nélkül) is foszforilálódott. Ez a meglepő megfigyelés vezetett el bennünket a következőkben leírt kísérletekhez.



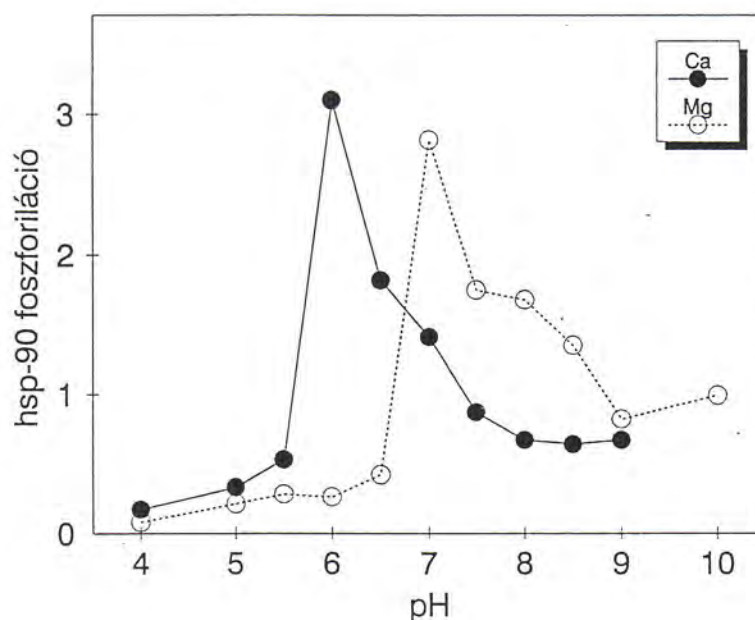


22. ábra A 90 kDa-os hő-sokk fehérje (hsp90) autofoszforilációja és kovalens jelölése azido-ATP-vel (Csermely és Kahn, 1991; ld. melléklet, 16. old.)

A 22. ábrán látható, hogy a hsp60-hoz, a hsp70-hez, a grp94-hez és a hsp110-hez hasonlóan (ld. 2.2.1. fejezet) a hsp90 is képes az ATP kötésére. A hsp90 ATP-kötő képességét a 22. ábrán bemutatott azido-ATP jelölődésen kívül a szerkezetében fellelhető ATP-kötő konszenzus szekvencia és ATP-agarózhoz való kötődése is alátámasztja (ld. melléklet 17,20 old.). A nagytisztaságú fehérje mind ATP, mind GTP jelenlétében (auto)-foszforilációra képes (22. ábra). A hsp90 egy sor kinázzal asszociál (ld. 9. táblázat, 36. old.), így nagytisztaságú preparátumának kináz aktivitása egy együttesen izolálódó, "szennyező" kináz működésének eredménye is lehet. Kísérleteinkben számos olyan körülményt derítettünk fel, amely ezt a lehetőséget meglehetősen valószínűtlenné teszi (ld. 24. táblázat).

legalább 98 %-ban tiszta preparátum  
ismert kináz inhibitorok, aktivátorok hatástalanok  
 $K_M$  ATP-re 0.16 mM  
sajátos szubsztrátspecifitás  
a reakció egyedi kationfüggést mutat (Ca-ATP-vel is megy)  
extrém hőstabilitás (40 % aktivitás 15' 95 °C-os inkubálás után)  
az autofoszforiláció pH optimuma savasabb, mint az esetleges szennyező kinázé  
a hsp90 képes az ATP (GTP) megkötésére  
nincs más azido-ATP jelölődő fehérje a preparátumban  
a hsp70 autofoszforilációjával mutatott nagyfokú analógia

24. táblázat A hsp90 autofoszforilációját alátámasztó adatok (Csermely és Kahn, 1991 nyomán, ld. melléklet 19-20. old.; 23. ábra)

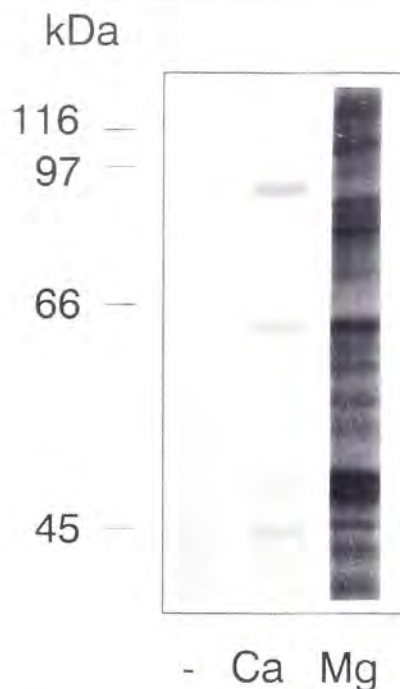


23. ábra A heparin agaróz kromatográfiával meg nem tisztított hsp90 foszforilációjának pH függése Ca-ATP és Mg-ATP jelenlétében A hsp90 preparálását és autofoszforilációjának vizsgálatát ld. a melléklet 16. oldalán. A pH 4 és 6.5 közötti értékeket morfolino-etán-szulfonsav (MES), a pH 6.5 és pH 8.5 közöttiek Hepes, a pH 8.5 és pH 10 közöttiek Tris puffer segítségével állítottuk be. (Az átfedő pH értékeken a különböző pufferekben mért foszforiláció értékei megegyeztek.)

A hsp90 Ca-ATP jelenlétében mutatott autofoszforilációjának pH optimuma pH 6 körül mozog, a kevésbé tiszta hsp90 preparátumokban jelenlévő kináz (minden bizonyos kazein kináz II) által katalizált foszforiláció pH optimuma függése ettől jelentősen eltér (23. ábra). Ez a tulajdonság egy további megkülönböztető sajátosság a kétféle reakció között. Számos kísérletet tettünk a hsp90 által foszforilált más fehérjék felderítésére. A hsp90 által katalizált foszforiláció meglehetősen nagy szubsztrátspecifitást mutat: saját magán kívül eddig más szubsztrát egyértelmű azonosítása nem sikerült.

A hsp90 autofoszforilációjának szokatlan ionfüggését (az autofoszforiláció Ca-ATP jelenlétében is végbemegy) felhasználtuk az autofoszforiláció kimutatására teljes citoszolban is (ld. 24. ábra). A Mg-ATP jelenlétében foszforilálódó számtalan fehérjével szemben Ca-ATP csak néhány jól megkülönböztethető fehérje foszforilációját okozza. A jelölődő fehérjék közül a 90 kDa-os a hsp90-nek felel meg, az 57-59 kDa-os fehérjét ammóniumsulfátos frakcionálással, DEAE kromatográfiával, gél-sűrűsítéssel és SDS poliakrilamid gélelektroforézist követő kivágással és elektroelúcióval megtisztítva a fehérje és egy vele együttmozgó másik fehérje N-terminálisához közel elhelyezkedő aminosavakra (Dr. Patthy Andrással együttműködésben, Gödöllői Biotechnológiai Központ) a DESDAV és az AKKAIK szekvenciákat kaptuk (Schneider T. és Csermely P., nem közölt adatok). E szekvenciák annak ellenére, hogy a fehérje azonosítását nem teszik lehetővé, kizárják a lehetséges jelöltek közül a hsp90 proteolitikus fragmenteit, az ATP-kötő hsp59-et és a hsp90-nel asszociáló tubulint.



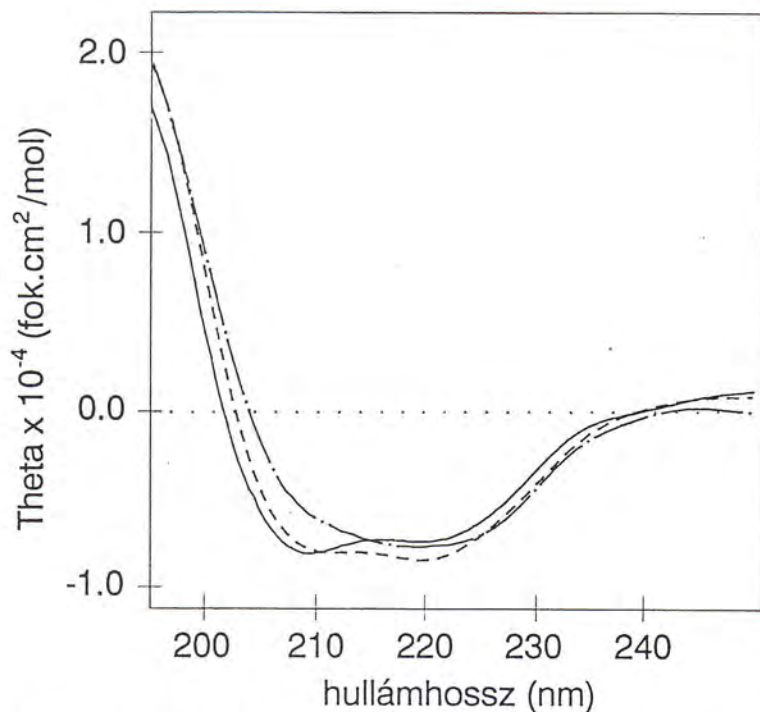


24. ábra Patkánymáj citoszol foszforilációja különböző kétértékű kationok jelenlétében 100 ug patkánymájból izolált citoszol fehérjét a melléklet 16. oldalán található módszer szerint 5 mM EDTA,  $\text{CaCl}_2$ , illetve  $\text{MgCl}_2$  jelenlétében foszforiláltunk. Az ábra az SDS-PAGE-vel elválasztott fehérjék autoradiográfiája 5 kísérlet reprezentánsaként.

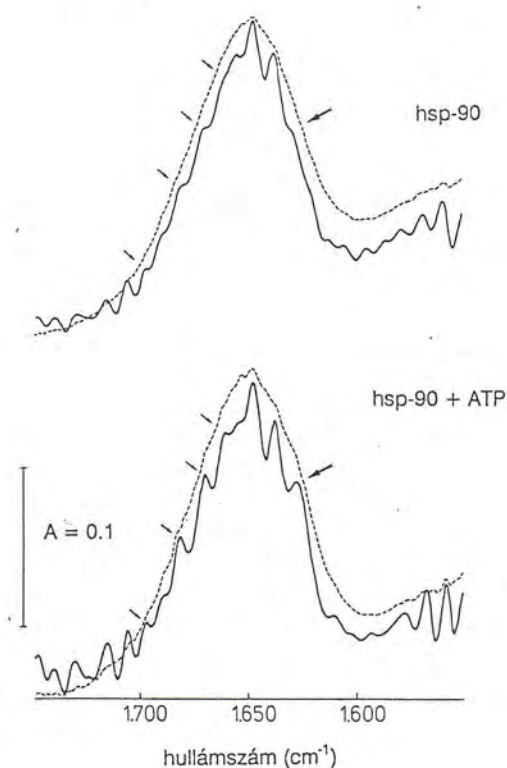
A hsp90 autofoszforilációja citoszol hozzáadásakor visszaszorul, ami vagy egy citoszolbeli inhibitor, vagy egy specifikus foszfofehérje foszfatáz működésének eredménye lehet. A Ca-ATP-függő foszforiláció mind streptozotocin-indukált diabeteszben, mind pedig különböző malignus sejtvonalakon a patológiás állapottal korreláló, jellemző változásokat mutat (Csermely P. és mtsai, nem közölt adatok).

#### 5.2.2. ATP hatása a hsp90 konformációjára

A hsp90 ATP kötésére képes fehérje (Csermely és Kahn, 1991; ld. 5.2.1. fejezet). Mivel a hsp60 és a hsp70 ATP-függő konformációváltozásai nagy szerepet játszanak e hő-sokk fehérjék működésében (ld. 2.2.1. fejezet) és a hsp90 a hsp70-hez hasonlóan egy bi-lobuláris, zsanér-típusú fehérje (v. ö. Koyasu és mtsai, 1986 és Flaherty és mtsai, 1990) érdemesnek látszott megvizsgálnunk, hogy a hsp90 is képes-e konformációjának megváltoztatására ATP hatására. A 25. és 26. ábrán bemutatott cirkuláris dikroizmus, illetve Fourier transzformált infravörös spektrumokból kitűnik, hogy ATP hozzáadásakor a hsp90 béta-redős szerkezeti részeinek aránya jelentősen (mintegy 20 %-kal) megnő (ld. melléklet 24-28 oldal). A hsp90 ATP-függő konformációváltozásának egyéb bizonyítékait a 93. oldalon található 25. táblázatban foglaltam össze. A melléklet 25. oldalán lévő 2-es, 3-as és 4-es ábrából kitűnik az is, hogy az ATP mellett vanadát, molibdát és hőhatás is képes megnövelni a hsp90 béta-redős szerkezetének arányát.



25. ábra A hsp90 cirkuláris dikroizmus spektruma (Csermely és mtsai, 1993/a; ld. melléklet 24. old.) Folyamatos vonal: hsp90; szaggatott vonal: hsp90 + 0.5 mM ATP, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; pont-vonal: hsp90 + 0.5 mM ATP, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ .



26. ábra hsp90 Fourier-transzformált infravörös spektruma ATP nélkül valamint 0.5 mM ATP és 10 mM  $\text{CaCl}_2$  jelenlétében (Csermely és mtsai, 1993/a; ld. melléklet 26. old.) Szaggatott vonal: Fourier-transzformált infravörös spektrum; folyamatos vonal: a fenti spektrum Fourier dekonvolúció után



*ATP-függő konformációváltozás*

cirkuláris dikroizmus	1. ábra, 1. táblázat
Fourier transzformált IR spektrum	5. ábra
triptofán fluoreszcencia	6. ábra, 2. táblázat
hidrofób jelleg/kötés	
Phe-Sepharose-hoz	7. ábra
limitált proteolízis	8. ábra

*Más, béta-redő gazdagodással járó folyamatok*

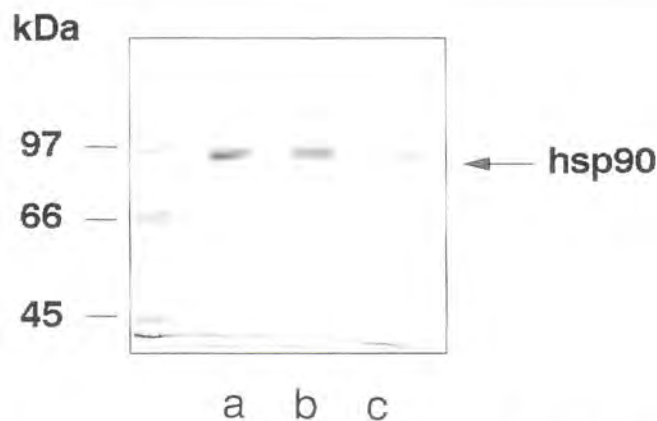
vanadát, molibdát	3. ábra, 4. ábra
hőhatás	2. ábra

25. táblázat A hsp90 konformációváltozását bizonyító kísérletek összefoglalása (Csermely és mtsai, 1993/a; ld. melléklet 24-27 old.)

## 5.2.3. A hsp90 autoproteolízise

A 90 kDa-os hő-sokk fehérjével folytatott kísérleteink során néhány alkalommal a fehérje részleges, vagy közel teljes proteolízise következett be. Az izolálás során a fehérje detektálására használt AC-88 antitest rendszeresen kimutatott egy kb. 40 kDa-os, a hsp90-nel immunológiai rokonságban álló fragmentumot (Csermely és Kahn, 1991; melléklet 16. old.). Sokáig nem tudtuk megtalálni azokat a körülményeket, amelyek a hsp90 proteolíziséhez vezettek, szisztematikus keresőmunkánk során azonban kiderült, hogy a fehérje proteolízise csak mintegy 0.5-1 órai latenciaperiódus után,  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében következik be. A proteolízis 37 fokon 3-4 óra után közel teljessé vált,  $\text{Ca}^{2+}$  ionok mellett  $\text{Mg}^{2+}$  ionok jelenlétében is lezajlott. A proteolízis mind EGTA, mind EDTA jelenlétében gátolhatónak bizonyult, de a nehézfémeket specifikusan megkötő tetrapiridil-etiléndiamin (TPEN) nem volt rá hatással. A nagytisztaságú hsp90 preparátum kalciumfüggő proteolízisére sem a szerin proteázgátló aprotinin, fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF) és leupeptin, sem a cisztein proteázokat blokkoló 5,5'-ditio-bisz-2-nitro-benzoosav (DTNB), N-etil-maleimid (NEM) és leupeptin, sem pedig a tripszin és kimotripszin inhibitorai nem voltak gátló hatással (Schneider T. és Csermely P., nem közölt adatok).

A fentiekből arra következtettünk, hogy a hsp90-nel asszociált proteolitikus aktivitás feltárt sajátosságai nem egyeznek meg egyetlen eddig ismert, "klasszikus" proteázaktivitás tulajdonságaival, így elképzelhető, hogy kísérleteinkben a hsp90-t nem egy "szennyező-proteáz" vágja el, hanem a fehérje (a hsp70 leírt autoproteolíziséhez hasonló -- ld. 11. táblázat, 41. old. Mitchell és mtsai, 1985) autoproteolízise zajlik le. Feltételezésünk megerősítésére a hsp90 preparátumot SDS-PAGE segítségével tovább tisztítottuk. A hsp90-et a denaturáló Coomassie festés helyett nátriumacetáttal detektáltuk (Higgins és Dahmus, 1979), majd a gélből kivágtuk. A proteolízist gátló SDS-t a hsp90-től Kameshita és Fujisawa (1989) módszere szerint guanidin-klo-



27. ábra A hsp90 kalciumfüggő proteolízise SDS-PAGE-n történő tisztítása és renaturációja után a: inkubálás EDTA jelenlétében 4 °C-on; b: inkubálás EDTA jelenlétében 37 °C-on; c: inkubálás  $\text{CaCl}_2$  jelenlétében 37 °C-on (a kísérlet leírását lásd a szövegben)

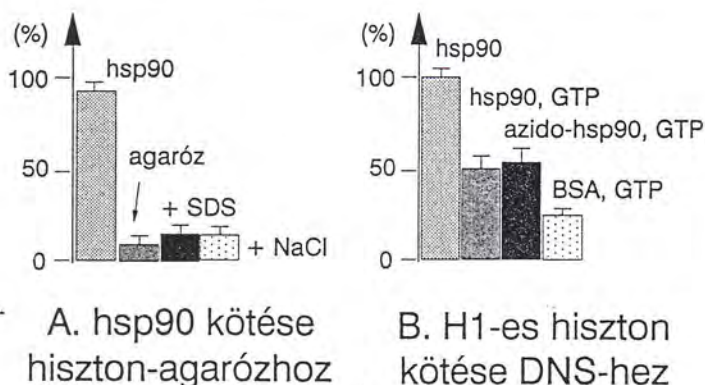
riddal és 0.08 % Tween 20-szal, más kísérletekben pedig a fehérje elektroelúciójával távolítottuk el. A hsp90 proteolízisét egy másodszori SDS-PAGE utáni Coomassie festéssel detektáltuk. Az SDS-PAGE-n tisztított és renaturált hsp90 4 órai inkubálás után bekövetkező proteolízisét a 27. ábrán mutatom be. Látható, hogy a kivágott géldarabokban "in situ" inkubált fehérje EDTA jelenlétében változatlanul megmarad. Ezzel szemben 10 mM  $\text{CaCl}_2$ -dal inkubálva a fehérje legnagyobb része lebomlik és a géldarabkából eltávozik. Hasonló eredményeket kaptunk az SDS-PAGE-n történő tisztítás után elektroeluált hsp90-nel is.

A hsp90 proteolízise a bemutatott kísérletben alkalmazott 10 mM-os kalciumkoncentrációnál jóval kisebb (1, 0.1 mM-os)  $[\text{Ca}^{2+}]$  esetén is hasonló mértékű volt. Sajnos a folyamat pontos kalciumfüggését a kipróbált kalciumkelátorok (EGTA, EDTA) aspecifikus gátló hatása miatt mindeztidáig kimérni nem tudtuk. A folyamat során felszabaduló amino-csoportok megjelenését fluoreszkaminnal detektáltuk (Böhlen és mtsai, 1973). Az amino-csoportok felszabadulásának kinetikája megegyezett a 90 kDa-os hsp90 "eltűnésének" időbeli változásával. A proteolízis még 80 fokon is meglehetősen hőstabil volt (Schneider T. és Csermely P., nem közölt adatok).

A hsp90-nel asszociált proteázaktivitás leginkább a kalpain(ok) aktivitásához hasonlított. A "szabályos" kalpainaktivitástól azonban megkülönbözteti az, hogy az enzimaktivitás leupeptinnel, NEM-mel és DTNB-vel nem gátlható, és magnézium jelenlétében is végbemegy (Croall és Demartino, 1991). A kalpainaktivitás kizárására tervezett további kísérleteinket a 7. fejezetben fogom ismertetni. Jelenlegi ismereteink alapján nagy valószínűséggel levonhatjuk azt a következtetést, hogy kísérleti körülményeink között a hsp90-nek a hsp70 autoproteolíziséhez hasonló (Mitchell és mtsai, 1985) autoproteolízise zajlik le.



## hsp90 kölcsönhatása hisztonokkal



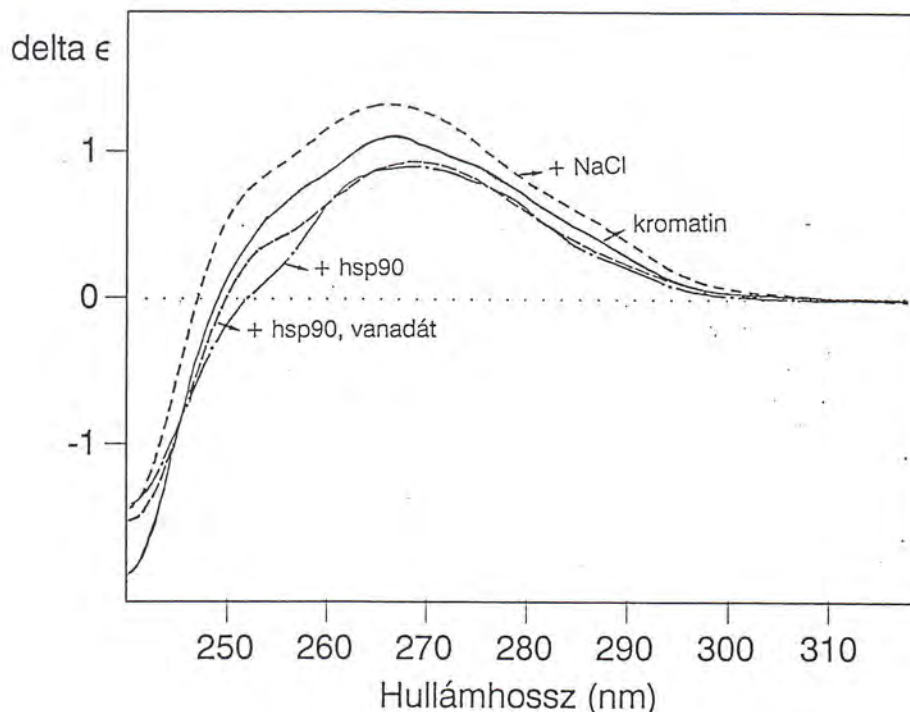
28. ábra A hsp90 kötődése hiszton-agarózhoz (A) és hatása a H1-es hiszton DNS-hez való kötődésére (B) A: a hsp90 kötődése hiszton-agarózhoz; a kötődést 50 mM-os Hepes, pH 7.4-es pufferben vizsgáltuk. 30 ug hsp90-et kötöttünk kb. 75 ug hisztont tartalmazó hiszton-agarózhoz (Sigma), a kötődés után a felülúszóban maradó hsp90-t SDS-PAGE utáni denzitometrállással határoztuk meg. (Az SDS és a NaCl koncentrációja 1 %, illetve 2 M volt.) B: a hsp90 hatása a H1-es hiszton DNS-hez való kötődésére; a H1-es hiszton DNS-hez való kötődését Nilsson és munkatársai (1992) szerint mértük. A bemutatott kísérletek 3 mérés átlagértékei  $\pm$  SD.

### 5.2.4. A hsp90 kölcsönhatásai a kromatinnal

A hsp90 autofoszforilációjának vizsgálata során számos erőfeszítést tettünk a fehérje által foszforilált szubsztrátok felderítésére. Az egyik lehetséges jelöltként szóba kerülő hiszton vizsgálatok során kiderült, hogy hisztonok megváltoztatják a hsp90 autofoszforilációjának kationfüggését: az autofoszforiláció kalciumfüggő folyamat helyett inkább magnéziumfüggő lesz (Csermely és Kahn, 1991; ld. melléklet 18. old.). Ez a megfigyelés vezetett el a hsp90 és a kromatin kölcsönhatásainak részletes tanulmányozásához.

Első lépésként azt igazoltuk, hogy a hsp90 direkt kölcsönhatásba lép a hisztonokkal. A 28. ábra A. részén bemutatott kísérletben a hsp90 erős kötődését lehetett megfigyelni hiszton agarózhoz. A mátrixként szerepelő agarózhoz a hsp90 nem kötődött különösebben, a hsp-hiszton kötés mind magas ionerősség, mind ionos detergensnek hatására megbonthatónak bizonyult (ld. 28/A. ábra).

A hiszton és a DNS kölcsönhatását Dr. Jouko Oikarinennel (Univ. of Oulu, Oulu Finnország) együttműködésben vizsgáltuk. Vizsgálatainkat elsősorban a hsp90 autofosz-



29. ábra A hsp90 hatása a patkánymáj-kromatin cirkuláris dichroizmus spektrumára A patkánymáj kromatint Noll (1974) módszere alapján preparáltuk. A cirkuláris dichroizmus méréseket 20 mM Hepes, 1 mM DTT, pH 7.0 médiumban, 1 cm-es küvettában végeztük. A DNS töménysége a 260 nm-en mért extinkció alapján számolva kb. 0.2 mg/ml volt, ehhez 1.2 M NaCl-ot és (külön kísérletben) 0.1 mg/ml hsp90-et, valamint 0.1 mM Na-vanadátot adtunk. A spektrumok a hozzáadott anyagokra (pl. hsp90) és a hígulásra korrigáltak. A bemutatott spektrumok három független mérés reprezentánsai.

forilációjának legnagyobb változását okozó H1-es hisztonnal végeztük (Csermely és Kahn, 1991; ld. melléklet, 18. old.). Nukleotidok távollétében a hisztonok affinitása a DNS-hez igen magas (Nilsson és mtsai, 1992). E magas affinitást (kísérleti körülményeink között: 100 %-os kötődést) a hsp90 nem csökkentette le számottevően. Annak a vizsgálatára, hogy a hsp90 vajon képes-e elősegíteni a hisztonok kötődését a DNS-hez, a kísérleteket 2 mM GTP-gamma-S jelenlétében is megismételtük (28/B. ábra). Mint látható, 10 ug hsp90 számottevően megnövelte a H1-es hiszton kötődését a DNS-hez a kontrollként alkalmazott azonos koncentrációjú BSA-hoz képest. Annak kizárására, hogy a hsp90 hatása a nukleotid elvonására vezethető vissza, a kísérletet megismételtük olyan hsp90 preparátummal is, amelynek a nukleotidkötőhelyét előzetesen azidoATP segítségével blokkoltuk. A nukleotid kötésére képtelen hsp90 a kontroll hsp90-nel azonos hatékonyságúnak bizonyult (28/B. ábra).

A fenti eredmények után arra a kérdésre kerestünk választ, hogy vajon milyen módon segítheti a hsp90 a hiszton(ok) kötődését a DNS-hez. E jelenség részletesebb tanulmányozásának első lépésként patkánymáj-kromatin cirkuláris dichroizmus mérésekkel történő vizsgálatát választottuk. A 240- től 300 nm-ig terjedő cirkuláris dichroizmus méréseket széleskörben alkalmazzák a kromatin szerkezetének, a hisztonok asszociációjának jellemzésére (Fasman, 1978). Méréseinket Dr. Hollósi Miklóssal és Dr.



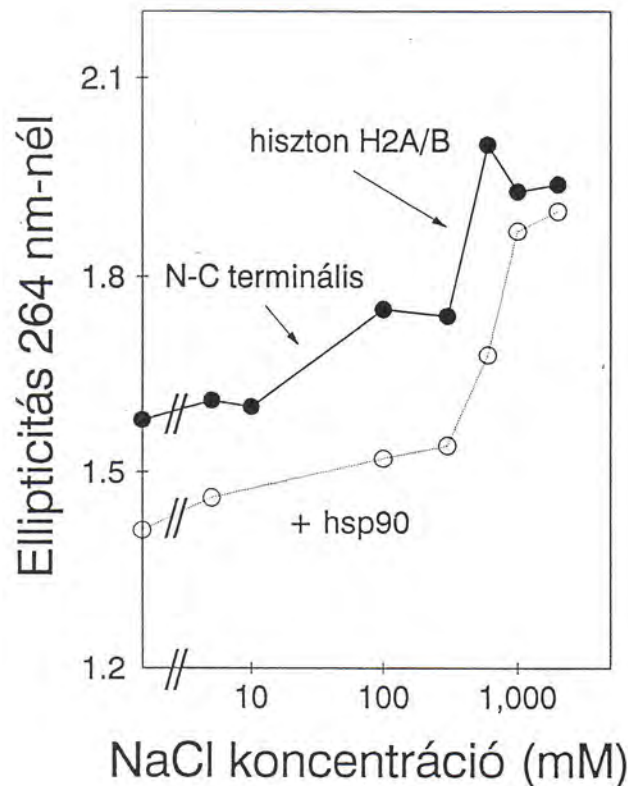
Minta	delta epsilon
DNS	1.53 $\pm$ 0.3
DNS + hiszton	1.49 $\pm$ 0.4
DNS + hiszton + hsp90	1.34 $\pm$ 0.3 (*)
DNS + hiszton + hsp90 + NaCl	1.48 $\pm$ 0.4

26. táblázat Borjú tímusz DNS cirkuláris dikroizmus spektrumának változása 274 nm-en hsp90 hatására A mérést a 29. ábra magyarázó szövegében leírtak alapján végeztük. A hozzáadott anyagok végkoncentrációi: DNS, 0.1 mg/ml; hiszton, 0.05 mg/ml; hsp90, 0.05 mg/ml; NaCl, 1.2 M. Az adatok három mérés átlagértékei  $\pm$  SD. (\*) = szignifikáns eltérés a DNS kontrolltól  $p < 0.005$  (Student féle t teszt).

Kajtár Mártonnéval (ELTE TTK, Szerves Kémiai Tsz.) együttműködésben végeztük. A 29. ábra adataiból kitűnik, hogy 0.6 M NaCl hatására a mért értékek számottevően megnövekednek, ami a hisztonoknak a DNS-ről való (részleges) disszociációjára, a kromatin dekonzenzációjára utal (Fasman, 1978). hsp90 hozzáadása ezzel szemben a kromatin kondenzációjához, azaz a 28/B. ábra adataival összhangban a hisztonok szorosabb kötődéséhez vezet. A túl nagy ultraibolya abszorpcióval rendelkező ATP helyett alkalmazott vanadát hatására a cirkuláris dikroizmus spektrum 255 nm körül egy lokális maximumot mutat, ami a hsp90 és a kromatin ATP-függő kölcsönhatásaira utalhat. Ez utóbbi jelenség okait egyelőre nem sikerült megfejtenünk.

A hsp90 hozzáadása 2 mM  $MgCl_2$  jelenlétében is a kromatin kondenzációjához vezetett. A hsp90-nek a hisztonok és a DNS asszociációjához vezető hatását tisztított borjú tímusz DNS (Sigma) és hisztonkeverék (Type II-S, Sigma) cirkuláris dikroizmus spektrumának vizsgálata során is kimutattuk (26. táblázat).

A hsp90 és a hisztonok kölcsönhatásainak pontosabb elemzésére a patkánymáj-kromatint NaCl-dal "megtitráltuk". A hsp90 jelenlétében, illetve távollétében végzett "titrálás" során kapott eredményeket a 30. ábrán mutatom be. Mint látható, a hsp90 mindvégig csökkent ellipticitás értékeket okozott, ami a kromatin szorosabb asszociációjára utal. A H2A/H2B hisztonok 0.95 M-os NaCl koncentrációnál bekövetkező disszociációja közel azonos mértékben zajlott le a hsp90 jelenlétében, illetve távollétében. Ezzel ellentétben a nukleoszómáknak kisebb NaCl koncentrációnál bekövetkező, a 9. ábrán (18. old.) bemutatotthoz hasonló, belső átrendeződése (feltételezhetően a hisztonok N,C-terminálisainak részleges disszociációja) mintha csökkentett mértékű lenne a hsp90 jelenlétében (Oohara és Wada, 1987).



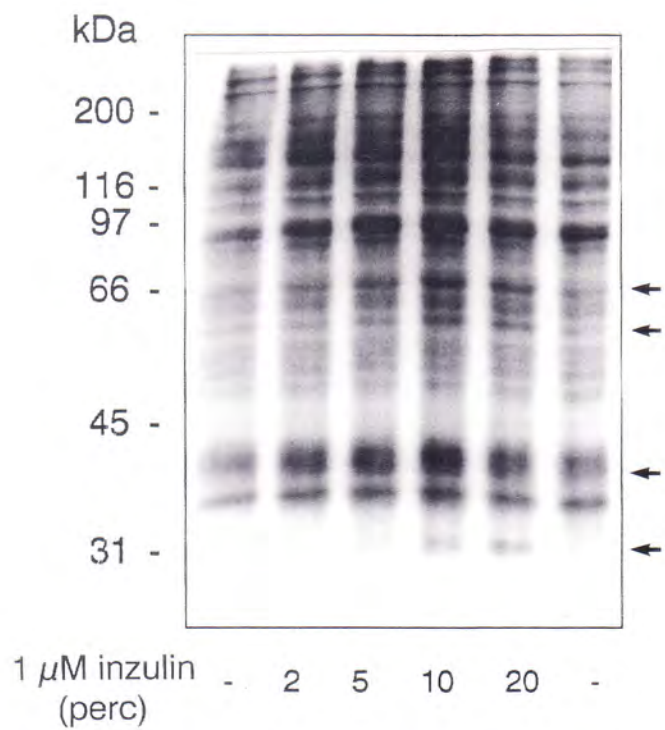
30. ábra Patkánymáj-kromatin 264 nm-nél mutatott cirkuláris dichroizmus maximumának változása NaCl hatására hsp90 távollétében és jelenlétében A mérést a 29. ábra magyarázó szövegében leírtak alapján végeztük.

### 5.3. Inzulinfüggő jelátviteli folyamatok a sejtmagban

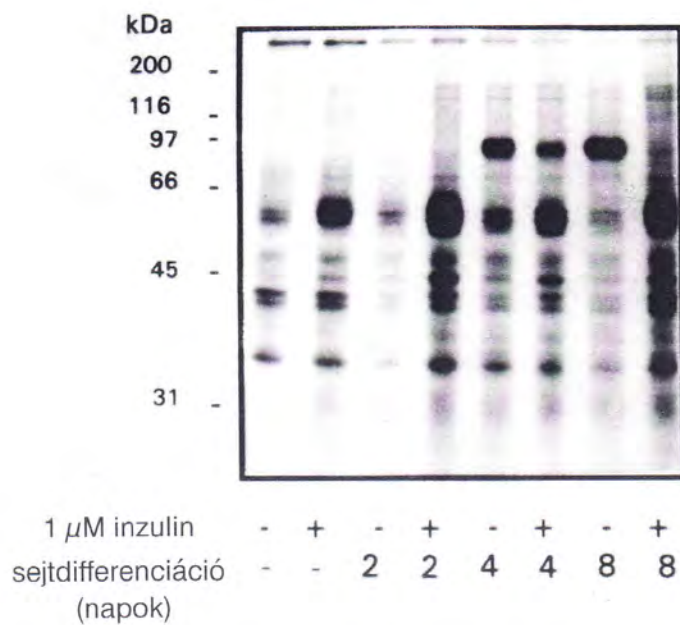
#### 5.3.1. Inzulin-indukált DNS-kötő foszfofehérjék a sejtmagban

A sejtmagbéli jelátviteli folyamatok vizsgálatának egyik hatékony módszere, ha a sejtmagban beállt "egyensúlyi" viszonyokat egy külső hatással megzavarjuk, és a hatás után bekövetkező változásokat vizsgáljuk. "Külső hatásként" célszerű olyan agonistát választanunk, amely közismerten képes a sejtmagbéli folyamatok befolyásolására. Kísérleteinkben, a növekedési hormon jellegű hatásokkal is rendelkező inzulin hatásait vizsgáltuk a sejtmagban lezajló folyamatokra. Mivel az inzulin hatásmechanizmusában az inzulin-receptor tirozin kináz által aktivált fehérjefoszforilációs kaszkád kiemelt szerepet tölt be (ld. 2.3.2. fejezet), kezdő lépésként a sejtmagban inzulin hatására bekövetkező fehérjefoszforilációt követtük nyomon. Vizsgálatainkat adipocitává differenciált 3T3-442A sejteken végeztük, amelyek felületükön nagymennyiségű inzulinreceptort tartalmaznak (Reed és mtsai, 1977). A SDS-PAGE-vel elválasztott sejtmagbéli foszfofehérjék képét a 31. ábrán mutatom be. Inzulin hatására leginkább 31, 38 és 60 kDa körüli fehérjék foszforilációja figyelhető meg. A 31 kDa-os fehérje bizonyos (sajnos nem kellő számban reprodukálható) kísérleteinkben azonosnak mutatott az S6 fehérjével. Ezzel egybevág az az adataink is, amelyek a sejtmagbéli S6 kináz aktivációját mutatják inzulin hatására (Csermely, P. és mtsai, nem közölt adatok). A 38 kDa körüli fehérje esetleg az inzulin hatására foszforilálódó,





31. ábra **Inzulinfüggő fehérjefoszforiláció adipocitává differenciált 3T3-442A sejtek sejtmagjában** A sejtek jelölését és a foszforiláció vizsgálatát a melléklet 31. oldalán leírtak alapján végeztük. Insulin koncentráció: 1 uM. A bemutatott kísérlet öt független vizsgálat reprezentánsa.



32. ábra **DNS-kötő fehérjék inzulinfüggő foszforilációja adipocitává differenciált 3T3-442A sejtekben** A sejtek jelölését, a DNS-kötő fehérjék elkülönítését és a foszforiláció vizsgálatát a 4.1. fejezetben, valamint a melléklet 31. oldalán leírtak alapján végeztük. Insulin-koncentráció: 1 uM. A bemutatott kísérlet hét független vizsgálat reprezentánsa.

DNS-kötő numatrinnak (B23; Feuerstein és Randazzo, 1991; Feuerstein és mtsai, 1990) felelhet meg, a 60 kDa körüli fehérjék azonosításáról a következő fejezetben fogok beszámolni.

Mint a 31. ábrán is látható, a sejtmag igen gazdag foszfofehérjékben, így az egydimenziós gél felbontása nem elég a folyamatok kielégítő elemzéséhez. További kísérleteinkben így két út állt előttünk: vagy az összes foszfofehérje nagyobb felbontású elválasztásával nyert analízisét végezzük el, vagy izoláljuk a foszfofehérjék azon részét, amelyek számunkra igazán fontosak. A DNS-kötő fehérjék izolálásával (ld. melléklet 31. old. és 4.1. fejezet) az utóbbi lehetőséget választottuk. Az inzulin hatására foszforilálódó DNS-kötő fehérjék képét a 32. ábrán mutatom be. Látható, hogy inzulin hatására 34, 40, 48, 62-68 kDa körüli DNS-kötő fehérjék foszforilációja és egy 94 kDa körüli fehérje defoszforilációja következik be. A 34, 40, 48 és 62-68 kDa körüli fehérjék hasonlóan indukált foszforilációját figyeltük meg alacsonyabb (fiziológias) inzulinkoncentrációk esetén is (ld. melléklet, 33. old.). A 40 kDa körüli fehérje lehetséges, hogy az inzulin hatására foszforilálódó, DNS-kötő numatrinnak (B23; Feuerstein és Randazzo, 1991; Feuerstein és mtsai, 1990) felel meg, a 62-68 kDa körüli fehérjék egyike bizonyos --más alkalmakkor sajnos nem reprodukálható-- kísérleteinkben a szérum response faktornak (SRF) bizonyult (Csermely, P. és Kahn, C.R., nem közölt adatok), a többi 62-68 kDa körüli és a 94 kDa-os fehérje azonosításáról a következő két fejezetben fogok beszámolni.

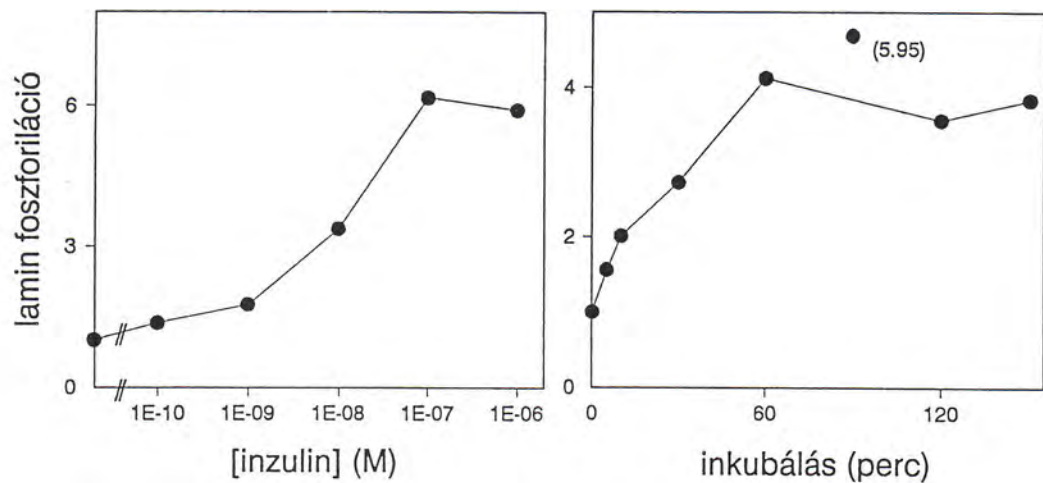
### 5.3.2. A lamin A és C inzulinfüggő foszforilációja

A 32. ábrán látható 62-68 kDa körüli fehérjék azonosítása során egyik első "tip-pünk" a sejtmagban nagy mennyiségben előforduló, DNS-kötő, hasonló elektroforetikus mozgékonyaságú lamin-család volt. A megfelelő antitestek beszerzése után kiderült, hogy valóban, a 62-68 kDa körül megfigyelhető, inzulin hatására foszforilálódó fehérjék jelentős része a lamin C-vel azonos (Csermely és Kahn, 1992; melléklet 34. old.). Néhány kísérletben egy 72 kDa-os laminszerű fehérje foszforilációját is megfigyeltük, amely minden valószínűség szerint a lamin A-nak felelt meg (ld. melléklet 34. old.). A különböző specificitású antitestek immunprecipitátumai és immunoblotjai összehasonlításával kiderült, hogy a lamin A és C-vel ellentétben a lamin B inzulinfüggő foszforilációja nem következik be 3T3-442A sejtekben. A lamin A és C foszforilációjának idő- és koncentrációfüggését a 33. ábrán mutatom be. Mint látható, a foszforiláció az inzulin fiziológias koncentrációnál zajlik le, és kb. 1 órát igényel maximális kifejlődéséhez. Eredményeink jó összefüggésben vannak Friedman és Ken (1988) megfigyeléseivel, akik a lamin A és C (de nem a lamin B) fokozott foszforilációját észlelték hőrscögembrió vese fibroblasztokon (BHK-21 sejteken) inzulinkezelés után.

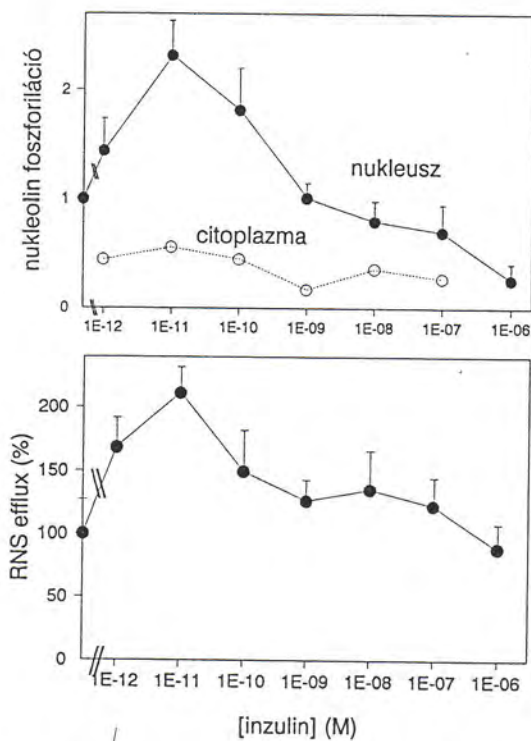
### 5.3.3. A nukleolin inzulinfüggő foszforilációja és defoszforilációja mint a sejtmagbeli inzulinfüggő rRNS-transzport lehetséges mechanizmusa

A 32. ábra másik jellegzetes fehérjéje 94 kDa körüli molekulatömeggel jellemezhető. Mikromólos koncentrációjú inzulin hatására a fehérje defoszforilációja zajlik le (ld. 32. ábra). A 62-68 kDa-os fehérjék laminokként való azonosítása után kézenfekvő volt, hogy a 94 kDa-os fehérje is a sejtmag egy másik, szintén nagy mennyiségben je-





33. ábra A lamin A/C inzulinfüggő foszforilációja (Csermely és Kahn, 1992 nyomán; ld. melléklet 34. oldal)



34. ábra A nukleolin foszforilációjának és a sejtmag rRNS transzportjának változásai az inzulin koncentráció függvényében (Csermely és Mtsai, 1993/b; ld. melléklet 39-54 old.) Az adatok 4 (foszforiláció), illetve 3 (RNS efflux) kísérlet átlagai  $\pm$  SD.

lenl v , DNS kötő fe  rj  vel azonos. Egyik kezdeti  tlet nk nt a sejtmagvacskában nagymennyiségben előforduló nukleolint (C23, ld. 2.2.3. fejezet) vizsgáltuk. Kísérleteinkben a 32.  bra 94 kDa körüli fe  rj   a nukleolinnal azonosnak bizonyult (ld. melléklet 41, 42 és 52 oldalak). A részletesebb vizsgálatok során kiderült, hogy kis (szubnanom los) inzulinkoncentrációk esetén a nukleolin foszforilációja, m g mikromólos inzulinkoncentráció hatására a 32.  br n is megfigyelhető defoszforilációja következik be (ld. 34.  bra). A nukleolin foszforilációjával a sejtmag rRNS efflux nak inzulinkoncentráció függése "kísérteties" egyezést mutatott (34.  bra). A görbék nagymértékben hasonló lefutása arra enged következtetni, hogy a riboszomális RNS transzportjában részt vevő nukleolin foszforilációja lehet az a(z egyik) folyamat, ahol az inzulin az rRNS transzportját szabályozza. Sajnos azok a kísérletek, amelyeket feltételezésünk közvetlen igazolására kitaláltunk (az rRNS transzport blokkolása nukleolin ellenes antitesttel, közös inhibitorok keresése, stb.) nem jártak sikerrel.

A nukleolin mikromólos inzulinkoncentrációk esetén megvalósuló defoszforilációját az inzulin minden bizonnyal az IGF-1 receptorral keresztreakciót adva idézi elő, a szubnanom los koncentrációkban megvalósuló foszforilációért pedig nagy val sz n s g el az inzulin hatására aktiválódó kazein kináz II felelős (ld. melléklet 51. old.). Igy könnyen elk pz lhet , hogy az inzulin és az IGF-1 hatására aktiválódó sejtmagbéli jelátviteli folyamatok a sejtmagon belül kompartmentaliz ltak és (legalábbis a nukleolin vonatkozásában) egymással ellentétes hatást id znek elő (ld. melléklet 51. old.). E jelenség részletesebb vizsgálata további kísérleteink tárgyát képezi (ld. 7. rész).



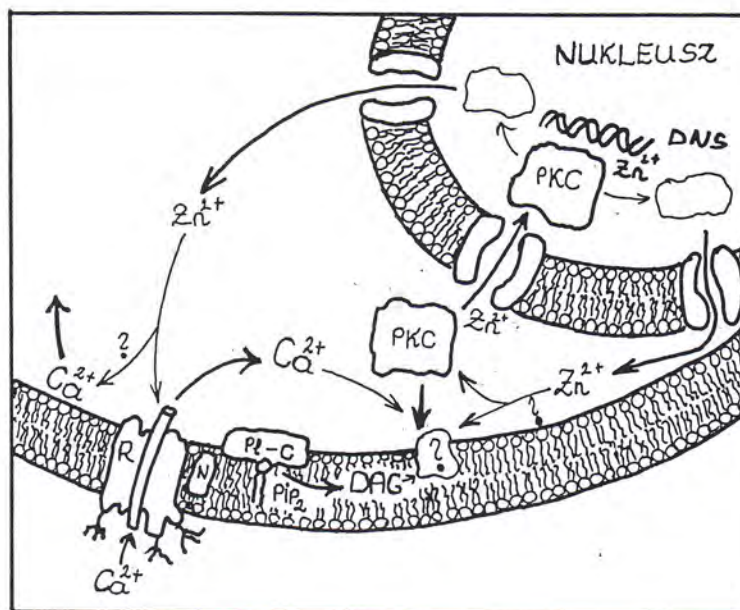
## 6. Az eredmények megbeszélése

### 6.1. A fehérje kináz C tartós aktivációja, mint a citoplazma és a sejtmag közötti jelátvitel egy lehetséges példája

Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy cink ionok hatására a fehérje kináz C aktivációja következik be és hogy a cink ionok szükségesek a fehérje kináz C sejten belüli átrendeződéséhez, transzlokációjához (Csermely és mtsai, 1988/a; ld. melléklet 1-4. oldal). Eredményeinket megjelenésük óta az irodalomban számos kutatócsoport igazolta. Forbes és munkatársai különböző sejteken igazolták, hogy cinkionok segítik a fehérje kináz C transzlokációját a sejtek detergensben nem oldható (következtetéseik szerint citoskeletális) régiójába (Forbes és mtsai, 1990/a, Zalewski és mtsai, 1990). Baba és munkatársai (1991) szinaptoszómákon észlelték a cink-kelátor TPEN fehérje kináz C transzlokációt gátló hatását. Több munkacsoport bizonyította, hogy a fehérje kináz C forbol észter kötő és cink kötő régiója szerves egységet képez egymással (Ono és mtsai, 1989; Ahmed és mtsai, 1991), valamint hogy cinkionok megnövelik a fehérje kináz C forbolészter-kötő képességét (Forbes és mtsai, 1989; 1990/b). Kevésbé egyértelmű a kép a fehérje kináz C cinkionok által történő aktiválásában. Kadmium és ólom a cinkhez hasonlóan a fehérje kináz C koncentrációfüggő aktiválását okozza (Mazzei és mtsai, 1984; Markovac és Goldstein, 1988). Murakami és munkatársai (1987) kísérleteinkkel megegyezően az enzim aktiválásáról számoltak be cink hatására, míg Saijoh és munkatársai (1988), valamint Speizer és munkatársai (1989) a cinkionoknak csak nagy koncentrációjában jelentkező gátló hatását tudták kimutatni. A két utóbbi munkacsoport és saját eredményeink közötti eltérés okára egyelőre rájönünk nem sikerült.

Eredményeink diszkussziója során két fontosabb kérdés maradt nyitva: 1. vajon mekkora az a *szabad* cink koncentráció, amely hatására a fenti folyamatok lejátszódnak; hogyan viszonyul ez az *in vivo* mérhető intracelluláris szabad cink koncentrációhoz, vajon változik-e a sejten belüli szabad cink koncentráció különböző stimulusok hatására, azaz összefoglalólag: van-e a kapott eredményeknek tényleges fiziológiai jelentősége? 2. fenti eredményeinket a fehérje kináz C aktiválódása során talált sejtmagbéli cink-koncentráció csökkenéssel és kalciumkoncentráció emelkedéssel (ld. 5.1.2. fejezet) összevetve felmerült a kérdés, hogy a cink szerepet játszik-e a fehérje kináz C-nek a sejtmagba történő átrendeződésében (Csermely, 1988; Csermely és Somogyi, 1989/a,b)?

Cinkionok sejten belüli szabad koncentrációjára mind a mai napig csak becslések adhatók. A mért vagy számolt értékek 0.02 nM-tól (Simons, 1991) 0.4 nM-on keresztül (Kirschenlohr és mtsai, 1988) 60 nM-ig (Forbes és mtsai, 1992) terjednek. A különbségek a különböző technikák mellett minden bizonnyal az extracelluláris cinkkoncentráció különbözőségéből is fakadnak. Látható, hogy a fehérje kináz C enzimaktivitását és forbol észter kötését növelő 5-15 nM-os cink koncentrációtartomány (ld. 5.1.1. fejezet) az intracelluláris cink koncentráció lehetséges értékeihez közel esik.



35. ábra A fehérje kináz C és a cink ionok kölcsönhatásai (Csermely és Somogyi, 1989/b nyomán) PKC = fehérje kináz C; R = receptor; N = GTP-kötő fehérje; PI-C = foszfolipáz C; PIP₂ = foszfatidil-inozitol-biszfoszfát; DAG = diacil-glicerol

Saját adataink szerint a fehérje kináz C aktivációja a  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  felvételének kb. 90 percnél tetőző megnövekedéséhez vezet egér timocitákban (Csermely és mtsai, nem közölt adatok). Forbes és munkatársai (1992) szerint T limfociták aktivációja során a sejten belüli szabad cinkkoncentráció számottevő növekedése figyelhető meg. Saját közvetett adataink is a szabad cinkkoncentráció növekedésére engednek következtetni timociták forbolészter-kezelése után (Csermely és Somogyi, 1989/a). A sejtek aktivációja során a cinkionoknak tehát mind a turnover, mind pedig a sejten belüli szabad koncentrációja megnő, ami arra utal, hogy a fehérje kináz C aktiválásában a cink ionok *in vivo* is szerepet játszhatnak.

Az 5.1.1. fejezetben bemutatott adataink szerint cink ionok elősegíthetik a fehérje kináz C-nek a sejtmagba való átrendeződését is. A fehérje kináz C és a cink ionok lehetséges kölcsönhatásait a 35. ábrán foglaltam össze. Az ábra szerint cink ionok szerepet játszanak a fehérje kináz C aktivációjában és transzlokációjában, az enzim aktivációja pedig a citoplazmatikus cinkkoncentráció megnövekedéséhez vezet. E két egymással szoros egységet képező folyamat ok-okozati összefüggéseit mindeztáig nem sikerült tisztázni, annyi azonban egyre bizonyosabbnak látszik, hogy a cinkionok valamiféle jelzőszerepet játszhatnak a sejten belül. Az eddigi adatok szerint a fehérje kináz C/cink kölcsönhatások a citoszolon kívül nem annyira a plazmamembránra, mint inkább a sejtmagra jellemzőek.



## 6.2. A hsp90 ATP-kötésének, autofoszforylációjának és autoproteolízisének lehetséges szerepe a fehérje funkciójában

### *ATP-kötés és autofoszforyláció*

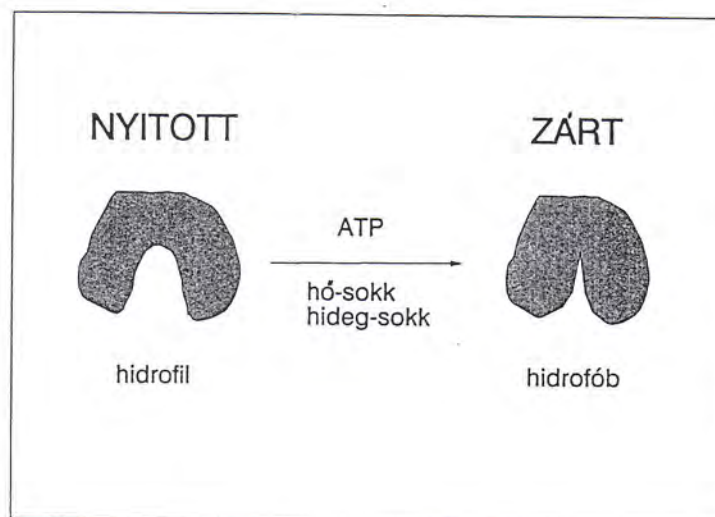
A hsp90 ATP-kötését és autofoszforylációját mutató adatainkat számos laboratóriumban megerősítették az elmúlt időszakban (Nadeau és mtsai, 1992; Ichiro Yahara, Tokyo Metropolitan Institute of Science; Keith Yamamoto, University of California, San Francisco; személyes közlés). Az ATP-kötés és az autofoszforyláció *fiziológiai jelentősége* mindeztidáig nem teljesen tisztázott. Hő-sokk, illetve számos más stressz (hypoxia, majd az azt követő oxidatív károsodás; mérgezések, stb.) esetén a sejten belüli kalciumkoncentráció növekedése és a pH csökkenése figyelhető meg (Weitzel és mtsai, 1985; Stevenson és mtsai, 1986; Landry és mtsai, 1988; Gasbarrini és mtsai, 1992). Ezek a változások kedveznek a hsp90 kalciumfüggő és kissé savas pH optimummal rendelkező autofoszforylációjának. Ugyanakkor kevésbé valószínű, hogy ezek a szorosan szabályozott sejten belüli koncentrációértékek annyira megváltoznak, amely lehetővé tenné, hogy a hsp90 meglehetősen nagy (inkább milimólos) kalciumkoncentrációk esetén tapasztalható autofoszforylációja (ld. 90. old. 23. ábra és melléklet 17. oldal) számottevő mértékben megtörténjen. Valószínűbbnek látszik, hogy a fehérje autofoszforylációjára ha valahol, akkor a sejtmagban kerül sor, ahol a vele kölcsönhatásba lépő hisztonok az autofoszforylációt magnézium ionok jelenlétében is lehetővé teszik (ld. melléklet 18. oldal és 5.2.4. fejezet). A jelenség részletesebb tárgyalására a 6.3. fejezetben fogok kitérni.

### *ATP hatására bekövetkező konformációváltozás*

A hsp90 ATP hatására bekövetkező konformációváltozásáról alkotott jelenlegi képünket a 36. ábrán foglalom össze. Az ATP koncentrációjának növekedése, a hőmérséklet jelentősebb emelése, vagy csökkentése mind a kétlebenyes struktúrával bíró hsp90 (Koyasu és mtsai, 1986) "nyílt" konformációból "zárt" konformációba való átmenetét okozza (Yamamoto és mtsai, 1991; Csermely és mtsai, 1993/a; melléklet 28. oldal). Ez a konformációs átmenet a hsp60 és a hsp70 hő-sokk fehérje családok tagjaihoz hasonlóan szerepet játszhat a hsp90 és más fehérjék asszociációjában. Hő-sokk, illetve más, a sejtet érő stresszes állapotok (pl. hypoxia) hatására a sejten belüli ATP koncentráció jelentős csökkenése figyelhető meg (Findly és mtsai, 1983; Gasbarrini és mtsai, 1992). A Mg-ATP-re nézve milimólos  $K_M$ -mel bíró hsp90 esetén (ld. melléklet 26. oldal) a sejten belüli ATP koncentráció kisebb változásai is a fehérje konformációjának megváltozásához vezethetnek. Ilyen módon a sejten belüli ATP koncentráció a sejt "rendellenes" állapotát más hő-sokk fehérjékkel együtt érzékelő hsp90 egyik szabályozó eszköze lehet.

### *Autoproteolízis*

Mint arra már a 2.2.1. és a 2.2.2. fejezetekben kitértem, a hő-sokk fehérjéket (molekuláris chaperonokat) igen sok szál köti a sejtekben lazajló proteolízishez. A hő-sokk fehérjék és a proteolitikus folyamatok kapcsolatát a 27. táblázatban foglalom össze. Mint látható számos hő-sokk fehérje maga is rendelkezik proteáz aktivitással (vagy ezzel "gyanúsítható"), jónéhány hő-sokk fehérje in vivo proteolitikus



36. ábra A hsp90 konformációváltozása (Csermely és mtsai, 1993/a alapján; ld. melléklet, 27. oldal)

fragmentumát sikerült kimutatni, ami a proteolitikus folyamatok esetleges szabályozó szerepére utal a hő-sokk fehérjék működésében és fordítva: a hő-sokk fehérjék (molekuláris chaperonok) részvétele elengedhetetlen az intracelluláris proteolitikus folyamatok szabályozásában.

Hő-sokk fehérje/proteolitikus folyamat	Irodalmi hivatkozás
<i>Hő-sokk fehérjék mint proteázok</i>	
<i>E.Coli</i> La	Goff és mtsai, 1984
<i>E.Coli</i> ClpP	Kroh és Simon, 1990
hsp70	Mitchell és mtsai, 1985
hsp27 (csak homológia)	Southgate és mtsai, 1983
hsp110 (csak homológia)	Parsell és mtsai, 1991
<i>In vivo hő-sokk fehérje fragmentumok</i>	
hsp70	Oster és mtsai, 1992
BiP (grp78)	Mertz és Pedersen, 1989
hsp90	Matthews és Burnie, 1989; Dhillon és mtsai, 1992
<i>Hő-sokk fehérjék részvétele a sejten belüli proteolízisben</i>	
<i>E.Coli</i> dnaK,dnaJ,grpE,groEL	Straus és mtsai, 1988
ubikvitin/ubikvitin konjugáló enzimek	Hershko és Ciechanover, 1992
hsp70	Chiang és mtsai, 1989

27. táblázat A hő-sokk fehérjék kapcsolata a proteolitikus folyamatokkal



A 90 kDa-os hő-sokk fehérjével asszociált proteolitikus aktivitásról az 5.2.3. fejezetben számoltam be. Az igen tiszta hsp90 preparátumok által is mutatott kalcium-függő proteázaktivitás leginkább a kalpain aktivitásához hasonlít. A hsp90 legalább három "PEST"-régiót tartalmazó (2-20, 257-271 és 699-727 aminosavak a Moore és mtsai -1989- által leírt hsp90-alfa szekvenciában), proteolitikus hasításra predesztinált fehérje, amely kiemelkedő labilitást mutató 15 és 16 közötti "PEST-FIND" értékkel rendelkezik (Rogers és mtsai, 1986). Kalmodulinkötése is a kalpain potenciális szubsztrátjai közé sorolja (Wang és mtsai, 1989; Nishida és mtsai, 1986). A hsp90-nel asszociált proteolitikus aktivitást a "szabályos" kalpainaktivitástól azonban megkülönbözteti az, hogy az enzimaktivitás leupeptinnel, NEM-mel és DTNB-vel nem gátolható, valamint az, hogy a proteolízis magnézium jelenlétében is végbemegy (Croall és Demartino, 1991). Így eddigi adataink arra utalnak, hogy kísérleteinkben a hsp90 autoproteolízise zajlott le.

A hsp90 autoproteolízise szerepet játszhat a hsp90 izolálása során rendszeresen megfigyelt 40 kDa-os, a hsp90-nel immunológiai rokonságban álló fehérje keletkezésében (ld. 93. old.). Hasonló, a hsp90-nel rokonságot mutató, 40 kDa-os fehérjét írtak le, mint az I-es típusú herpes simplex vírus utáni fertőzés, valamint Behcet-szindróma a hsp90 melletti (auto)-antigénjét (Dhillon és mtsai, 1992). A hsp90 egy másik fragmentum szerepel a candidosis antigénje gyanánt (Matthews és Burnie, 1989) és egy ugyancsak 40 kDa-os fehérje fragmentumot észleltek, mint a szteroidreceptorok sejtmagba jutását elősegítő "faktort" (Okamoto és mtsai, 1988), és az oxidatív környezetbe került szteroid holoreceptor (szteroidreceptor-hsp -komplex) újonnan jelentkező komponensét (Silva és Cidlowski, 1989).

A szteroidreceptorok transzformációjában proteolitikus folyamatok is szerepet játszanak (Grody és mtsai, 1982; ld. 2.2.4.2. fejezet, 48. old). A témával foglalkozó jókora irodalom mintegy fele különböző proteázgátlóknak és szubsztrátoknak a szteroidkötést és a transzformációt gátló hatását írja le (Baker és Fanestil, 1977; Puca és mtsai, 1986). Az eredmények ezen részét megítélésem szerint hasonló kritikával kell fogadnunk, mint a nehézfémkelátorokkal végzett kísérleteket (ld. 49. old.), mivel az erősen hidrofób inhibitor/szubsztrát anyagok a szteroidreceptorok és a velük asszociált hő-sokk fehérjék hidrofób zsebeibe "beülve" aspecifikus módon is gátolhatják a transzformációs folyamatokat. A szteroidreceptorok transzformációjának "proteolitikus elméletét" az utóbbi években meglehetősen népszerűtlenné tette a szteroidreceptor-hő-sokk fehérje komplex asszociációs és disszociációs folyamatai körül kibontakozó tudományos "miniforradalom". A holo-receptorral asszociált számos fragmentummal azonban mind a mai napig nem tudunk elszámolni (ld. 2.2.4.2. fejezet), ami tág teret enged a transzformációban szerepet játszó proteolitikus folyamatoknak. A szteroidreceptorral összefüggő proteolitikus aktivitás a szteroidhatás terminációjának is egyik lehetséges eszköze lehet.

A hsp90 által indukált proteolízis előkísérleteink tanulsága szerint a fehérjén kívül pl. a kazeinre és a H1-es hisztonra is kiterjed (Schneider T. és Csermely P., nem közölt adatok). A "hsp90-proteáz" további szubsztrátjai között az egyik legérdekesebb maga a szteroidreceptor lehet.

A szteroidreceptorral asszociált kalciumfüggő proteáz *in vitro* kísérletekben feltárt tulajdonságai nagymértékben megegyeztek a calpain katalitikus sajátjaival (Puca és mtsai, 1977; Vedeckis és mtsai, 1980; Croall és Demartino, 1991). A hsp90-nek a calpain-hoz hasonló katalitikus aktivitása lehetővé teszi, hogy *in vivo* a calpain mellett/helyett a hsp90 is részese lehessen a szteroidreceptorok proteolitikus transzformációjának.

### 6.3. A hsp90 kölcsönhatásai a kromatinnal

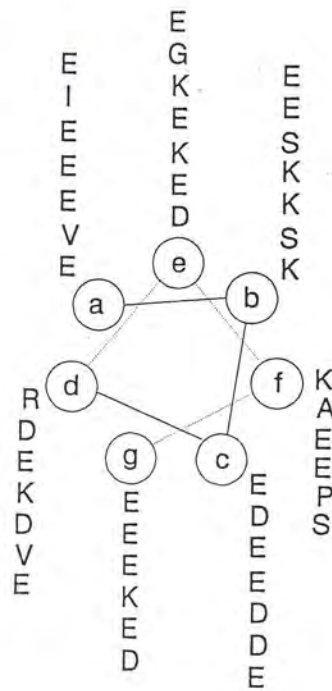
Kutatásaink jelenlegi szakaszában a hsp90 és a kromatin kölcsönhatásait értékelő megjegyzések óhatatlanul inkább (munka)hipotézis jellegűek, semmint egy kiterjedt kísérletsorozatot lezáró következtetések. Az 5.2.4. fejezetben és a melléklet 18. oldalán bemutatott kísérletek tanulsága szerint a hsp90 direkt kölcsönhatásba lép a hisztonokkal, amelynek eredményeként megváltozik a hsp90 autofoszforilációjának kationfüggése és a hisztonok erősebben kötődnek a DNS-hez. Az a tény, hogy a hsp90 autofoszforilációja hisztonok jelenlétében az *in vivo* nem előforduló milimólos kalciumkoncentráció helyett a fiziológias milimólos magnéziumkoncentráció esetén is lezajlik, arra enged következtetni, hogy a hsp90 által katalizált *in vivo* (auto)-foszforilációs folyamatok leginkább hisztonok (illetve más polikationok) jelenlétében mennek végbe. További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy a kromatin milyen szerepet játszhat a "hsp90-kináz" aktiválásában (ld. 7. fejezet).

A 96-97. oldalon ismertetett kísérletek tanulsága szerint hsp90 jelenlétében a kromatin kondenzációja zajlik le. Annak előrebocsátásával, hogy jelenlegi adataink csak más, független kísérletekkel összevetve (ld. 7. fejezet) adhatnak képet a kromatin szerkezetében hsp90 hatására lezajló változásokról, elmondhatjuk, hogy a hsp90 egy, a nukleoplazminéhoz hasonló molekuláris chaperone szerepet tölthet be a sejtmagban belül. Erre utalnak azok a kísérleteink, amelyben a hsp90 --a cirkuláris dikroizmus mérések tanulsága szerint-- tisztított ("pucér") DNS és hisztonkeverék összeállítását segítette elő (ld. 26. táblázat, 97. old.).

A nukleoszómak "összeállítását" segítő fehérjék (nukleoplazmin, numatrin, N1/N2, HMG1, stb.; ld. 12. táblázat, 44. old.) kivétel nélkül hosszabb, Glu-Asp oldalláncokat tartalmazó szekvenciával rendelkeznek (Earnshaw, 1987). A hsp90 hasonló szekvenciáját a 37. ábrán mutatom be. Látható, hogy a savas oldalláncokat tartalmazó alfa hélix-en a negatív töltések koncentráltan helyezkednek el, amely a hsp90-nek egy nukleoplazmin-jellegű hatást kölcsönözhet. Hasonló, "pszeudo-DNS" szerkezetet tételeztek fel Binart és munkatársai (1989) a csirke hsp90-nek a 37. ábrán bemutatottával átfedő részlete esetén.

A hsp90 azonban döntően citoplazmatikus fehérje. Lehet-e *in vivo* valóságtartalma tehát a hsp90 és a kromatin kölcsönhatását feltételező elméleteknek? A lehetséges válasz egyik fele abban rejtőzhet, hogy van a sejt életének olyan szakasza, a mitózis, ahol a citoplazma és a kromatin egymástól nem elszigetelten fordul elő. Megeshetik, hogy a hsp90 a mitózis folyamán segíti a kromoszómák kondenzált állapotá-

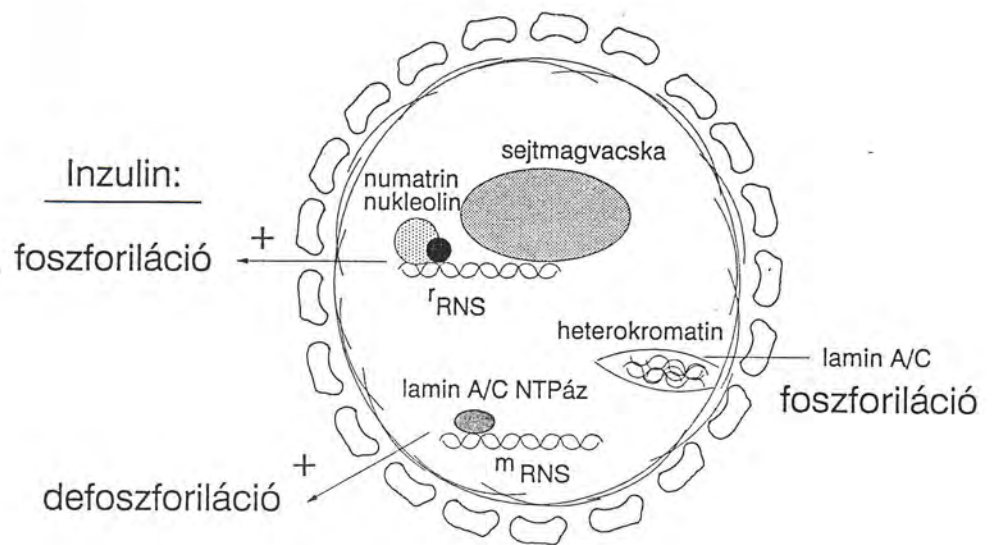




37. ábra "Poli-Glu"-szekvencia a hsp90 centrális domainjában Az ábrán a hsp90-alfa 222. és 270. aminosavak közötti, a Chou-Fasman predikció (Chou and Fasman, 1974) alapján alfa helikális szerkezetű részletét tüntettem fel. (Aminosavak sorrendje Moore és mtsai, 1989 szerint.)

nak fennmaradását. A másik alkalom, amikor a hsp90 a kromatin közelébe "keveredik" az, amikor a szteroidreceptorral együtt, a holo-receptor-komplex részeként a sejtmagba jut (ld. 2.2.4.2. fejezet). A hsp90 a hiszton-DNS kölcsönhatások erősítésével részt vehet a szteroid-válasz elem területén elhelyezkedő nukleoszómák korrekt pozícionálásában, illetve a szteroidhatás terminációjában is. Ebből a szempontból is érdekes, hogy a hsp90 leginkább a nukleoszóma "magját" alkotó H2/H3/H4 hisztonok, valamint a H1 hiszton terminális, "lifegő" régióival lép kölcsönhatásba (ld. 30. ábra, 97. old., valamint Csermely, P. és Oikarinen, J., nem közölt adatok). Az irodalomban egyre inkább elterjedő nézet szerint ezeket a "kilógó" hiszton régiókat tartják fontosnak a transzkripció faktorokkal (így a szteroidreceptorokkal) való kölcsönhatásban, kompetícióban is (Wolffe, 1992).

A hsp90 tehát mind a szteroidreceptor DNS-kötőhelyei közelében, mind pedig általánosan is részt vehet a kromatin szerkezetének fenntartásában, módosításában. Ugyan e hipotézis bizonyítása, részleteinek feltárása még számos kísérletet igényel (ld. 7. fejezet), de annyi már most is elmondható, hogy a hsp90 és a kromatin kölcsönhatásai a hő-sokk fehérjék és a sejtmagbéli molekuláris chaperonok működésének általános megértéséhez is hozzájáruló, új kutatási terület lehet.



38. ábra Inzulinfüggő folyamatok a sejtmagban: a lamin A/C és a nukleolin szerepe

#### 6.4. Inzulinfüggő jelátviteli folyamatok a sejtmagban

Az 5.3. fejezetben számos sejtmagbéli molekuláris chaperon, így a lamin A és C, a nukleolin (C23) és közvetve a numatrin (B23) inzulin hatására bekövetkező foszforilációját/defoszforilációját mutattam be. A 38. ábrán az inzulin lehetséges hatásait foglalom össze az e fehérjék által katalizált sejtmagbéli folyamatokra. Mint látható inzulin hatására mind az rRNS, mind az mRNS transzportja megnő. A transzport aspecifikus növekedésén kívül (ld. 2.1.2.1. fejezet, 10. old.) az mRNS transzport változásában a lamin C fragmentálódásával keletkezett nukleozid-trifoszfátáz defoszforilációja, az rRNS transzportjának növekedésében pedig minden bizonnyal a nukleolin foszforilációja játszik szerepet (ld. 2.1.2.3. fejezet, 15. old. és Csermely és mtsai, 1993/b). Egyelőre nem tisztázott, hogy a lamin A és C általunk is megfigyelt foszforilációjának van-e szerepe a lamin C fragmentálódásának elősegítésében, illetve az ennek eredményeként keletkező "mRNS-transzporter" nukleozid-trifoszfátáz aktiválásában. A 38. ábrán látható módon az rRNS és az mRNS inzulin hatására megnövekedő transzportjának utolsó aktiváló lépése egymással ellentétes (foszforilációs, illetve defoszforilációs) folyamat. E folyamatok inzulinfüggő fehérje kinázok és foszfofehérje foszfátázok egyidejű aktivációját feltételezik a sejtmagon belül. Ezen egymás ellen ható enzimek minden bizonnyal térbelileg elválasztva működnek a sejtmagban.

A lamin A és C inzulin hatására bekövetkező, a lamin B-t elkerülő szelektív foszforilációja (ld. 5.3.2. fejezet) minden bizonnyal összefüggésben áll azzal, hogy e két fehérje szerepet játszhat a sejtek differenciációjakor változó tartalmú és ter-



jedelmű heterokromatin "elkerítésében" (ld. 2.1.3.2. fejezet, 27. old.), hiszen inzulin hatására a 3T3-442A sejtek is differenciálódni képesek. A lamin A és C funkciójának és interfázisú foszforilációs állapotának összefüggéseit felderíteni még nem sikerült.

Az inzulin hatására foszforilálódó (defoszforilálódó), DNS-kötő fehérjék vizsgálatát abban a reményben kezdtük el, hogy sikerül megtalálnunk egy vagy több, az inzulin által indukált (represszált) génexpresszióért felelős transzkripció faktorot (ld. 4.1. fejezet). Bár nem kizárt, hogy az általunk leírt DNS-kötő foszfofehérjék között transzkripció faktorok (pl. a szérum response faktor, SRF; ld. 5.3.1. fejezet, 100. old.) is akadnak (Csermely és Kahn, 1992), elképzelhető az is, hogy az inzulinfüggő transzkripció faktorokat csak más megközelítéssel lehet megtalálni. Egyik ilyen megközelítés lehet, hogy az inzulin maga is transzkripció faktorként (transzkripció faktor részeként) viselkedik (Miller, 1988; Lin és mtsai, 1992). Ez annál is inkább valószínű, mivel az inzulin B lánc közös epitopot tartalmaz a glükokortikoid receptor DNS-kötő régiójával (Cayanis és mtsai, 1989). E feltételezéseket saját, nem közölt adatainkkal egybevetve, amelyek szerint inzulin hatására megnő a "szabad" (más fehérjével komplexet nem képző) hsp90 mennyisége elképzelhető, hogy a szteroidreceptorok analógiájára létezik egy nukleáris inzulinkötő receptor is, amely az endoszómákból "megszökött" inzulint (esetleg a hsp90 közreműködésével) eljuttatja a sejtmagba. A jelenség vizsgálatára tervezett kísérleteinket a 7. részben fogom összefoglalni.

#### 6.5. Eredményeinkből levonható általános következtetések

A sejtmaggal kapcsolatos kutatásainkban azokat a jelenségeket igyekeztünk megragadni, amelyek specifikusan a sejtmag jelátviteli folyamataira lehetnek jellemzőek. A sejtmag belseje a citoplazmától elkülönített tér, amelynek belső koncentrációviszonyait specifikus transzportfolyamatok szabályozzák. Másfelől a sejtmag belseje igen "tömör", magasrendűen szervezett. A DNS számos szakaszát a sejt összes többi molekulájától az különbözteti meg, hogy egyedi. Mind a sejtmag belsejében uralkodó helyhiány, mind az egyedi információ védelme szükségessé teszi a DNS "bepakolását". A replikáció és a transzkripció közben lezajló DNS "ki- és becsomagolás" elképzelhetetlen a folyamatot egyengető molekuláris chaperonok nélkül. Kutatómunkánk során így az alábbi két kérdésre kerestünk adekvát válaszokat (3. rész, 75. old.):

1. Mi szabályozza a sejtmag transzportfolyamatait, ezen belül különösen az ionok- és az RNS transzportját?
2. Hogyan járulnak hozzá a sejtmag molekuláris chaperonjai a sejtmagbeli jelátviteli folyamatokhoz?

Kísérleteink során több --javarészt közvetett-- bizonyítékot szereztünk a cinkionok esetleges szerepére a sejtmag jelátviteli folyamataiban. Eredményeink ugyancsak valószínűsítik, hogy az inzulin hatására megnövekedő rRNS transzportban egy sejtmagbeli molekuláris chaperon, a nukleolin foszforilációja játszhat szerepet. Kísérleteink tanulsága szerint inzulin hatására egy másik, ugyancsak az RNS transzportban részt vevő molekuláris chaperon hatású anyag, a lamin A és C foszforilációja is végbemegy.

Végezetül kezdeti eredményeink egy "klasszikus molekuláris chaperon", a 90 kDa-os hősokk fehérje, és a kromatin sokrétű kölcsönhatására utalnak. Eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a sejtmag a citoplazmában, plazmamembránban "megszokott" jelátviteli rendszereken túl (kálcium-metabolizmus, fehérjefoszforiláció, stb.) más mechanizmusokat --pl. cinkionokat-- is használhat a benne lezajló folyamatok szabályozására és hogy a sejtmagban található (pl. lamin, nukleolin), vagy oda bejutó molekuláris chaperonok (pl. hsp90) nélkülözhetetlen szerepet tölthetnek be a DNS és az RNS különböző jelátviteli folyamatok során lezajló reorganizációjában. Kísérleteink ezen általános tanulságai olyan kutatási irányokat jelölnek ki (cink ionok és molekuláris chaperonok szerepe a sejtmag jelátviteli folyamataiban), amelyek úttörő jellegűek.

#### 6.6. Az eredmények lehetséges orvostudományi vonatkozásai

A sejtmagban lezajló jelátviteli folyamatok vizsgálata során érintett három, egymással összefüggő terület mindegyike hozzásegíthet jelentős fiziológiai és patofiziológiai folyamatok megértéséhez. A cink nélkülözhetetlen szerepet tölt be a limfociták aktivációjában (Csermely és Somogyi, 1988). Intracelluláris koncentrációjának növekedése a limfociták aktivációjának hatására (Csermely és mtsai, 1987/a,b; Forbes és mtsai, 1992) arra enged következtetni, hogy a cink --a kálciumhoz hasonlóan-- a sejtkommunikáció egyik másodlagos messenger-e lehet. A fehérje kináz C aktivációjának általunk feltárt összefüggései a cink sejten belüli metabolizmusával fontos elemek lehetnek az elégtelen táplálkozás, a terhesség és az öregedés során megfigyelhető cink deficiencia következményeinek.

A hősokk fehérjéket egyre inkább, mint a szervezet legősibb, sejten belüli védekező ("immun") rendszerét kezdik számon tartani. A 2.2.5. fejezetben számos példát hoztam e fehérjék kitüntetett szerepére a fertőzések elleni küzdelemben, az autoimmun betegségekben és a különböző fiziológiás és afiziológiás károsodások kivédésében (Csermely és Somogyi, 1992). A 90 kDa-os hősokk fehérjének, mint a sejt egyik legnagyobb mennyiségben jelenlévő hősokk fehérjéjének általunk leírt két enzimatisz tulajdonsága (autofoszforilációja és autoproteolízise), csakúgy, mint a kromatinnal való kölcsönhatásainak megismerése alapvető jelentőségű lehet a szteroidreceptorok transzformációja, az általuk megvalósított transzaktiváció és a szteroidhatás terminációja molekuláris mechanizmusának megértésében. A hsp90 e biokémiai tulajdonságainak megismerése elvezethet bennünket a fehérjének a szteroidreceptorokon túlmutató, általános funkciójának megfejtéséhez is.

Az inzulinval kapcsolatos kutatásaink hozzájárulhatnak a II-es típusú diabetesz etiológiájának jobb megismeréséhez, következményeinek enyhítéséhez. Az elvégzett kísérletek gazdag tanulságából most csak a nukleolin foszforilációjának és az rRNS transzport aktivációjának egymáshoz igen hasonló koncentrációfüggését emelném ki. A két görbe közös vonása, hogy a folyamatok aktivációja az inzulin igen kis, 10 pM-os koncentrációja esetén mutat maximális értéket, 100 pM esetén pedig a folyamatok kb. félig aktiváltak (ld. 34. ábra, 101. old.). A szérumban mérhető éhezési inzulin-koncentráció általában 40 pM körüli értéket vesz fel, ez étkezés után 5-10-szeresére nő meg (Bajaj, 1977). Látható tehát, hogy az RNS-metabolizmussal kapcsolatos folyamatok éppen az inzulin kis, éhezési koncentrációi alkalmával aktívak (Purello és mtsai, 1983; Csermely és mtsai, 1993/b), míg az inzulin metabolikus hatásainak "bekapcsolá-



sával" (étkezés utáni inzulinkoncentrációk) e folyamatok inaktiválódása figyelhető meg. Noha az általunk tanulmányozott sejt kultúra rendszer minden bizonnyal igen távol áll az *in vivo* körülményektől, elképzelhető, hogy az inzulin hormonhatása nem csak "felülről", hanem "alulról" is szabályozott, más-más folyamatokat (növekedési hormon hatás és metabolikus hatások) aktiválva éhezési és étkezés utáni állapotokban. Bizonyos hatások, viselkedésbeli szokások (ismételt stressz, rendszeres fokozott fizikai aktivitás, stb.) az éhezési inzulinszint csökkenését vonják maguk után (Petrova és mtsai, 1990; Regensteiner és mtsai, 1991). Elképzelhető, hogy ilyenkor az inzulin növekedési hormon/metabolikus hormon hatásainak egyensúlya az első hatás-típus felé tolódik el.

## 7. A kutatás további irányai

Az értekezésben ismertetett kutatási irányok közül az elkövetkezendő időszakban a molekuláris chaperonok (hő-sokk fehérjék) hatásmechanizmusának további megismerésére és a sejtmag inzulinfüggő fehérjefoszforilációs folyamataira kívánjuk a hangsúlyt helyezni. Emiatt a cink metabolizmussal kapcsolatos kísérleti tervek közül csak a sejten (sejtmagon) belüli szabad cinkkoncentráció meghatározására kifejlesztett zinquin indikátor tesztelését tervezzük Dr. Ian G. Forbes-sel (Adelaide University, South Australia) együttműködésben.

A 90 kDa-os hő-sokk fehérjével kapcsolatos vizsgálataink során elsőként a fehérje proteázaktivitásának további jellemzését kívánjuk elvégezni. A hsp90 preparátumot esetleg szennyező calpain aktivitásának további kizárására vizsgálni kívánjuk a reakció rendűségét (nulladrendű reakció komoly ellenérv lenne a csaknem minden hsp90-t elbontó szennyező calpain jelenléte ellen) és specifikus calpain inhibitorok (calpastatin) hatását. A hsp90 preparátumban jelenlévő kalpainszennyezést (illetve ennek hiányát) specifikus antitestekkel és szekvenciameghatározással is tesztelni szeretnénk. Második lépésként fel szeretnénk deríteni a "hsp90-proteáz" esetleges szubsztrátjait. A már vizsgált kazein és hiszton mellett a szteroid receptor és a calpain egyik "kedvenc" szubsztrátja, a fehérje kináz C vizsgálatát tervezzük.

Széleskörű vizsgálatokat tervezünk a hsp90 és a kromatin kölcsönhatásainak részletes jellemzésére. A cirkuláris dikroizmus mérések folytatása mellett ú.n. "mini-chromosome assembly assay"-vel (cirkuláris DNS-hiszton keveréken szuperhelikális szerkezet indukálása) megvizsgáljuk, képes-e a hsp90 a nukleoplazminhoz hasonlóan a nukleoszómák korrekt "összeszerelésére" és micrococcus nukleázzal ellenőrizzük, hogy a kapott nukleoszómák periodicitása megfelel-e a natív kromatinban észleltnek. A folyamat nyomonkövetésére elektronmikroszkópos és differenciál scanning kalorimetriás méréseket is tervezünk. Eddigi kísérleteink kiegészítéseként vizsgálni kívánjuk miként hat a DNS/kromatin a hsp90 autofoszforilációjára, esetleges ATP-áz aktivitására és proteáz aktivitására.

A hsp90 és a kromatin kölcsönhatásainak további vizsgálataként Dr. Jouko Oikarinennel (University of Oulu, Finnország) és Dr. Miguel Beatoval (Philipps University Marburg, Németország) együttműködésben kísérleteket tervezünk arra, hogy részt vesz-e a hsp90 a szteroid válasz elem nukleoszómáinak korrekt pozicionálásában, illetve szerepet játszik-e a hsp90 "kináz és proteáz" aktivitása a szteroidreceptorok transzformációjában, transzaktiváló hatásában, illetve a szteroidhatás terminációjában. Elképzeléseink közé tartozik a sejtmag "spontán" újra-asszociációjának (nuclear reassembly) és e folyamatban a hsp90 szerepének vizsgálata is.



A 41. oldalon található 11. táblázat a 60, 70, 90 kDa hő-sokk fehérjék és aa sejtmag molekuláris chaperonjai (lamin A, C, nukleolin, numatrin) közötti számos --már bizonyított, illetve feltételezett-- analógiát tartalmaz. Ezek közül elsőként a primer struktúrája szerint ATP-kötőhelyekkel rendelkező nukleolin autofoszforilációját, ATP-áz aktivitását és denaturált fehérjéket renaturáló hatását kívánjuk megvizsgálni.

Az inzulinfüggő sejtmagbeli foszforilációs folyamatok vizsgálatának első lépéseként Dr. Kenneth Siddle-lel (Cambridge University, Anglia) együttműködésben további, inzulin hatására a sejtmagban foszforilálódó/defoszforilálódó fehérjék azonosítását tervezzük. Vizsgálni kívánjuk a folyamatokban részt vevő nukleáris fehérje kinázokat, foszfofehérje foszfatázokat és ezen enzimek szubnukleáris kompartmentalizációját is.

Dr. C. Ronald Kahn-nal (Joslin Diabetes Center, Harvard University, USA) együttműködésben tovább kívánjuk folytatni a kutatást az inzulinfüggő transzkripciós faktorok után. Kísérleteket tervezünk az inzulin-válasz-elemnek megfelelő oligonukleotidokkal való biotin-avidin-affinitáskromatográfiára inzulin és/vagy nukleosómává rekonstituált hisztonok jelenlétében. Az inzulin-válasz-elemhez kötő fehérjék detektálását a megfelelő oligonukleotidokkal végzett "gel-shift-" és "inverse-gel-shift-assay" (32-P fehérje a 32-P nukleotid helyett) segítségével is tervezzük. Reményeink szerint inzulinak az eddigi rendszerekhez történő hozzáadása elvezethet a hormon mindezidáig ismeretlen nukleáris receptorának felderítéséhez.

Tervezett kísérleteink listáját hosszú oldalakon keresztül tudnám még folytatni. Most mégis az olvasó elnézését kérem, hogy a tervezetést itt abbaszakasztom, hiszen már eddig is túlzottan visszaéltem a türelmével és tudatában vagyok annak is, hogy határtalan vágyaink véges lehetőségeinkkel való túlzott ütköztetése mindannyiunk egészségére káros hatást gyakorol. Ezt pedig egy orvostudományokhoz kötődő értekezés írója mindenképpen el szeretné kerülni. Lectori salutem.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Az értekezésben leírt tudományos eredmények megszületéséért az alábbiaknak szeretném kifejezni hálás köszönetem:

*Szüleimnek*

*Tanáraimnak*

*Mestereimnek:*

Somogyi Jánosnak  
Anthony N. Martonosi-nak és  
C. Ronald Kahn-nak

*Segítőtársaimnak:*

Mihály Katalinnak  
Schnaider Tamásnak  
Mandl Józsefnek  
Faragó Annának  
Sóti Csabának  
Iván Lászlónénak  
Szabó Csillának  
Bajkó Ágnesnek  
Holly Antalnak  
ifj. Gergely Péternek  
ifj. Fábián Tibornak és  
Michael Oke Sunday-nak

*Munkatársaimnak:*

Ádám-Vizi Veronikának  
Aszalos Adorjának  
Bálint Erzsébetnek  
Rene Buchetnek  
Bentley Cheathamnek  
Déri Zoltánnak  
Fodor Péternek  
Philip Grimleynek  
Gueth Sándornak  
Hollósi Miklósnak  
Holly Sándornak  
Jalovszky Györgynek  
Jóna Istvánnak



Kajtár Juditnak  
Kiss Annának  
Jouko Oikarinennek  
Patthy Andrásnak  
Radics Lajosnak  
Röhlich Pálnak  
Mitu Raynek  
Klaus Reschnek  
Rontó Györgyinek  
Sándor Péternek  
Steve Shoelsonnak  
Szamel Mártának  
Vér Ágotának  
Bonnie Wallacenek  
Morris Whitenak  
Kazunori Yamadanak és  
Giacomo Zoppininek

valamint mindazon hozzám közelállóknak, akik a kutatás örömeit és gyötrelmeit akar-  
va-akaratlanul velem megosztották.

## 9. Irodalomjegyzék

*[Az irodalmak gyűjtését 1993. február 15-én fejeztem be. Az előtaggal --de, van der, stb.-- rendelkező neveket az előtag szerint soroltam be az ABC sorrendbe.]*

1. Abate, C., Patel, L., Rauscher, F.J. III. és Curran, T. (1990) Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249, 1157-1161
2. Abravaya, K., Myers, M.P., Murphy, S.P. és Morimoto, R.I. (1992) The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes and Development* 6, 1153-1164
3. Adkins, B., Hunter, T. és Sefton, B.M. (1982) The transforming proteins of PRCII virus and Rous Sarcoma virus form a complex with the same two cellular phosphoproteins. *J. Virol.* 43, 448-455
4. Agoff, S.N., Hou, J., Linzer, D.I.H. és Wu, B. (1993) Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* 259, 84-86
5. Ahluwalia, N., Bergeron, J.J.M., Wada, I., Degen, E. és Williams, D.B. (1992) The p88 molecular chaperone is identical to the endoplasmic reticulum membrane protein, calnexin. *J. Biol. Chem.* 267, 10914-10918
6. Ahmed, S., Kozma, R., Lee, J., Monfries, C., Harden, N. és Lim, L. (1991) The cysteine-rich domain of human proteins, neuronal chimaerin, protein kinase C and diacylglycerol kinase binds zinc. *Biochem. J.* 280, 233-241
7. Akner, G., Sundqvist, K-G., Denis, M., Wikström, A-N. és Gustafsson, J-A. (1990) Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptor in human gingival fibroblasts and evidence for a colocalization of glucocorticoid receptor with cytoplasmic microtubules. *Eur. J. Cell Biol.* 53, 390-401
8. Akner, G., Mossberg, K., Sundqvist, K-G., Gustafsson, J-A. és Wikström, A-C. (1992) Evidence for reversible, non-microtubule and non-microfilament-dependent nuclear translocation of hsp90 after heat shock in human fibroblasts. *Eur J. Cell Biol.* 58, 356-364
9. Alberts, B. és Herrick, G. (1971) DNA-cellulose chromatography. *Meth. Enzymol.* 20, 198-217
10. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. és Watson, J.D. (1989) *Molecular biology of the cell*, Garland Publishing Inc., New York, second edition
11. Alder, G.M., Austen, B.M., Bashford, C.L., Mehlert, A. és Pasternak, C.A. (1990) Heat shock proteins induce pores in membranes. *Bioscience Rep.* 10, 509-518
12. Alemany, S., Puerta, J., Guadano, A. és Mato, J.M. (1990) Modulation of casein kinase II activity by the polar head group of an insulin-sensitive glycosyl-phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* 265, 4849-4852
13. Alexis, M.N., Mavridou, I. és Mitsiou, D.J. (1992) Subunit composition of the untransformed glucocorticoid receptor in the cytosol and in the cell. *Eur. J. Biochem.* 204, 75-84
14. Alfano, C. és McMacken, R. (1989/a) Ordered assembly of nucleoprotein structures at the bacteriophage lambda replication origin during the initiation of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 264, 10699-10708
15. Alfano, C. és McMacken, R. (1989/b) Heat shock protein-mediated disassembly of nucleoprotein structures is required for the initiation of bacteriophage lambda DNA replication. *J. Biol. Chem.* 264, 10709-10718



16. Allan, G.F., Leng, X., Tsai, S.Y., Weigel, N.L., Edwards, D.P., Tsai, M.-J. és O'Malley, B.W. (1992) Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. *J. Biol. Chem.* 267, 19513-19520
17. Amero, S.A., Kretsinger, R.H., Moncrief, N.D., Yamamoto, K.R. és Pearson, W.R. (1992) The origin of nuclear receptor proteins: a single precursor distinct from other transcription factors. *Mol. Endocrin.* 6, 3-7
18. Anastassova-Kristeva, M. (1977) The nucleolar cycle in man. *J. Cell Sci.* 25, 103-110
19. Ang, D., Liberek, K., Skowrya, D., Zylicz, M. és Georgopoulos, C. (1991) Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 24233-24236
20. Appelbaum, J., Blobel, G. és Georgatos, S.D. (1990) In vivo phosphorylation of the lamin B receptor. Binding of lamin B to its nuclear membrane receptor is affected by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 265, 4181-4184
21. Archer, T.K., Cordingley, M.G., Wolford, R.G. és Hager, G.L. (1991) Transcription factor access is mediated by accurately positioned nucleosomes on the mouse mammary tumor virus promoter. *Mol. Cell. Biol.* 11, 688-698
22. Atencio, D.P. és Yaffe, M.P. (1992) MASS, a yeast homolog of dnaJ involved in mitochondrial protein import. *Mol. Cell. Biol.* 12, 283-291
23. Auberger, P., Falquerho, L., Cpnteres, J.O., Pages, G., Le Cam, G., Rossi, B. és Le Cam, A. (1989) Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity. *Cell* 58, 631-640
24. Auricchio, F. (1989) Phosphorylation of steroid receptors. *J. Steroid Biochem.* 32, 613-6222
25. Auricchio, F. és Migliaccio, A. (1980) In vitro activation of estrogen receptor by nuclei. *FEBS Lett.* 117, 224-226
26. Auricchio, F., Migliaccio, A., Castoria, G., Lastoria, S. és Rotondi, A. (1982) Evidence that in vivo estradiol receptor translocated into nuclei is dephosphorylated and released into cytoplasm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 149-157
27. Ausio, J. (1992) Structure and dynamics of transcriptionally active chromatin. *J. Cell Sci.* 102, 1-5
28. Auwerx, J. és Sassone-Corsi, P. (1991) IP-1: a dominant inhibitor of fos/jun whose activity is modulated by phosphorylation. *Cell* 64, 983-993
29. Baba, A., Etoh, S. és Iwata, H. (1991) Inhibition of NMDA-induced protein kinase C translocation by a Zn chelator: implication of intracellular Zn. *Brain Res.* 557, 103-108
30. Bachs, O., Agell, N. és Carafoli, E. (1992) Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 259-270
31. Backer, J.M., Schroeder, G.G., Cahill, D.A., Ullrich, A., Siddle, K. and White, M.F. (1991/a) Cytoplasmic juxtamembrane region of the insulin receptor: a critical role in ATP binding, endogenous substrate phosphorylation, and insulin-stimulated bioeffects in CHO cells. *Biochemistry* 30, 6366-6372
32. Backer, J.M., Shoelson, S.E., Haring, E. és White, M.F. (1991/b) Insulin receptors internalize by a rapid, saturable pathway requiring receptor autophosphorylation and an intact juxtamembrane region. *J. Cell Biol.* 115, 1535-1545

33. Backer, J.M., Myers, M.G.Jr., Shoelson, S.E., Chin, D.J., Sun, X-J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E., Schlessinger, J. és White, M.F. (1992) Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J.* 11, 3469-3479
34. Backkesov, S., Aanstolt, H.-J., Christgau, S. Reetz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olesen, H. és Camilli, P-D. (1990) Identification of the 64 kDa autoantigen in insulin dependent diabetes as GABA synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 347, 151-156
35. Bagchi, M.K., Tsai, S.Y., Tsai, M-J. és O'Malley, B.W. (1991) Progesterone enhances target gene transcription by receptor free of heat shock proteins hsp90, hsp56, and hsp70. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4998-5004
36. Bagchi, M.K., Tsai, S.Y., Tsai, M-J. és O'Malley, B.W. (1992) Ligand and DNA-dependent phosphorylation of human progesterone receptor in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2664-2668
37. Baglia, F.A. és Maul, G.G. (1983) Nuclear ribonucleoprotein release and nucleoside triphosphatase activity are inhibited by antibodies directed against one nuclear matrix glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2285-2289
38. Bailer, S.M., Eppenberger, H.M., Griffiths, G. és Nigg, E.A. (1991) Characterization of a 54-kD protein of the inner nuclear membrane: evidence for cell cycle-dependent interaction with the nuclear lamina. *J. Cell Biol.* 114, 389-400
39. Bailly, E., Dorée, M., Nurse, P. és Bornens, M. (1989) p34cdc2 is located in both nucleus and cytoplasm; part is centrosomally associated at G2/M and enters vesicles at anaphase. *EMBO J.* 8, 3985-3995
40. Bajaj, J.S (1977) Insulin and metabolism. *Excerpta Med.* Amsterdam.
41. Baker, M.E. és Fanestil, D.D. (1977) Effect of protease inhibitors and substrates on deoxycorticosterone binding to its receptors in dog MDCK kidney cells. *Nature* 269, 810-812
42. Baldini, P.M., Zannetti, A., Donchenko, V., Dini, L. és Luly, P. (1992) Insulin effect on isolated rat hepatocytes: diacylglycerol -- phosphatidic acid interrelationship. *Biochim. Biophys. Acta* 1137, 208-214
43. Baler, R., Welch, W.J. és Voellmy, R. (1992) Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denaturated proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. *J. Cell Biol.* 117, 1151-1159
44. Baltensperger, K., Lewis, R.E., Woon, C-W., Vissavajhala, P., Ross, A.H. és Czech, M.P. (1992) Catalysis of serine and tyrosine autophosphorylation by the human insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7885-7889
45. Bardwell, J.C.A. és Craig, E.A. (1987) Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5177-5181
46. Batallí, N., Helser, T. és Fried, H.M. (1990) Cytoplasmic transport of ribosomal subunits microinjected into the *Xenopus laevis* oocyte nucleus: a generalized, facilitated process. *J. Cell Biol.* 111, 1571-1582
47. Becker, A.B. és Roth, R.A. (1990) Insulin receptor structure and function in normal and pathological conditions. *Annu. Rev. Med.* 41, 99-115
48. Beckmann, R.P., Mizzen, L.A. és Welch, W.J. (1990) Interaction of hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 248, 850-854
49. Beckmann, R.P., Lovett, M. és Welch, W.J. (1992) Examining the function and regulation of hsp70 in cells subjected to metabolic stress. *J. Cell Biol.* 117, 1137-1150



50. Beguinot, F., Smith, R.J., Kahn, C.R., Maron, R., Moses, A.C. és White, M.F. (1988) Phosphorylation of insulin-like growth factor I receptor by insulin receptor tyrosine kinase in intact cultured skeletal muscle cells. *Biochemistry* 27, 3222-3228
51. Behnke, J.A., Finch, C.E. és Moment, G.B. (1978) *The biology of aging*. Plenum Press, New York.
52. Bell, S.P. és Stillman, B. (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357, 128-134
53. Bellomo, G., Perotti, M., Taddei, F., Mirabelli, F., Finardi, G., Nicotera, P. és Orrenius, S. (1992/a) Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intranuclear free  $Ca^{2+}$  concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res.* 52, 1342-1346
54. Bellomo, G., Vairetti, M., Stivala, L., Mirabelli, F., Richelmi, P. és Orrenius, S. (1992/b) Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4412-4416
55. Benjamin, I.J., Kröger, B. és Williams, R.S. (1990) Activation of the heat shock transcription factor by hypoxia in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6263-6267
56. Benndorf, R., Hayess, K., Stahl, J. és Bielka, H. (1992) Cell-free phosphorylation of the murine small heat-shock protein hsp25 by an endogenous kinase from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1136, 203-207
57. Berezney, R. (1991) The nuclear matrix: a heuristic model for investigating genomic organization and function in the cell nucleus. *J. Cell. Biochem.* 47, 109-123
58. Biener, Y. és Zick, Y. (1990) Basic polycations activate the insulin receptor kinase and a tightly associated serine kinase. *Eur. J. Biochem.* 194, 243-250
59. Binart, N., Chambraud, B., Dumas, B., Rowlands, D.A., Bigogne, C., Levin, J.M., Garnier, J., Baulieu, E-E. és Catelli, M-G. (1989) The cDNA-derived amino acid sequence of chick heat shock protein Mr 90,000 (hsp 90) reveals a "DNA like" structure: potential site of interaction with steroid receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 140-147
60. Birch, B.D., Eng, D.L. és Kocsis, J.D. (1992) Intranuclear  $Ca^{2+}$  transients during neurite regeneration of an adult mammalian neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7978-7982
61. Bitar, K.N., Kaminski, M.S., Hailat, N., Cease, K.B. és Strahler, J.R. (1991) hsp27 is a mediator of sustained smooth muscle contraction in response to bombesin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 1192-1200
62. Blackshear, P.J. és Haupt, D.M. (1989) Evidence against insulin stimulated phosphorylation of calmodulin in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 264, 3854-3858
63. Blake, M.J., Udelsman, R., Feulner, G.J., Norton, D.D. és Holbrook, N.J. (1991) Stress-induced heat shock protein 70 expression in adrenal cortex: an adrenocorticotrophic hormone-sensitive, age-dependent response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9873-9877
64. Blancar, M.A. és Rutter, W.J. (1992) Interaction cloning: identification of a helix-loop-helix zipper protein that interacts with c-fos. *Science* 256, 1014-1018

65. Blank, T., Trendelenburg, M. és Kleinschmidt, J.A. (1992) Reactivation of DNA replication in erythrocyte nuclei by *Xenopus* egg extract involves energy-dependent chromatin decondensation and changes in histone phosphorylation. *Exp. Cell Res.* 202, 224-232
66. Blenis, J. (1991) Growth-regulated signal transduction by the MAP kinases and RSKs. *Cancer Cells* 3, 445-449
67. Bliss, M. (1982) The discovery of insulin. Univ. Chicago Press, Chicago, IL
68. Blobel, G. (1985) Gene gating: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8527-8529
69. Blobel, G. and Potter, V.R. (1966) Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science* 154, 1662-1665
70. Blumberg, H. és Silver, P.A. (1991) A homologue of the bacterial heat-shock gene *dnaJ* that alters protein sorting in yeast. *Nature* 349, 627-630
71. Bochkareva, E.S. és Girshovich, A.S. (1992) A newly synthesized protein interacts with groES on the surface of chaperonin groEL. *J. Biol. Chem.* 267, 25672-25675
72. Bochner, B.R., Zylicz, M. és Georgopoulos, C. (1986) *Escherichia Coli* dnaK protein possesses a 5'-nucleotidase activity that is inhibited by AppppA. *J. Bacteriol.* 168, 931-935
73. Bonne, D., Belhadj, O. és Cohen, P. (1978) Calcium as modulator of the hormonal-receptors-biological-coupling system. *Eur. J. Biochem.* 86, 261-266
74. Bonne-Andrea, C., Harper, F., Sobczak, J. és De Recondo, A-M. (1984) Rat liver HMG1: a physiological nucleosome assembly factor. *EMBO J.* 3, 1193-1199
75. Booher, R.N., Alfa, C.E., Hyams, J.S. és Beach, D.H. (1989) The fission yeast *cdc2/cdc13/suc1* protein kinase: regulation of catalytic activity and nuclear localization. *Cell* 58, 485-497
76. Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M. és Nigg, E.A. (1989) Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56, 379-390
77. Boylan, J.M., Brautigan, D.L., Madden, J., Raven, T., Ellis, L. és Gruppuso, P.A. (1992) Differential regulation of multiple hepatic protein tyrosine phosphatases in alloxan diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 90, 174-179
78. Böhlen, P., Stein, S., Dairman, W. és Udenfriend, S. (1973) Fluorometric assay of proteins in the nanogram range. *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 213-220
79. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
80. Brasch, K. és Ochs, R.L. (1992) Nuclear bodies (NBs): a newly "rediscovered" organelle. *Exp. Cell Res.* 202, 211-223
81. Breeuwer, M. és Goldfarb, D.S. (1990) Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. *Cell* 60, 999-1008
82. Bresnick, E.H., Dalman, F.C., Sanchez, E.R. és Pratt, W.B. (1989) Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 4992-4997
83. Bruchovsky, N., Rennie, P.S. és Vanson, A. (1975) Studies on the regulation of the concentration of androgens and androgen receptors in nuclei of prostatic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 394, 248-266
84. Brudzynski, K., Martinez, V. és Gupta, R.S. (1992) Secretory granule autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus is related to 62 kDa heat-shock protein (hsp60). *J. Autoimmunity* 5, 453-463



85. Brugge, J.S., Erikson, E. és Erikson, R.L. (1981) The specific interaction of the Rous Sarcoma virus transforming protein pp60src, with two cellular proteins. *Cell* 25, 363-372
86. Buckley, A.R., Crowe, P.D. és Haddock-Russel, D. (1988) Rapid activation of protein kinase C in isolated rat liver nuclei by prolactin, a known hepatic mitogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8649-8653
87. Bugler, B., Bourbon, H., Lapeyre, B., Wallace, M.O., Chang, J-H., Amalric, F. és Olson, M.O.J. (1987) RNA binding fragments from nucleolin contain the ribonucleoprotein consensus sequence. *J. Biol. Chem.* 262, 10922-10925
88. Burbach, K.M., Poland, A. és Bradfield, C.A. (1992) Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8185-8189
89. Burdett, E., Mills, G.B. és Klip, A. (1990) Effect of GTP-gamma-S on insulin binding and tyrosine phosphorylation in liver membranes and L6 muscle cells. *Am. J. Physiol.* 258, C99-C108
90. Burgering, B.M.T., Medema, R.H., Maassen, J.A., van de Wetering, M.L., van der Eb, McCormick, F. és Bos, J.L. (1991) Insulin stimulation of gene expression mediated by p21ras activation. *EMBO J.* 10, 1103-1109
91. Burglin, T.R., Mattaj, I.W., Newmeyer, D.D., Zeller, R. és De-Robertis, E.M. (1987) Cloning of nucleoplasmin from *Xenopus laevis* oocytes and analysis of its developmental expression. *Genes. Dev.* 1, 97-107
92. Burgoyne, R.D., Cheek, T.R., Morgan, A., O'Sullivan, A.J., Moreton, R.B., Berridge, M.J., Mata, A.M., Colyer, J., Lee, A.G. és East, J.M. (1989) Distribution of two distinct  $Ca^{2+}$ -ATPase-like proteins and their relationships to the agonist-sensitive calcium store in adrenal chromaffin cells. *Nature* 342, 72-74
93. Burke, B. és Gerace, L. (1986) A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* 44, 639-652
94. Burnside, J., Darling, D.S. és Chin, W.W. (1990) A nuclear factor that enhances binding of thyroid hormone receptors to thyroid hormone response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 265, 2500-2504
95. Callebaut, I., Renoir, J-M., Lebeau, M-C., Massol, N., Burny, A., Baulieu, E-E. és Mornon, J-P. (1992) An immunophilin that binds Mr 90,000 heat shock protein: main structural features of a mammalian p59 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6270-6274
96. Caltabiano, M.M., Poste, G. és Greig, R.G. (1988) Induction of the 32-kD human stress protein by auranofin and related triethylphosphine gold analogs. *Biochem. Pharmacol.* 37, 4089-4093
97. Cambier, J.C., Newell, M.K., Justement, L.B., McGuire, J.C., Leach, K.L. és Chen, Z.Z. (1987) Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes. *Nature* 327, 629-632
98. Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P.J. és Gierschik, P. (1992) Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta2 by G protein beta-gamma-subunits. *Nature* 360, 684-686
99. Capitani, S., Helms, B., Mazzoni, M., Previati, M., Bertagnolo, V., Wirtz, K.W.A. és Manzoli, F.A. (1990) Uptake and phosphorylation of phosphatidylinositol by rat liver nuclei. Role of phosphatidylinositol transfer protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1044, 193-200

100. Cardenas, M.E., Dang, Q., Glover, C.V.C. és Gasser, S.M. (1992) Casein kinase II phosphorylates the eukaryote-specific C-terminal domain of topoisomerase II *in vivo*. EMBO J. 11, 1785-1796
101. Carlino, A., Toledo, H., Skaleris, D., DeLisio, R., Weissbach, H. és Brot, N. (1992) Interactions of liver grp78 and *Escherichia Coli* recombinant grp78 with ATP: multiple species and disaggregation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2081-2085
102. Carpentier, J-L., Gorden, P., Barazzzone, P., Freychet, P., LeCam, A. és Orci, L. (1979) Intracellular localization of 125-I-labeled insulin in hepatocytes from intact rat liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2803-2807
103. Carson-Jurica, M.A., Schrader, W.T. és O'Malley, B.W. (1990) Steroid receptor family: structure and functions. Endocrin. Rev. 11, 201-220
104. Carter, K.C. és Bentley-Lawrence, J. (1991) DNA and RNA within the nucleus: how much sequence-specific spatial organization? J. Cell. Biochem. 47, 124-129
105. Carter, K.C., Taneja, K.L. és Bentley-Lawrence, J. (1991) Discrete nuclear domains of poly(A)RNA and their relationship to the functional organization of the nucleus. J. Cell Biol. 115, 1191-1202
106. Catelli, M.G., Binart, N., Jong-Testas, I., Renoir, J.M., Baulieu, E-E., Feramisco, J.R. és Welch, W.J. (1985) The common 90 kD protein component of "8S" steroid receptors is a heat shock protein. EMBO J. 4, 3131-3137
107. Cayanis, E., Sarangarajan, R., Lombes, M., Nahon, E., Edelman, I.S. és Erlanger, B.F. (1989) Identification of an epitope shared by the DNA-binding domain of glucocorticoid receptor and the B chain of insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2138-2142
108. Cedar, H. (1988) DNA methylation and gene activity. Cell 53, 3-4
109. Cegielska, A. és Georgopoulos, C. (1989) Functional domains of the *Escherichia Coli* dnaK heat shock protein as revealed by mutational analysis. J. Biol. Chem. 264, 21122-21130
110. Chambraud, B., Berry, M., Redeuilh, G., Chambon, P. és Baulieu, E-E. (1990) Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. J. Biol. Chem. 265, 20686-20691
111. Chan, B.L., Lisanti, M.P., Rodriguez-Boulant, E. és Saltiel, A.R. (1988/a) Insulin-stimulated release of lipoprotein lipase by metabolism of its phosphatidylinositol anchor. Science 241, 1670-1672
112. Chan, C.P., McNall, S.J., Krebs, E.G. és Fischer, E.H. (1988/b) Stimulation of protein phosphatase activity by insulin and growth factors in 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6257-6261
113. Chang, J-H., Dumbbar, T.S. és Olson, M.O.J. (1988) cDNA and deduced primary structure of rat protein B23, a nucleolar protein containing highly conserved sequences. J. Biol. Chem. 263, 12824-12827
114. Cheetham, M.E., Brion, J-P. és Anderton, B.H. (1992) Human homologues of the bacterial heat-shock protein dnaJ are preferentially expressed in neurons. Biochem. J. 284, 469-476
115. Chelsky, D., Sobotka, C. és O'Neill, C.L. (1989) Lamin B methylation and assembly into the nuclear envelope. J. Biol. Chem. 264, 7637-7643
116. Chen, C-M., Chiang, S-Y. és Yeh, N-H. (1991) Increased stability of nucleolin in proliferating cells by inhibition of its self-cleaving activity. J. Biol. Chem. 266, 7754-7758
117. Chen, R., Sarnecki, C. és Blenis, J. (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. Mol. Cell. Biol. 12, 915-927



118. Cheung, J.Y., Constantine, J.M. és Bonventre, J.V. (1987) Cytosolic free calcium concentration and glucose transport in isolated cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 252, C163-C172
119. Chiang, H.-L., Terlecky, S.R., Plant, C.P. és Dice, J.F. (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246, 382-385
120. Chida, K. és Vogt, P.K. (1992) Nuclear translocation of viral jun but not of cellular jun is cell cycle dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4290-4294
121. Chirico, W.J., Waters, M.G. és Blobel, G. (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332, 805-810
122. Chou, P.Y. és Fasman, G.D. (1974) Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* 13, 211-245
123. Ciavarra, R.P., Duvall, W. és Castora, F.J. (1992) Induction of thermotolerance in T cells protects nuclear DNA topoisomerase I from heat stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 166-172
124. Clairmont, C.A., De Maio, A. és Hirschberg, C.B. (1992) Translocation of ATP into the lumen of rough endoplasmic reticulum-derived vesicles and its binding to luminal proteins including BiP (grp78) and grp94. *J. Biol. Chem.* 267, 3983-3990
125. Clark, B.D. és I. R. Brown (1986) A retinal heat shock protein is associated with elements of the cytoskeleton and binds to calmodulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 974-981
126. Clarke, C.F., Cheng, K., Frey, A.B., Stein, R., Hinds, P.W. és Levine, A.J. (1988) Purification of complexes of nuclear oncogene p53 with rat and *Escherichia Coli* heat shock proteins: in vitro dissociation of hsc70 and dnaK from murine p53 by ATP. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1206-1215
127. Clawson, G.A., Lackey, A. és Tokes, Z.A. (1988) The 46-kDa nucleoside triphosphatase of rat liver nuclear scaffold represents the N-terminal portion of lamins A/C. *Exp. Cell Res.* 176, 180-186
128. Clawson, G.A., Norbeck, L.L., Hatem, C.L., Rhodes, C., Amiri, P., McKerrow, J.H., Patierno, S.R. és Fiskum, G. (1992) Ca-regulated serine protease associated with the nuclear scaffold. *Cell Growth and Diff.* 3, 827-838
129. Cocco, L., Gilmour, R.S., Ognibene, A., Letcher, A.J., Manzoli, F.A. és Irvine, R.F. (1987) Synthesis of polyphosphoinositides in nuclei of Friend cells. Evidence for polyphosphoinositide metabolism inside the nucleus which changes with cell differentiation. *Biochem. J.* 248, 765-770
130. Cochet, C., Balogh, A., Chambaz, E.M. és Filhol, O. (1991) Activation of casein kinase II by phosphorylation in response to epidermal growth factor. *J. Cell. Biochem.* 15B, 121.
131. Cockerill, P.N. és Garrard, W.T. (1986) Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to an enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* 44, 273-282
132. Cohen, I.R. és Young, D.B. (1991) Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol. Today* 12, 105-110
133. Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 453-508
134. Colca, J.R., DeWald, D.B., Pearson, J.D., Palazuk, B.J., Laurino, J.P. és McDonald, J.M. (1987) Insulin stimulates the phosphorylation of calmodulin in intact adipocytes. *J. Biol. Chem.* 262, 11399-11402

135. Collier, N.C. és Schlessinger, M.J. (1986) The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts. *J. Cell Biol.* 103, 1495-1507
136. Colvard, D.S. és Wilson, E.M. (1984) Zinc potentiation of androgen receptor binding to nuclei in vitro. *Biochemistry* 23, 3471-3478
137. Cooper, J.A., Sefton, B. M. és Hunter, T. (1983) Detection and quantification of phosphotyrosine in proteins. *Meth. Enzymol.* 99: 387-402
138. Cotten, M. és Chalkey, R. (1987) Purification of a novel, nucleoplasmin-like protein from somatic nuclei. *EMBO J.* 6, 3945-3954
139. Cotten, M., Sealy, L. és Chalkey, R. (1986) Massive phosphorylation distinguishes *Xenopus laevis* nucleoplasmin isolated from oocytes or unfertilized eggs. *Biochemistry* 25, 5063-5069
140. Courtneidge, S. és Bishop, J.M. (1982) Transit of pp<sup>v-src</sup> to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7117-7121
141. Coussins, R.J. és Lee-Ambrose, L.M. (1992) Nuclear zinc uptake and interactions and metallothionein gene are influenced by dietary zinc in rats. *J. Nutr.* 122, 56-64
142. Craig, E.A. és Gross, C.A. (1991) Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends in Biochem. Sci.* 16, 135-140
143. Croall, D.E. és Demartino, G.N. (1991) Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 71, 813-847
144. Cromlish, J.A. és Roeder, R.G. (1989) Human transcription factor IIIc (TFIIIC). Purification, polypeptide structure, and the involvement of thiol groups in specific DNA binding. *J. Biol. Chem.* 264, 18100-18109
145. Crouch, M.F. (1991) Growth factor-induced cell division is paralleled by translocation of Gi-alpha to the nucleus. *FASEB J.* 5, 200-206
146. Crouch, M.F., Belford, D.A., Milburn, P.J. és Hendry, I.A. (1990) Pertussis toxin inhibits EGF-, phorbol ester- and insulin-stimulated DNA synthesis in BALB/c3T3 cells: evidence for post-receptor activation of Gi-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167, 1369-1376
147. Csermely, P. (1988) Kölcsönhatások a T limfociták jelátviteli rendszerei között: a cink ionok szerepe. Kandidátusi értekezés
148. Csermely, P. és Kahn, C.R. (1991) The 90 kDa heat shock protein (hsp-90) possesses an ATP-binding site and autophosphorylating activity. *J. Biol. Chem.* 266, 4943-4950
149. Csermely, P. és Kahn, C.R. (1992) Insulin induces the phosphorylation of DNA-binding nuclear proteins including lamins in 3T3-F442A cells. *Biochemistry* 31, 9940-9946
150. Csermely, P. és Somogyi, J. (1987) The possible pitfalls of the measurement of intracellular calcium concentration in T lymphocytes with the fluorescent indicator quin2. *Immunobiology* 174, 380-394
151. Csermely, P. és Somogyi, J. (1989/a) Tumor promoter 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) can reduce the Ca-transporting ability of Ca-ionophores in T lymphocytes. Involvement of intracellular heavy metal ions. *J. Cell Physiol.* 138, 593-602
152. Csermely, P. és Somogyi, J. (1989/b) Zinc as a possible mediator of signal transduction in T lymphocytes. *Acta Physiol. Hung.* 74, 195-199
153. Csermely, P. és Somogyi, J. (1992) Stressz fehérjék az orvostudományban. *Orvosi Hetilap* 133, 1347-1351



154. Csermely, P., Gueth, S. és Somogyi, J. (1987/a) The tumor promoter tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA) elicits the redistribution of zinc in subcellular fractions of rabbit thymocytes as measured by X-ray fluorescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 863-868
155. Csermely, P., Fodor, P. és Somogyi, J. (1987/b) The tumor promoter tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA) elicits the redistribution of heavy metals in subcellular fractions of rabbit thymocytes as measured by plasma emission spectroscopy. *Carcinogenesis* 8, 1663-1666
156. Csermely, P., Katopis, C. H., Wallace, B. A. and Martonosi, A. (1987/c) The E1 -> E2 transition of Ca-transporting ATPase in sarcoplasmic reticulum occurs without major changes in secondary structure. A circular dichroism study. *Biochem. J.* 241, 663-669
157. Csermely, P., Szamel, M., Resch, K. és Somogyi, J. (1988/a) Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 6487-6490
158. Csermely, P., Szamel, M., Resch, K. és Somogyi, J. (1988/b) Zinc increases the affinity of phorbol ester receptor in T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154, 578-583
159. Csermely, P., Sandor, P., Radics, L. és Somogyi, J. (1989) Zinc forms complexes with higher kinetical stability than calcium, 5F-BAPTA as a good example. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 838-844
160. Csermely, P., Balint, E., Grimley, P.M. and Aszalos, A. (1990) Protein kinase C is involved in the early signals of interferon-alpha but not of interferon-gamma in U937 cells. *J. Interferon Res.* 10, 605-611
161. Csermely, P., Kajtar, J., Hollosi, M., Jalsovszky, G., Holly, S., Kahn, C.R., Gergely, P. Jr., Soti, Cs., Mihaly, K. és Somogyi, J. (1993/a) ATP induces a conformational change of the 90 kDa heat shock protein (hsp-90). *J. Biol. Chem.* 268, 1901-1907
162. Csermely, P., Schnaider, T., Cheatham, B., Olson, M.O.J. és Kahn, C.R. (1993/b) Insulin induces the phosphorylation of nucleolin: a possible mechanism of insulin-induced RNA-efflux from nuclei. *J. Biol. Chem.* in press
163. Csordas, A. (1990) On the biological role of histone acetylation. *Biochem. J.* 265, 23-38
164. Cuatrecasas, P. (1972) Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1277-1281
165. Curran, T. és Franza, B.R. Jr. (1988) Fos and jun: the AP-1 connection. *Cell* 55, 395-397
166. Currie, R.W., Karmazyn, M., Kloc, M. és Mailer, K. (1988) Heat-shock response is associated with enhanced postischaemic ventricular recovery. *Circ. Res.* 63, 543-549
167. Cyr, D.M., Lu, X. és Douglas, M.G. (1992) Regulation of hsp70 function by a eukaryotic dnaJ homolog. *J. Biol. Chem.* 267, 20927-20931
168. Czech, M.P., Klarlund, J.K., Yagaloff, K.A., Bradford, A.P. and Lewis, R.E. (1988) Insulin receptor signalling. Activation of multiple serine kinases. *J. Biol. Chem.* 263, 11017-11020
169. Czech, M.P., Clancy, B.M., Pessino, A., Woon, C-W. és Harrison, S.A. (1992) Complex regulation of simple sugar transport in insulin-responsive cells. *Trends in Biochem. Sci.* 17, 197-201
170. Dalman, F.C., Bresnick, E.H., Patel, P.D., Perdew, G.H., Watson, S.J.Jr. és Pratt, W.B. (1989) Direct evidence that the glucocorticoid receptor binds to hsp90 at or near the termination of receptor translation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 264, 19815-19821

171. Dargemont, C. és Kühn, L.C. (1992) Export of mRNA from microinjected nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *J. Cell Biol.* 118, 1-9
172. Darnell, J., Lodish, H. és Baltimore, D. (1990) *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, W.H. Freeman and Co., New York, second edition
173. Davis, H.W. és McDonald, J.M. (1990) Insulin receptor function is inhibited by guanosine 5'-[gamma-thio]-triphosphate. *Biochem. J.* 270, 401-407
174. Davis, J.Q., Dansereau, D., Johnstone, R.M. és Bennett, V. (1986) Selective externalization of an ATP-binding protein structurally related to the clathrin-uncoating ATPase/heat shock protein in vesicles containing terminal transferrin receptors during reticulocyte maturation. *J. Biol. Chem.* 261, 15368-15371
177. Deguchi, Y., Negoro, S. és Kishimoto, S. (1988) Age-related changes of heat shock protein gene transcription in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 580-584
178. de Herreros, A.G., Dominguez, I., Diaz-Meco, M.T., Graziani, G., Cornet, M.E., Guddal, P.H., Johansen, T. és Moscat, J. (1991) Requirement of phospholipase C-catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine for maturation of *Xenopus laevis* oocytes in response to insulin and ras p21. *J. Biol. Chem.* 266, 6825-6829
179. Delhay, M., Gulbis, B., Galand, P. és Mairesse, N. (1992) Expression of 27-kD heat-shock protein isoforms in human neoplastic and nonneoplastic liver tissues. *Hepatology* 16, 382-389
180. DeMarzo, A.M., Beck, C.A., Onate, S.A. és Edwards, D.P. (1991) Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of the 90 kDa heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 72-76
181. Denis, M., Wikström, A.-C. és Gustafsson, J.-A. (1987) The molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid receptor contains a dimer of Mr 90,000 non-hormone-binding protein. *J. Biol. Chem.* 262, 11803-11806
182. Denis, M., Poellinger, L., Wikström, A.-C. és Gustafsson, J.-A. (1988) Requirement of hormone for thermal conversion of the glucocorticoid receptor to a DNA-binding state. *Nature* 332, 686-688
183. Denner, L.A., Weigel, N.L., Maxwell, B.L., Schrader, W.T. és O'Malley, B.W. (1990) Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science* 250, 1740-1743
184. Desai, K.S., Zinman, B., Steiner, G. és Hollenberg, C.H. (1978) Effect of calcium on 125-I-insulin binding to rat adipocytes. *Can. J. Biochem.* 56, 843-848
185. Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A. és Schekman, R. (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor molecules. *Nature* 332, 800-805
186. Deshpande, A.K. és Kung, H.-F. (1987) Insulin induction of *Xenopus laevis* oocyte maturation is inhibited by monoclonal antibody against p21 ras proteins. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1285-1288
187. Dessev, G., Iovcheva, C., Tasheva, B. és Goldman, R. (1988) Protein kinase activity associated with the nuclear lamina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2994-2998
188. deVries-Smith, A.M., Burgering, B.M., Leever, S.J., Marshall, C.J. és Bos, J.L. (1992) Involvement of p21ras in activation of extracellular signal-regulated kinase 2. *Nature* 357, 602-604



189. Dhillon, V., Studd, M., Isenberg, D., Lehner, T. és Latchman, D. (1992) Expression of the 90 kDa heat shock protein in Behcet's syndrome. *Autoimmunity* 12, 241-243
190. Dilworth, S.M. és Dingwall, C. (1988) Chromatin assembly *in vitro* and *in vivo*. *BioEssays* 9, 44-49
191. Dilworth, S.M., Black, S. és Laskey, R.A. (1987) Two complexes that contain histones are required for nucleosome assembly *in vitro*: role of nucleoplasmin and N1 in *Xenopus* egg extracts. *Cell* 51, 1009-1018
192. Dingwall, C. (1991) Transport across the nuclear envelope: enigmas and explanations. *BioEssays* 13, 213-218
193. Dingwall, C. és Laskey, R.A. (1986) Protein import into the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2, 367-390
194. Dingwall, C. és Laskey, R.A. (1991) Nuclear targeting sequences -- a consensus? *Trends in Biochem. Sci.* 16, 478-481
195. Dingwall, C. és Laskey, R.A. (1992) The nuclear membrane. *Science* 258, 942-947
196. Dingwall, C., Dilworth, S.M., Black, S.J., Kearsley, S.E., Cox, L.S. és Laskey, R.A. (1987) Nucleoplasmin cDNA sequence reveals polyglutamic acid tracts and a cluster of sequences homologous to putative nuclear localization signals. *EMBO J.* 6, 69-74
197. Divecha, N., Banfic, H. és Irvine, R.F. (1991) The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-1) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *EMBO J.* 10, 3207-3214
198. Dorner, A.J., Wasley, L.C. és Kaufman, R.J. (1990) Protein dissociation from grp78 and secretion are blocked by depletion of cellular ATP levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7429-7432
199. Dougherty, J.J., Rabideau, D.A., Ianotti, A.M., Sullivan, W.P. és Toft, D.O. (1987) Identification of the 90 kDa substrate of rat liver type II casein kinase with the heat shock protein which binds steroid receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 927, 74-80
200. Draznin, B., Kao, M. és Sussman, K.E. (1987) Insulin and glyburide increase cytosolic free-Ca concentration in isolated rat adipocytes. *Diabetes* 36, 174-178
201. Driessen, A.J.M. (1992) Bacterial protein translocation: kinetic and thermodynamic role of ATP and the protonmotive force. *Trends in Biochem. Sci.* 17, 219-223
202. Drouin, J., Sun, Y.L., Chamberland, M., Gauthier, Y., DeLean, A., Nemer, M. és Schmidt, T.J. (1993) Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J.* 12, 145-156
203. Dubois, P. (1989) Heat shock proteins and immunity. *Res. Immunol.* 140, 653-659
204. Duke, R.C., Chervenak, R. és Cohen, J.J. (1983) Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6361-6365
205. Duronio, V. és Jacobs, S. (1990) The effect of protein kinase C inhibition on insulin receptor phosphorylation. *Endocrinology* 127, 481-487
206. Dworetzky, S.I., Lanford, R.E. és Feldherr, C.M. (1988) The effects of variations in the number and sequence of targeting signals on nuclear uptake. *J. Cell Biol.* 107, 1279-1287
207. Dwyer, B.E. és Nishimura, R.N. (1992) Heat shock proteins in hypoxic-ischemic brain injury: a perspective. *Brain Pathol.* 2, 245-251

208. Earnshaw, W.C. (1987) Anionic regions in nuclear proteins. *J. Cell Biol.* 105, 1479-1482
209. Elias, D., Markovits, D., Reshef, T., van der Zee, R. és Cohen, I.R. (1990) Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lr) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1576-1578
210. Egan, J.J., Saltis, J., Wek, S.A., Simpson, I.A. és Londos, C. (1990) Insulin, oxytocin, and vasopressin stimulate protein kinase C activity an adipocyte plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1052-1056
211. Endemann, G., Yonezawa, K. és Roth, R.A. (1990) Phosphatidylinositol kinase or an associated protein is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 265, 396-400
212. Erard, M.S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A. és Amalric, F. (1988) A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur. J. Biochem.* 175, 525-530
213. Erikson, R.L. (1991) Structure, expression, and regulation of protein kinases involved in the phosphorylation of ribosomal protein S6. *J. Biol. Chem.* 266, 6007-6010
214. Espinal, J. (1988) What is the role of the insulin receptor tyrosine kinase? *Trends in Biochem. Sci.* 13, 367-368
215. Etindi, R. és Fain, J.N. (1989) Insulin does not activate a phosphoinositide-specific phospholipase C in adipocytes. *Mol. Cell. Endocrin.* 67, 149-153
216. Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895
217. Fan, C-M. és Maniatis, T. (1991) Generation of p50 subunit of NF- $\kappa$ B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature* 354, 395-398
218. Farese, R.V., Kuo, J.Y., Babischkin, J.S. és Davis, J.S. (1986) Insulin provokes a transient activation of phospholipase C in the rat epididymal fat pad. *J. Biol. Chem.* 261, 8589-8592
219. Farese, R.V., Standaert, M.-L., Arnold, T., Yu, B., Ishizuka, T., Hoffman, J., Vila, M. és Cooper, D.R. (1992) The role of protein kinase C in insulin action. *Cell. Signal.* 4, 133-143
220. Fargnoli, J., Kunisada, T., Fornace, A.J.Jr., Schneider, E.L. és Holbrook, N.J. (1990) Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and protein after heat treatment in cells of aged rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 846-850
221. Farkas, Gy., Buday, L., Csermely, P. és Faragó, A. (1993) Phosphorylation of lipocortin I by protein kinase C as a tool to investigate the formation and localisation of the Ca<sup>2+</sup>-lipocortin I complex in streptolysin-O-permeabilised pig granulocytes. *közlésre benyújtva.*
222. Fasman, G. (1978) Circular dichroism analysis of chromatin and DNA-nuclear protein complexes. *Meth. Cell Biol.* 18, 327-349
223. Faure, R., Baquiran, G., Bergeron, J.J.M. és Posner, B.I. (1992) The dephosphorylation of insulin and epidermal growth factor receptors. Role of endosome-associated phosphotyrosine phosphatase(s). *J. Biol. Chem.* 267, 11215-11221
224. Feavers, I.M., Jiricny, J., Monchamont, B., Saluz, H.P. és Jost, J.P. (1987) Interaction of two nonhistone proteins with the estradiol response element of the avian vitellogenin gene modulates the binding of estradiol-receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7453-7457



225. Feldherr, C.M. és Akin, D. (1990) EM visualization of nucleocytoplasmic transport processes. *Electron Microsc. Rev.* 3, 73-86
226. Fenton, R.G., Kung, H., Longo, D.L. és Smith, M.R. (1992) Regulation of intracellular actin polymerization by prenylated cellular proteins. *J. Cell Biol.* 117, 347-356
227. Ferrarini, M., Heltai, S., Zocchi, M.R. és Rugarli, C. (1992) Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int. J. Cancer* 51, 613-619
228. Ferris, D.K., Harel-Bellan, A., Morimoto, R.I., Welch, W.J. és Farrar, W.L. (1988) Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3850-3854
229. Feuerstein, N. (1991) Phosphorylation of numatrin and other nuclear proteins by cdc2 containing CTD kinase cdc2/p58. *J. Biol. Chem.* 266, 16200-16206
230. Feuerstein, N. és Mond, J.J. (1987) "Numatrin", a nuclear matrix protein associated with induction of proliferation in B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 262, 11389-11397
231. Feuerstein, N. és Randazzo, P.A. (1991) *In vivo* and *in vitro* phosphorylation studies of numatrin, a cell cycle regulated nuclear protein, in insulin-stimulated NIH 3T3 HIR cells. *Exp. Cell Res.* 194, 289-296
232. Feuerstein, N., Spiegel, S. és Mond, J.J. (1988) The nuclear matrix protein, numatrin (B23), is associated with growth factor-induced mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts and with T lymphocyte proliferation stimulated by lectins and anti-T-cell antigen receptor antibody. *J. Cell Biol.* 107, 1629-1642
233. Feuerstein, N., Mond, J.J., Kinchington, P.R., Hickey, R., Karjalainen-Lindsberg, M-L., Hay, I. és Ruyechan, W.T. (1990) Evidence for DNA binding activity of numatrin (B23), a cell cycle-regulated nuclear matrix protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1087, 127-136
234. Fields, A.P., Pettit, G.R. és May, W.S. (1988) Phosphorylation of lamin B at the nuclear membrane by activated protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 263, 8253-8260
235. Findly, R.C., Gillies, R.J. és Shulman, R.G. (1983) *In vivo* phosphorus-31 nuclear magnetic resonance reveals lowered ATP during heat shock of *Tetrahymena*. *Science* 219, 1223-1225
236. Fisher, D.Z., Chaudhary, N. és Blobel, G. (1986) sDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6450-6454
237. Flaherty, K.M., DeLuca-Flaherty, C. és McKay, D.B. (1990) Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 346, 623-628
238. Fleming, J.E., Walton, J.K., Dubitsky, R. és Bensch, K.G. (1988) Aging results in an unusual expression of *Drosophila* heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4099-4103
239. Foisner, R., Traub, P. és Wiche, G. (1991) Protein kinase A- and protein kinase C-regulated interaction of plectin with lamin B and vimentin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3812-3816
240. Forbes, D.J., Kirschner, M.W. és Newport, J.W. (1983) Spontaneous formation of nucleus like structures around bacteriophage DNA microinjected into *Xenopus* eggs. *Cell* 34, 13-23

257. Gasc, J-M., Renoir, J-M., Faber, L.E., Delahaye, F. és Baulieu, E-E. (1990) Nuclear localization of two steroid receptor-associated proteins, hsp90 and p59. *Exp. Cell Res.* 186, 362-367
258. Gasser, S.M. és Laemmli, U.K. (1987) A glimpse at chromosomal order. *Trends Genet.* 3, 16-22
259. Gatica, M., Allende, C.C., Antonelli, M. és Allende, J.E. (1987) Polylysine-containing peptides, including the carboxyl-terminal segment of the human c-Ki-ras 2 protein, affect the activity of some key membrane enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 324-328
260. Gauthier-Rouvière, C., Basset, M., Blanchard, J-M., Cavadore, J-C., Fernandez, A. és Lamb, N.J.C. (1991) Casein kinase II induces c-fos expression via the serum response element pathway and p67-SRF phosphorylation in living fibroblasts. *EMBO J.* 10, 2921-2930
261. Gawler, D., Milligan, G., Spiegel, A.M., Unson, C.G. és Houslay, M.D. (1987) Abolition of the expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi activity in diabetes. *Nature* 327, 229-232
262. Georgopoulos, C. (1992) The emergence of the chaperone machines. *Trends in Biochem. Sci.* 17, 295-299
261. Gerace, L. és Blobel, G. (1980) The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19, 277-287
264. Gerace, L. és Burke, B. (1988) Functional organization of the nuclear envelope *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 335-374
265. Gething, M.J. és Shambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45
266. Gherzi, R., Sesti, G., Andraghetti, G., DePirro, R., Lauro, R., Adezati, L. és Cordera, R. (1989) An extracellular domain of the insulin receptor beta-subunit with regulatory function on protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 264, 8627-8635
267. Giannakis, C., Forbes, I.J. és Zalewski, P.D. (1991)  $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ -dependent nuclease: tissue distribution, relationship to inter-nucleosomal DNA fragmentation and inhibition by  $\text{Zn}^{2+}$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 915-920
268. Giulian, D. és Diacumakos, E.G. (1977) The electrophysiological mapping of compartments within a mammalian cell. *J. Cell Physiol.* 72, 86-103
269. Goff, S.A., Casson, L.P. és Goldberg, A.L. (1984) Heat shock regulatory gene hspR influences rates of protein degradation and expression of the lon gene in *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6647-6651
270. Goidl, J.A. (1979) Insulin binding to isolated liver nuclei from obese and lean mice. *Biochemistry* 18, 3674-3679
271. Goldberg, M.W. és Allen, T.D. (1992) High resolution scanning electron microscopy of the nuclear envelope: demonstration of a new, regular, fibrous lattice attached to the baskets of the nucleoplasmic face of the nuclear pores. *J. Cell Biol.* 119, 1429-1440
272. Goldberger, A. és Spelsberg, T.C. (1988) Partial purification and preparation of polyclonal antibodies against candidate chromatin acceptor proteins for the avian oviduct progesterone receptor. *Biochemistry* 27, 2103-2109
273. Goldfarb, D.S. (1992) Are the cytosolic components of the nuclear, ER, and mitochondrial import apparatus functionally related? *Cell* 70, 185-188
274. Goldfarb, D.S., Gariepy, J., Schoolnick, G. és Kornberg, R.D. (1986) Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature* 322, 641-644
275. Goldfine, I.D. és Smith, G.J. (1976) Binding of insulin to isolated nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1427-1431



276. Goldfine, I.D., Smith, G.J., Wong, K.Y. és Jones, A.L. (1977/a) Cellular uptake and nuclear binding of insulin in human cultured lymphocytes: evidence for potential intracellular sites of insulin action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1368-1372
277. Goldfine, I.D., Vigneri, R., Cohen, D., Plam, N.B. és Kahn, C.R. (1977/b) Intracellular binding sites for insulin are immunologically distinct from those on the plasma membrane. *Nature* 269, 698-700
278. Goldfine, I.D., Jones, A.L., Hradek, G.T., Wong, K.Y. és Mooney, J.S. (1978) Entry of insulin into human cultured lymphocytes: electron microscope autoradiographic analysis. *Science* 202, 760-763
279. Goldstein, B.J., Meyerovitch, J., Zhang, W-R., Backer, J.M., Csermely, P., Hashimoto, N. és Kahn, C.R. (1991) Hepatic protein-tyrosine phosphatases and their regulation in diabetes. *Adv. Prot. Phosphatases* 6, 1-17
280. Gonzalez, P.J. és Palacián, E. (1990) Structural and transcriptional properties of different nucleosomal particles containing high mobility group proteins 14 and 17 (HMG14/17). *J. Biol. Chem.* 265, 8225-8229
281. Goren, H.J. és Boland, D. (1991) The 180000 molecular weight plasma membrane insulin receptor substrate is a protein tyrosine phosphatase and is elevated in diabetic plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180, 463-469
282. Goren, H.J., Mooibroek, M.J. és Boland, D. (1991) *In vitro*, insulin receptor catalyses phosphorylation of clathrin heavy chain and a plasma membrane 180,000 molecular weight protein. *Cell. Signal.* 3, 523-536
283. Gragerov, A., Nudler, E., Komissarova, N., Gaitanaris, G.A., Gottesman, M.E. és Nikiforov, V. (1992) Cooperation of groEL/groES and dnaK/dnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10341-10344
284. Granelli-Piperno, A. és McHugh, P. (1991) Characterization of a protein that regulates the DNA-binding activity of NF-AT, the nuclear factor of activated T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11431-11434
285. Grody, W.W., Schrader, W.T. és O'Malley, B.W. (1982) Activation, transformation, and subunit structure of steroid hormone receptors. *Endocrine Rev.* 3, 141-163
286. Gross, D.S. és Garrard, W.T. (1987) Poising chromatin for transcription. *Trends in Biochem. Sci.* 12, 293-297
287. Groyer, A., Schweizer-Groyer, G., Cadepond, F., Mariller, M.G. és Baulieu, E.-E. (1987) Antigluco corticosteroid effects suggest why steroid hormone is required for receptors to bind DNA *in vivo*, but not *in vitro* *Nature* 328, 624-626
288. Grunstein, M. (1992) Histones as regulators of genes. Histones were once dismissed as little more than packing material for nuclear DNA. In fact, these proteins can both repress and facilitate activation of many genes. *Sci. Amer.* Oct/92, 40-47
289. Guddat, U., Bakken, A.H. és Pieler, T. (1990) Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RBPs in *Xenopus* oocytes. *Cell* 60, 619-628
290. Guesdon, F. és Saklatvalla, J. (1991) Identification of a cytoplasmic protein kinase regulated by IL-1 that phosphorylates the small heat shock protein, hsp27. *J. Immunol.* 147, 3402-3407

291. Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Applanat, M. és Milgrom, E. (1989) Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* 57, 1147-1154
292. Guiochon-Mantel, A., Lescop, P., Christin-Maitre, S., Loosfelt, H., Perrot-Applanat, M. és Milgrom, E. (1991) Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J.* 10, 3851-3859
293. Gupta, M.P., Makino, N., Khatter, K. és Dhalla, N.S. (1986) Stimulation of Na-Ca exchange in heart sarcolemma by insulin. *Life Sci.* 39, 1077-1083
294. Hadden, J.W., Hadden, E.M., Wilson, E.E., Good, R.A. és Coffey, R.G. (1972) Direct action of insulin on plasma membrane ATPase activity in human lymphocytes. *Nature (New Biology)* 235, 174-177
295. Hai, T. és Curran, T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors fos/jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3720-3724
296. Hakes, D.J. és Berezney, R. (1991) DNA binding properties of the nuclear matrix and individual nuclear matrix proteins. Evidence for salt-resistant DNA binding sites. *J. Biol. Chem.* 266, 11131-11140
297. Hancock, R. és Hughes, M.E. (1982) Organization of DNA in the interphase nucleus. *Biol. Cell* 44, 201-212
298. Hannink, M. és Temin, H.M. (1989) Transactivation of gene expression by nuclear and cytoplasmic proteins. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4323-4336
299. Hanover, J.A. (1992) The nuclear pore: at the crossroads. *FASEB J.* 6, 2288-2295
300. Hansen, T., Stagsted, J., Pedersen, L., Roth, R.A., Goldstein, A. és Olsson, L. (1989) Inhibition of insulin receptor phosphorylation by peptides derived from major histocompatibility complex class I antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3123-3126
301. Hansen, L.K., Houchins, J.P. és O'Leary, J.J. (1991) Differential regulation of hsc70, hsp70, hsp90 alpha, and hsp90 beta mRNA expression by mitogen activation and heat shock in human lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 192, 587-596
302. Harada, S., Loten, E.G., Smith, R.M. és Jarett, L. (1992) Nonreceptor mediated nuclear accumulation of insulin in H35 rat hepatoma cells. *J. Cell. Physiol.* 153, 607-613
303. Harlow, E. és Lane, D. (1988) Antibodies, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratories.
304. Hartman, D.J., Hoogenraad, N.J., Condrón, R. és Hoj, P.B. (1992) Identification of a mammalian 10-kDa heat shock protein, a mitochondrial chaperonin 10 homologue essential for assisted folding of trimeric ornithine transcarbamoylase *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3394-3398
305. Hashimoto, Y. és Shudo, K. (1991) Cytosolic-nuclear tumor promoter-specific binding protein: association with the 90 kDa heat shock protein and translocation into nuclei by treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 665-675
306. Hass, R., Giese, G., Meyer, G., Hartmann, A., Dörk, T., Köhler, L., Resch, K., Traub, P. és Goppelt-Strübe, M. (1990) Differentiation and retrodifferentiation of U937 cells: reversible induction and suppression of intermediate filament protein synthesis. *Eur. J. Cell Biol.* 51, 265-271
307. Hass, R., Brach, M., Kharbanda, S., Giese, G., Traub, P. és Kufe, D. (1991) Inhibition of phorbol ester-induced monocytic differentiation by dexamethasone is associated with down-regulation of c-fos and c-jun (AP-1). *J. Cell. Physiol.* 149, 125-131



308. Hatanaka, M. (1990) Discovery of the nucleolar targeting signal. *BioEssays* 12, 143-148
309. Hawley, D.M., Maddux, B.A., Patel, R.G., Wong, K-Y., Mamula, P.W., Firestone, G.L., Brunetti, A., Verspohl, E. és Goldfine, I.D. (1989) Insulin receptor monoclonal antibodies that mimic insulin action without activating tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 264, 2438-2444
310. Hayes, J.J. és Wolffe, A.P. (1992) Histones H2A/H2B inhibit the interaction of transcription factor IIIA with *Xenopus borealis* somatic 5S RNA gene in a nucleosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1229-1233
311. Heald, R. és McKeon, F. (1990) Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61, 579-589
312. Heidenreich, K.A., Toledo, S.P., Brunton, L.L., Watson, M.J., Daniel-Issakani, S. és Strulovici, B. (1990) Insulin stimulates the activity of a novel protein kinase C, PKC-epsilon, in cultured fetal chick neurons. *J. Biol. Chem.* 265, 15076-15082
313. Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C., Hendrix, R.W. és Ellis, R.J. (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333, 330-334
314. Henkel, T., Zabel, U., van Zee, K., Müller, J.M., Fanning, E. és Baeuerle, P.A. (1992) Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kB subunit. *Cell* 68, 1121-1133
315. Hernandez-Cruz, A., Sala, F. és Adams, P.R. (1990) Subcellular calcium transients visualized by confocal microscopy in a voltage-clamped vertebrate neuron. *Science* 247, 858-862
316. Hershko, A. és Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 761-807
317. Heyworth, C.M., Whetton, A.D., Wong, S., Martin, B.R. és Houslay, M.D. (1985) Insulin inhibits the cholera-toxin-catalyzed ribosilation of a Mr 25,000 protein in rat liver plasma membranes. *Biochem. J.* 228, 593-603
318. Higgins, R.C. és Dahmus, M.E. (1979) Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 93, 257-260
319. Himpens, B., DeSmedt, H., Droogmans, G. és Casteels, R. (1992) Differences in regulation between nuclear and cytoplasmic  $Ca^{2+}$  in cultured smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 263, C95-C105
320. Hinshaw, J.E., Carragher, B.O. és Milligan, R.A. (1992) Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* 69, 1133-1141
321. Hocevar, B.A. és Fields, A.P. (1991) Selective translocation of beta-II-protein kinase C to the nucleus of human promyelocytic (HL60) leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 266, 28-33
322. Hoeck, W. és Gronner, B. (1990) Hormone-dependent phosphorylation of the glucocorticoid receptor occurs mainly in the amino-terminal transactivation domain. *J. Biol. Chem.* 265, 5403-5408
323. Holtz, D., Tanaka, R.A., Hartwig, J. és McKeon, F. (1989) The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* 59, 969-977
324. Hope-Gill, H.F. és Nanda, V. (1979) Stimulation of calcium ATPase by insulin, glucagon, cyclic AMP and cyclic GMP in Triton X-100 extracts of purified rat liver plasma membrane. *Horm. Metab. Res.* 11, 698-700

325. Hornbeck, P., Huang, K-P. és Paul, W.E. (1988) Lamin B is rapidly phosphorylated in lymphocytes after activation of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2279-2283
326. Horowitz, S.B. (1972) The permeability of the amphibian oocyte nucleus *in situ*. *J. Cell Biol.* 54, 609-625
327. Horowitz, S.B. és Moore, L.C. (1974) The nuclear permeability: intracellular distribution, and diffusion of inulin in the amphibian oocyte. *J. Cell Biol.* 60, 405-415
328. Horvath, A., Li, E. és Katsoyannis, P.G. (1975) Cellular binding sites for insulin in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 382, 609-620
329. Horwitz, J. (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10449-10453
330. Howe, L.R., Leever, S.J., Gómez, N., Nakielnny, S., Cohen, P. és Marshall, C.J. (1992) Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71, 335-342
331. Hubbard, T.J.P. és Sander, C. (1991) The role of heat-shock and chaperone proteins in protein folding: possible molecular mechanisms. *Protein Eng.* 4, 711-717
332. Hubbard, S.R., Bishop, W.R., Kirschmeier, P., George, S.J., Cramer, S.P. és Hendrickson, W.A. (1991) Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. *Science* 254, 1776-1779
333. Hundal, H.S., Marette, A., Mitumoto, Y., Ramlal, T., Blostein, R. és Klip, A. (1992) Insulin induces translocation of the alpha-2 and beta-1 subunits of the Na/K-ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 267, 5040-5043
334. Hunter, T. és Karin, M. (1992) The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70, 375-387
335. Huot, J., Roy, G., Lambert, H. és Landry, J. (1992) Co-induction of hsp27 phosphorylation and drug resistance in chinese hamster cells. *Int. J. Oncology* 1, 31-36
336. Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A. és Lane, D.P. (1992) Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 71, 875-886
337. Hutchinson, K.A., Czar, M.J. és Pratt, W.B. (1992) Evidence that the hormone-binding domain of the mouse glucocorticoid receptor directly represses DNA binding activity in a major portion of receptors that are "misfolded" after removal of hsp90. *J. Biol. Chem.* 267, 3190-3195
338. Hügle, B., Scheer, U. és Franke, W.W. (1985) Riboscharin: a nuclear  $M_r$  40,000 protein specific to precursor particles of the large ribosomal subunit. *Cell* 41, 615-627
339. Hwang D.S., Crooke, E. és Kornberg, A. (1990) Aggregated dnaA protein is dissociated and activated for DNA replication by phospholipase or dnaK protein. *J. Biol. Chem.* 265, 19244-19248
340. Iida, K., Iida, H. és Yahara, I. (1986) Heat shock induction of intranuclear actin rods in cultured mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 165, 207-215
341. Ikawa, S. és Weinberg, R.A. (1992) An interaction between p21ras and heat shock protein hsp60, a chaperonin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2012-2016
342. Imamoto, N., Matsuoka, Y., Kurihara, T., Kohno, K., Miyagi, M., Sakiyama, F., Okada, Y., Tsunasawa, S. és Yoneda, Y. (1992) Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins. *J. Cell Biol.* 119, 1047-1061



343. Ing, N.H., Beekman, J.M., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J. és O'Malley, B.W. (1992) Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J. Biol. Chem.* 267, 17617-17623
344. Inoue, J., Kerr, L.D., Kakizuka, A. és Verma, I.M. (1992) I $\kappa$ B-gamma, a 70 kd protein identical to the C-terminal half of p110 NF- $\kappa$ B: a new member of the I $\kappa$ B family. *Cell* 68, 1109-1120
345. Ishimi, Y. (1992) Preincubation of T antigen with DNA overcomes repression of SV40 DNA replication by nucleosome assembly. *J. Biol. Chem.* 267, 10910-10913
346. Ishimi, Y. és Kikuchi, A. (1991) Identification and molecular cloning of yeast homolog of nucleosome assembly protein I which facilitates nucleosome assembly *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 266, 7025-7029
347. Ishimi, Y., Hiroshumi, J., Sato, W., Sugawara, K., Yokota, S., Hanaoka, F. és Yamada, M. (1984) Purification and initial characterization of a protein which facilitates assembly of nucleosome-like structure from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 142, 431-439
348. Ishimi, Y., Kojima, M., Yamada, M. és Hanaoka, F. (1987) Binding mode of nucleosome-assembly protein (AP-I) and histones. *Eur. J. Biochem.* 162, 19-24
349. Ishizuka, T., Yamamoto, M., Kajita, K., Nagashima, T., Yasuda, K., Miura, K., Cooper, D.R. és Farese, R.V. (1992) Insulin stimulates novel protein kinase C in rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183, 814-820
350. Iwaki, T., Kume-Iwaki, A., Liem, R.K. és Goldman, J.E. (1989) Alpha B-crystallin is expressed in non-lenticular tissues and accumulates in Alexander's disease brain. *Cell* 57, 71-78
351. Jäättelä, M. és Wissing, D. (1992) Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Annals of Med.* 24, 249-258
352. Jäättelä, M., Wissing, D., Bauer, P.A. és Li, G.C. (1992) Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J.* 11, 3507-3512
353. Jack, R.S. és Eggert, H. (1992) The elusive nuclear matrix. *Eur. J. Biochem.* 209, 503-509
354. Jacobs, T. (1992) Control of the cell cycle. *Dev. Biol.* 153, 1-15
355. Jans, D.A., Ackermann, M.J., Bischoff, J.R., Beach, D.H. és Peters, R. (1991) p34<sup>cdc2</sup>-mediated phosphorylation at T<sup>124</sup> inhibits nuclear import of SV-40 T antigen proteins. *J. Cell Biol.* 115, 1203-1212
356. Jarnik, M. és Aeby, U. (1991) Toward a more complete 3-D structure of the nuclear pore complex. *J. Struct. Biol.* 107, 291-308
357. Jeoung, D., Chen, S., Windsor, J. és Pollack, R.E. (1991) Human major hsp70 protein complements the localization and functional defects of cytoplasmic mutant SV40 antigen in Swiss 3T3 mouse fibroblast cells. *Genes and Dev.* 5, 2235-2244
358. Jerzmanowski, A. és Cole, R.D. (1992) Partial displacement of histone H1 from chromatin is required before it can be phosphorylated by mitotic H1 kinase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 267, 8514-8520
359. Jiang, L.-W. és Schindler, M. (1986) Chemical factors that influence nucleocytoplasmic transport: a fluorescence photobleaching study. *J. Cell Biol.* 102, 853-858
360. Jiang, L.-W. és Schindler, M. (1988) Nuclear transport in 3T3 fibroblasts: effects of growth factors, transformation, and cell shape. *J. Cell Biol.* 106, 13-19

361. Jindal, H.K., Chaney, W.G., Anderson, C.W., Davis, R.G. és Vishwanatha, J.K. (1991) The protein-tyrosine kinase substrate, calpactin I heavy chain (p36), is part of the primer recognition protein complex that interacts with DNA polymerase alpha. *J. Biol. Chem.* 266, 5169-5176
362. Jost, J-P. és Hofsteenge, J. (1992) The repressor MDPB-2 is a member of the histone H1 family that binds preferentially *in vitro* and *in vivo* to methylated nonspecific DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9499-9503
363. Jost, J-P., Saluz, H-P. és Pawlak, A. (1991) Estradiol down regulates the binding activity of an avian vitellogenin gene repressor (MDBP-2) and triggers a gradual demethylation of the mCpG pair of its DNA binding site. *Nucl. Ac. Res.* 19, 5771-5775
364. Kadonaga, J.T. és Tijan, R. (1986) Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5889-5893
365. Kadowaki, H., Kadowaki, T., Cama, A., Marcus-Samuels, B., Rovira, A., Bevins, C.L. és Taylor, S.I. (1990) Mutagenesis of lysine 460 in the human insulin receptor. Effects upon receptor recycling and cooperative interactions among binding sites. *J. Biol. Chem.* 265, 21285-21296
366. Kageyama, H., Hiwasw, T., Tokunaga, K. és Sakiyama, S. (1988) Isolation and characterization of a complementary DNA clone for a Mr 32,000 protein which is induced with tumor promoters in BALB/c 3T3 cells. *Cancer Res.* 48, 4795-4798
367. Kahn, C.R. and White, M.F. (1988) The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J. Clin. Invest.* 82, 1151-1156
368. Kameshita, I. és Fujisawa, H. (1989) A sensitive method for detection of calmodulin-dependent protein kinase II activity in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 183, 139-143
369. Kanno, A., Sato, N., Yagihashi, A., Torigoe, T., Cho, J., Torimoto, K. Hara, I., Wada, Y., Okubo, M., Takahashi, N. és Kikuchi, K. (1989) Heat- or stress-inducible transformation-associated cell surface antigen on the activated H-ras oncogene-transfected rat fibroblast. *Cancer Res.* 49, 6578-6582
370. Kapeller, R., Chen, K.S., Yoakim, M., Schaffhausen, B.S., Backer, J., White, M.F., Cantley, L.C. és Ruderman, N.B. (1991) Mutations in the juxtamembrane region of the insulin receptor impair activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Mol. Endocrin.* 5, 769-777
371. Karin, M. és Smeal, T. (1992) Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *Trends in Biochem. Sci.* 17, 418-422
372. Kassenbrock, C.K. és Kelly, R.B. (1989) Interaction of heavy chain binding protein (BiP/grp78) with adenine nucleotides. *EMBO J.* 8, 1461-1467
373. Kasuga, M., Karlsson, F.A. és Kahn, C.R. (1982) Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000 dalton subunit of its own receptor. *Science* 215, 185-187
374. Kasuga, M., Izumi, T., Tobe, K., Shiba, T., Momomura, K., Tashiro-Hashimoto, Y. és Kadowaki, T. (1990) Substrates for insulin-receptor kinase. *Diabetes Care* 13, 317-326
375. Kato, K., Shinohara, H., Goto, S., Inaguma, Y., Morishita, R. és Asano, T. (1992) Copurification of small heat shock protein with alpha-B crystallin from human skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 267, 7718-7725
376. Katz, A., Wu, D. és Simon, M.I. (1992) Subunits beta-gamma of heterotrimeric G protein activate beta-2 isoform of phospholipase C. *Nature* 360, 686-689



377. Kaufmann, S.H. (1992) Expression of nuclear envelope lamins A and C in human myeloid leukemias. *Cancer Res.* 52, 2847-2853
378. Kaufmann, S.H., Mabry, M., Jasti, R. és Shaper, J.H. (1991) Differential expression of nuclear envelope lamins A and C in human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 51, 581-586
379. Kellerer, M., Obermaier-Kusser, B., Pröfrock, A., Schleicher, E., Seffer, E., Mushack, J., Ermel, B. és Häring, H-U. (1991) Insulin activates GTP binding to a 40 kDa protein in fat cells. *Biochem. J.* 276, 103-108
380. Kennington, A.S., Hill, C.R., Craig, J., Bogardus, C., Raz, I., Ortmeyer, H.K., Hansen, B.C., Romero, G. és Larnier, J. (1990) Low urinary *chiro*-inositol excretion in non-insulin dependent diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.* 323, 373-378
381. Khanna-Gupta, A. és Ware, V.C. (1989) Nucleocytoplasmic transport of ribosomes in a eukaryotic system: is there a facilitated transport process? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1791-1795
382. Kilidireas, K., Latov, N., Strauss, D.H., Gorig, A.D., Hashim, G.A., Gorman, J.M. és Sadiq, S.A. (1992) Antibodies to the human 60 kDa heat shock protein in patients with schizophrenia. *Lancet* 340, 569-572
383. Kim, Y-J., Shuman, J., Sette, M. és Przybyla, A. (1984) Nuclear localization and phosphorylation of three 25-kilodalton rat stress proteins. *Mol. Cell. Biol.* 4, 468-474
384. Kim, D., Lee, Y.J. és Corry, P.M. (1992) Constitutive hsp70: oligomerization and its dependence on ATP binding. *J. Cell. Physiol.* 153, 353-361
385. Kirschenlohr, H.L., Metcalfe, J.C., Morris, P.G., Rodrigo, G.C. és Smith, G.A. (1988) Ca transient, Mg, and pH measurements in the cardiac cycle by <sup>19</sup>F-NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9017-9021
386. Kitten, G.T. és Nigg, E.A. (1991) The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation and nuclear membrane association of lamin B2. *J. Cell Biol.* 113, 13-23
387. Kleinschmidt, J.A. és Franke, W.W. (1982) Soluble acidic complexes containing histones H3 and H4 in nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell* 29, 799-809
388. Kleinschmidt, J.A., Fortkamp, E., Krohne, G., Zentgraf, H. és Franke, W.W. (1985) Co-existence of two different types of soluble histone complexes in nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 260, 1166-1176
389. Kleinschmidt, J.A., Dingwall, C., Maier, G. és Franke, W.W. (1986) Molecular characterization of a karyophilic, histone-binding protein: cDNA cloning, amino acid sequence and expression of nuclear protein N1/N2 of *Xenopus laevis*. *EMBO J.* 5, 3547-3552
390. Kleinschmidt, J.A., Seiter, A. és Zentgraf, H. (1990) Nucleosome assembly *in vitro*: separate histone transfer and synergistic interaction of native histone complexes purified from nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J.* 9, 1309-1318
391. Klemenz, R., Fröhli, E., Steiger, R.H., Schäfer, R. és Aoyama, A. (1991) Alpha-B crystallin is a small heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3652-3656
392. Klip, A. és Ramlal, T. (1987) Cytoplasmic Ca during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. Effect of insulin and relation to glucose transport. *J. Biol. Chem.* 262, 9141-9146
393. Klip, A., Ramlal, T. és Koivisto, U-M. (1988) Stimulation of Na/H exchange by insulin and phorbol ester during differentiation of 3T3-L1 cells. Relation to hexose uptake. *Endocrinology* 123, 296-304

394. Knauf, U., Bielka, H. és Gaestel, M. (1992) Over-expression of the small heat-shock protein, hsp25, inhibits growth of Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Lett.* 309, 297-302
395. Knutson, V.P. (1991) Cellular trafficking and processing of the insulin receptor. *FASEB J.* 5, 2130-2138
396. Koepfer-Hobelsberger, B. és Wieland, O.H. (1984) Insulin activates phospholipase C in rat fat cells: similarity with the activation of pyruvate dehydrogenase. *Mol. Cell. Endocrinol.* 36, 123-129
397. Kondo, K., Kowalski, L.R.Z. és Inouye, M. (1992) Cold shock induction of yeast NSR1 protein and its role in pre-rRNA processing. *J. Biol. Chem.* 267, 16259-16265
398. Korn, L.J., Siebel, C.W., McCormick, F. és Roth, R.A. (1987) Ras p21 as a potential mediator of insulin action in *Xenopus* oocytes. *Science* 236, 840-843
399. Kost, S., Smith, D.F., Sullivan, W.P., Welch, W.J. és Toft, D.O. (1989) Binding of heat shock proteins to the avian progesterone receptor. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3829-3838
400. Kovary, K. és Bravo, R. (1991) Expression of different jun and fos proteins during the G<sub>0</sub>-to-G<sub>1</sub> transition in mouse fibroblasts: in vitro and in vivo associations. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2451-2459
401. Koyashu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., Matsuzaki, F., Iida, K., Harada, F., Kasuga, M., Sakai, H. és Yahara, I. (1986) Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100 are actin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8054-8058
402. Koyashu, S., Nishida, E., Miyata, Y., Sakai, H. és Yahara, I. (1989) HSP100, a 100-kDa heat shock protein, is a Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-regulated actin-binding protein. *J. Biol. Chem.* 264, 15083-15087
403. Krek, W., Maridor, G. és Nigg, E.A. (1992) Casein kinase II is a predominantly nuclear enzyme. *J. Cell Biol.* 116, 43-55
404. Kroh, H.E. és Simon, L.D. (1990) The ClpP component of Clp protease is the sigma-32-dependent heat shock protein F21.5. *J. Bacteriol.* 172, 6026-6034
405. Kumar, A. és Wilson, S.H. (1990) Studies of the strand-annealing activity of mammalian hnRNP complex protein A1. *Biochemistry* 29, 10717-10722
406. Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R. és Avruch, J. (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358, 417-421
407. LaCasse, E.C. és Lefebvre, Y.A. (1991) Nuclear and nuclear envelope binding proteins of the glucocorticoid receptor nuclear localization peptide identified by crosslinking. *J. Ster. Biochem.* 40, 279-285
408. Lammers, R., Van Obberghen, E., Ballotti, R., Schlessinger, J. és Ullrich, A. (1990) Transphosphorylation as a possible mechanism for insulin and epidermal growth factor receptor activation. *J. Biol. Chem.* 265, 16886-16890
409. Landry, J., Crete, P., Lamarche, S. és Chretien, P. (1988) Activation of Ca-dependent processes during heat shock: role in cell thermoresistance. *Radiat. Res.* 113, 426-436
410. Landry, J., Lambert, H., Zhou, M., Lavoie, J.N., Hickey, E., Weber, L.A. és Anderson, C.W. (1992) Human hsp27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J. Biol. Chem.* 267, 794-803



411. Lang, I., Scholz, M. és Peters, R. (1986) Molecular mobility and nucleoplasmic flux in hepatoma cells. *J. Cell Biol.* 102, 1183-1190
412. Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flahanan, J., Hayer, M.K. és Hartl, F.U. (1992) Successive action of dnaK, dnaJ and groEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356, 683-689
413. Lanini, L., Bachs, O. és Carafoli, E. (1992) The calcium pump of the liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 267, 11548-11552
414. Lanks, K.W. (1989) Temperature-dependent oligomerization of hsp85 in vitro. *J. Cell. Physiol.* 140, 601-607
415. Lapeyre, B., Bourbon, H. és Amalric, F. (1987) Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1472-1476
416. Laskey, R.A., Hondam B.M., Mills, A.D. és Finch, J.T. (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275, 416-420
417. Laskey, R.A., Fairman, M.P. és Blow, J.J. (1989) S phase of the cell cycle. *Science* 246, 609-614
418. Laszlo, L., Doherty, F.J., Osborn, N.U. és Mayer, R.J. (1990) Ubiquitinated protein conjugates are specifically enriched in the lysosomal system of fibroblasts. *FEBS Lett.* 261, 365-368
419. Laszlo, A., Wright, W. és Roti-Roti, J.L. (1992) Initial characterization of heat-induced excess nuclear proteins in HeLa cells. *J. Cell. Physiol.* 151, 519-532
420. Latchman, D.S. (1991) Heat shock proteins and human disease. *J. Royal Coll. Physic. London* 25, 295-299
421. Lavan, B.E., Kuhné, M.R., Garner, C.W., Anderson, D., Reedijk, M., Pawson, T. és Lienhard, G.E. (1992) The association of insulin-elicited phosphotyrosine proteins with src homology 2 domains. *J. Biol. Chem.* 267, 11631-11636
422. Lavoie, J.N. és Landry, J. (1992) Overexpression of Chinese hamster hsp27 in mouse cells provides transient protection against heat shock and thermostabilizes the microfilament network. 5th Internat. Congress of Cell Biol. Madrid. P.2.3 pp. 173
423. Leach, K.L., Powers, E.A., Ruff, V.A., Jaken, S. és Kaufmann, S. (1989) Type 3 protein kinase C localization to the nuclear envelope of phorbol ester-treated NIH 3T3 cells. *J. Cell Biol.* 109, 685-695
424. Lebeau, M-C., Massol, N., Herrick, J., Faber, L.E., Renoir, J-M., Radanyi, Ch. és Baulieu, E-E. (1992) p59, an hsp90-binding protein. Cloning and sequencing of its cDNA and preparation of a peptide directed polyclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 267, 4281-4284
425. Lee, W-C. és Mélése, T. (1989) Identification and characterization of a nuclear localization sequence-binding protein in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8808-8812
426. Lee, N.D. és Williams, R. H. (1954) The intracellular localization of labeled thyroxine and labeled insulin in mammalian liver. *Endocrinology* 54, 5-19
427. Lee, A.S., Bell, J. és Ting, J. (1984) Biochemical characterization of the 94- and 78-kilodalton glucose-regulated proteins in hamster fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259, 4616-4621

428. Lee, K.A.W., Bindereif, A. és Green M.R. (1988) A small-scale procedure for preparation of nuclear extracts that support efficient transcription and pre-mRNA splicing. *Gene Anal. Techn.* 5, 22-31
429. Lees-Miller, S.P. és Anderson, C.W. (1989) The human double-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90 kDa heat-shock protein, hsp90-alpha at two NH2-terminal threonine residues. *J. Biol. Chem.* 264, 17275-17280
430. Lenardo, M.J. és Baltimore, D. (1989) NF-kB: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 58, 227-229
431. Leustek, T., Toledo, H., Brot, N. és Weissbach, H. (1991) Calcium-dependent autophosphorylation of the glucose-regulated protein, grp78. *Arch. Biochem. Biophys.* 289, 256-261
432. Leustek, T., Amir-Shapira, D., Toledo, H., Brot, N. és Weissbach, H. (1992) Autophosphorylation of 70 kDa heat-shock proteins. *Cell. and Mol. Biol.* 38, 1-10
433. Levy, J., Gavin, J.R. III, Hammerman, M.R. és Avioli, L.V. (1986)  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity in kidney basolateral membrane in non-insulin-dependent diabetic rats. Effect of insulin. *Diabetes* 35, 899-905
434. Levy, D.E., Kessler, D.S., Pine, R. és Darnell, J.E. (1989) Cytoplasmic activation of ISGF3, the positive regulator of interferon-alpha stimulated transcription, reconstituted in vitro. *Genes. Dev.* 3, 1362-1371
435. Lewis, M.J. és Pelham, H.R.B. (1985) Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70 kd heat shock protein. *EMBO J.* 4, 3137-3143
436. Lewis, V.A., Hynes, G.M., Zheng, D., Saibil, H. és Willison, K. (1992) T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heteromeric particle in the eukaryotic cytosol. *Nature* 358, 249-252
437. Liao, J., Ozono, K., Sone, T., McDonnell, D.P. és Pike, J.W. (1990) Vitamin D receptor interaction with specific DNA requires a nuclear protein and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9751-9755
438. Liautaud, J-P. (1991) Are prions misfolded molecular chaperones? *FEBS Lett.* 294, 155-157
439. Liberek, K., Skowrya, D., Zylicz, M., Johnson, C. és Georgopoulos, C. (1991) The *Escherichia Coli* dnaK chaperone, the 70 kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein. *J. Biol. Chem.* 266, 14491-14496
440. Lin, K-H., Ashizawa, K. és Cheng, S-Y. (1992/a) Phosphorylation stimulates the transcriptional activity of the human beta-1 thyroid hormone nuclear receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7737-7741
441. Lin, Y.J., Harada, S., Loten, E.G., Smith, R.M. és Jarett, L. (1992/b) Direct stimulation of immediate-early genes by intranuclear insulin in trypsin-treated H35 hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9691-9694
442. Lindner, E., Horvath, M., Toth, K., Pungor, E., Bitter, I., Agai, B. és Töke, L. (1992) Zinc selective ionophores for potentiometric and optical sensors. *Anal. Lett.* 25, 453-470
443. Lindquist, S. (1986) The heat shock response. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191
444. Lindquist, S. és Craig, E.A. (1988) The heat shock proteins. *Ann. Rev. Gen.* 22, 631-677



445. Link, E., Kerr, L.D., Schreck, R., Zabel, U., Verma, I. és Baeuerle, P.A. (1992) Purified I $\kappa$ B-beta is inactivated upon dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 267, 239-246
446. Lipsich, L.A., Cutt, J.R. és Brugge, J.S. (1982) Association of the transforming proteins of Rous, Fujinami, and Y73 avian sarcoma viruses with the same two cellular proteins. *Mol. Cell. Biol.* 2, 875-880
447. Liskamp, R.M., Brothman, A.R., Arcoleo, J.P., Miller, O.J. és Weinstein, I.B. (1985) Cellular uptake and localization of fluorescent derivatives of phorbol ester tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131, 920-927
448. Lissin, N.M., Venyaminov, Y. és Girshovich, A.S. (1990) (Mg-ATP)-dependent self-assembly of molecular chaperone groEL. *Nature* 348, 339-342
449. Liu, L.F. (1989) DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 351-375
450. Lodish, H.F. (1988) Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi. A rate-limiting step in protein maturation and secretion. *J. Biol. Chem.* 263, 2107-2110
451. Loewenstein, W.R. és Kanno, Y. (1962) Some electrical properties of the membrane of a cell nucleus. *Nature* 195, 462-464
452. Loewenstein, W.R. és Kanno, Y. (1963) Some electrical properties of a nuclear membrane examined with a microelectrode. *J. Gen. Physiol.* 46, 1123-1140
453. Lohka, M.J. és Masui, Y. (1983) Formation *in vitro* of sperm pronuclei and mitotic chromosomes induced by amphibian ooplasmic components. *Science* 220, 719-721
454. Lolait, S.J. és Toh, B.H. (1980) Binding sites of fluorescent derivatives of insulin in nuclei, rough endoplasmic reticulum, and mitochondria. *Cell Tissue Res.* 210, 145-153
455. Lowe, J., McDermott, H., Pike, I., Spendlove, I., Landon, M. és Mayer, R.J. (1992) Alpha B crystallin expression in non-lenticular tissues and selective presence in ubiquitinated inclusion bodies in human disease. *J. Pathol.* 166, 61-68
456. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. és Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
457. Lu, X., Kopun, M. és Werner, D. (1988) Cell cycle phase-specific cDNA libraries reflecting phase-specific gene expression of Ehrlich ascites cells growing *in vivo*. *Exp. Cell Res.* 174, 199-214
458. Luttrell, L.M., Hewlett, E.L., Romero, G. és Rogol, A.D. (1988) Pertussis toxin attenuates some effects of insulin in BC3H1 murine myocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 6131-6141
459. Lutz, R.J., Trujillo, M.A., Denham, K.S., Wenger, L. és Sinensky, M. (1992) Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3000-3004
460. Luis, A.M., Alconada, A. és Cuezva, J.M. (1990) The alpha regulatory subunit of the mitochondrial F1-ATP-ase complex is a heat shock protein. Identification of two highly conserved amino acid sequences among the alpha-subunits and molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 265, 7713-7716
461. MacGregor, P.F., Abate, C. és Curran, T. (1990) Direct cloning of leucine zipper proteins: jun binds cooperatively to the CRE with CRE-BP1. *Oncogene* 5, 451-457
462. Madsen, K.R., Fiskum, G. és Clawson, G.A. (1990) Regulation of nuclear scaffold protease activity by calcium. *Exp. Cell Res.* 187, 343-345

463. Mahon, M.J. és Gasiewicz, T.A. (1992) Chelatable metal ions are not required for aryl hydrocarbon receptor transformation to a DNA binding form: phenanthrolines are possible competitive antagonists of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 297, 1-8
464. Malviya, A.N., Rogue, P. és Vincendon, G. (1990) Stereospecific inositol 1,4,5-[<sup>32</sup>P]trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9270-9274
465. Mannermaa, R-M. és Oikarinen, J. (1992) Nucleoside triphosphate binding and hydrolysis by histone H1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 309-317
466. Manning-Krieg, U.C., Scherer, P.E. és Schatz, G. (1991) Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix. *EMBO J.* 10, 3273-3280
467. Marais, R.M., Hsuan, J.J., McGuigan, C., Wynne, J. és Treisman, R. (1992) Casein kinase II phosphorylation increases the rate of serum response factor-binding site exchange. *EMBO J.* 11, 97-105
468. Markovac, J. és Goldstein, G.W. (1988) Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature* 334, 71-73
469. Martelli, A.M., Gilmour, R.S., Bertagnolo, V., Neri, L.M., Manzoli, L. és Cocco, L. (1992) Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C-beta in Swiss 3T3 cells. *Nature* 358, 242-245
470. Masmoudi, A., Labourdette, G., Mersel, M., Huang, F.L., Huang, K-P., Vincendon, G. és Malviya, A.N. (1989) Protein kinase C located in rat liver nuclei. Partial purification and biochemical and immunochemical characterization. *J. Biol. Chem.* 264, 1172-1179
471. Masquillier, D. és Sassone-Corsi, P. (1992) Transcriptional cross-talk: nuclear factors CREM and CREB bind to AP-1 sites and inhibit activation by jun. *J. Biol. Chem.* 267, 22460-22466
472. Massol, N., Lebeau, M-C., Renoir, J-M., Faber, L.E. és Baulieu, E-E. (1992) Rabbit FKBP59-heat shock protein binding immunophilin (HBI) is a calmodulin binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1330-1335
473. Matthews, R. és Burnie, J. (1989) Cloning of a DNA sequence encoding a major fragment of the 47 kilodalton stress protein homologue of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 25-30
474. Matthews, R. és Burnie, J. (1992) The role of hsp90 in fungal infection. *Immunol. Today* 13, 345-348
475. Matts, R.L. és Hurst, R. (1989) Evidence for the association of the heme-regulated eIF-2-alpha kinase with the 90 kDa heat shock protein in rabbit reticulocyte lysate *in situ*. *J. Biol. Chem.* 264, 15542-15547
476. Matzke, A.J.M., Weiger, T. és Matzke, M.A. (1990) Detection of a large cation-selective channel in nuclear envelopes of avian erythrocytes. *FEBS Lett.* 271, 161-164
477. Matzke, A.J.M., Behensky, C., Weiger, T. és Matzke, M.A. (1992) A large conductance ion channel in the nuclear envelope of a higher plant cell. *FEBS Lett.* 302, 81-85
478. Mayer, R.J., Arnold, J., Laszlo, L., Landon, M. és Lowe, J. (1991) Ubiquitin in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1089, 141-157
479. Mazzanti, M., DeFelice, L.J., Cohen, J. és Malter, H. (1990) Ion channels in the nuclear envelope. *Nature* 343, 764-767
480. Mazzanti, M., DeFelice, L.J. és Smith, E.F. (1991) Ion channels in murine nuclei during early development and in fully differentiated adult cells. *J. Membr. Biol.* 121, 189-198



481. Mazzarella, R.A. és Green, M. (1987) ERp99, an abundant, conserved glycoprotein of the endoplasmic reticulum, is homologous to the 90 kDa heat shock protein (hsp90) and the 94-kDa glucose regulated protein (grp94). *J. Biol. Chem.* 262, 8875-8883
482. Mazzei, G.J., Girarad, P.R. és Kuo, J.F. (1984) Environmental pollutant Cd biphasically and differentially regulates myosin light chain kinase and phospholipid/Ca-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 173, 124-128
483. McCarty, J.S. és Walker, G.C. (1991) dnaK as a thermometer: threonine-199 is site of autophosphorylation and is critical for ATPase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9513-9517
484. McDonald, J.M., Bruns, D.E. és Jarett, L. (1976) Ability of insulin to increase calcium binding by adipocyte plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1542-1546
485. McDonnell, D.P., Vegeto, E. és O'Malley, B.W. (1992) Identification of a negative regulatory function for steroid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10563-10567
486. McGarry, J.D. (1992) What if Minkowski had been ageustic? An alternative angle on diabetes. *Science* 258, 766-770
487. McGeogh, J.E. és Guidotti, G. (1992) An insulin-stimulated cation channel in skeletal muscle. Inhibition by calcium causes oscillation. *J. Biol. Chem.* 267, 832-841
488. McIntosh, J.R. és Koonce, M.P. (1989) Mitosis, *Science* 246, 622-628
489. McKeon, F.D., Kirschner, M.W. és Caput, D. (1986) Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 319, 463-468
490. McNaught, R.W., Dayani, N. és Smith, R.G. (1990) Receptor interconversion model of hormone action. 1. Purification of a factor involved in conferring estradiol binding properties to the estrogen receptor. *Biochemistry* 29, 2685-2690
491. Melnick, J., Aviel, S. és Argon, Y. (1992) The endoplasmic reticulum stress protein grp94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains. *J. Biol. Chem.* 267, 21303-21306
492. Mendel, D.B. és Orti, E. (1988) Isoform composition and stoichiometry of the 90-kDa heat shock protein associated with glucocorticoid receptors. *J. Biol. Chem.* 263, 6695-6702
493. Mendel, D.B., Bodwell, J.E. és Munck, A. (1986) Glucocorticoid receptors lacking hormone-binding activity are bound in nuclei of ATP-depleted cells. *Nature* 324, 478-480
494. Mendelsohn, M.E., Zhu, Y. és O'Neill, S. (1991) The 29-kDa proteins phosphorylated in thrombin-activated human platelets are forms of the estrogen receptor-related 27-kDa heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11212-11216
495. Mene, P., Pugliese, F. és Cinotti, G.A. (1991) Regulation of Na-Ca exchange in cultured human mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 261, F466-F473
496. Mertz, L.M. és Pedersen, R.C. (1989) Steroidogenesis activator polypeptide may be a product of glucose regulated protein 78 (grp78). *Endocrine Res.* 15, 101-115
497. Metcalfe, J.C., Hesketh, T.R. és Smith, G.A. (1985) Free cytosolic Ca measurements with fluoride labelled indicators using <sup>19</sup>F-NMR. *Cell Calcium* 6, 183-195

498. Meyerovitch, J., Backer, J.M. és Kahn, C.R. (1989) Hepatic phosphotyrosine phosphatase activity and its alterations in diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 84, 976-983
499. Meyerovitch, J., Backer, J.M., Csermely, P., Shoelson, S.E. és Kahn, C.R. (1992) Insulin differentially regulates protein phosphotyrosine phosphatase activity in rat hepatoma cells. *Biochemistry* 31, 10338-10344
500. Milarski, K.L. és Morimoto, R.I. (1989) Mutational analysis of the human hsp70 protein: distinct domains for nucleolar localization and adenosine triphosphate binding. *J. Cell Biol.* 109, 1947-1962
501. Miller, D.S. (1988) Stimulation of RNA and protein synthesis by intracellular insulin. *Science* 240, 506-509
502. Miller, M., Reddy, B.A., Kloc, M., Li, X.X., Dreyer, C. és Etkin, L.D. (1991) The nuclear-cytoplasmic distribution of the *Xenopus* nuclear factor xnf7 coincides with its state of phosphorylation during early development. *Development* 113, 569-575
503. Minami, Y., Kawasaki, H., Miyata, Y., Suzuki, K. és Yahara, I. (1991) Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90 kDa heat shock protein, hsp90. *J. Biol. Chem.* 266, 10099-10103
504. Miralpeix, M., Sun, X-J., Backer, J.M., Myers, M.G.Jr., Araki, E. és White, M.F. (1992) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of multiple high molecular weight substrates in Fao hepatoma cells. *Biochemistry* 31, 9031-9039
505. Mitchell, H.K., Petersen, N.S. és Buzin, C.H. (1985) Self-degradation of heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 4969-4973
506. Mivechi, N.F., Ouyang, H. és Hahn, G.M. (1992) Lower heat shock factor activation and binding and faster rate of hsp-70A messenger RNA turnover in heat sensitive human leukemias. *Cancer Res.* 52, 6815-6822
507. Miyata, Y. és Yahara, I. (1991) Cytoplasmic 8 S glucocorticoid receptor binds to actin filaments through the 90 kDa heat shock protein moiety. *J. Biol. Chem.* 266, 8779-8783
508. Miyata, Y. és Yahara, I. (1992) The 90 kDa heat shock protein, hsp90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J. Biol. Chem.* 267, 7042-7047
509. Mizobata, T., Akiyama, Y., Ito, K., Yumoto, N. és Kawata, Y. (1992) Effects of the chaperonin groE on the refolding of tryptophanase from *Escherichia Coli*. Refolding is enhanced in the presence of ADP. *J. Biol. Chem.* 267, 17773-17779
510. Moll, T., Tebb, G., Surana, U., Robbitch, H. és Nasmyth, K. (1991) The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell* 66, 743-758
511. Moore, S.K., Kozak, C., Robinson, E-A., Ullrich, S.J. és Appella, E. (1989) Murine 86- and 84-kDa heat shock proteins, cDNA sequences, chromosome assignments, and evolutionary origin. *J. Biol. Chem.* 264, 5343-5351
512. Moreland, R.B., Nam, H.G., Hereford, L.M. és Fried, H.M. (1985) Identification of a nuclear localization signal of a yeast ribosomal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6561-6565
513. Morimoto, R.I., Sarge, K.D. és Abravaya, K. (1992) Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. *J. Biol. Chem.* 267, 21987-21990



514. Mosser, D.D., Kotzbauer, P.T., Sarge, K.D. és Morimoto, R.I. (1990) *In vitro* activation of heat shock transcription factor DNA-binding by calcium and biochemical conditions that affect protein conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3748-3752
515. Mukhopadhyay, N.K., Price, D.J., Kyriakis, J.M., Pelech, S., Sanghera, J. és Avruch, J. (1992) An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylate the p70 S6 kinase. *J. Biol. Chem.* 267, 3325-3335
516. Munro, S. és Pelham, H.R.B. (1986) An hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46, 291-300
517. Murakami, K., Whiteley, M.K. és Routtenberg, A. (1987) Regulation of protein kinase C activity by cooperative interaction of Zn and Ca. *J. Biol. Chem.* 262, 13902-13906
518. Murakami, T., Ohmori, H., Gotoh, S., Tsuda, T., Ohya, R., Akiya, S. és Higashi, K. (1991) Down modulation of N-myc, heat-shock protein 70, and nucleolin during the differentiation of human neuroblastoma cells. *J. Biochem.* 110, 146-150
519. Nadeau, K., Sullivan, M.A., Bradley, M., Engman, D.M. és Walsh, C.T. (1992) 83-kilodalton heat shock proteins of trypanosomes are potent peptide-stimulated ATP-ases. *J. Prot. Sci.* 1, 970-976
520. Nadler, S.G., Tepper, M.A., Schachter, B. és Mazzucco, C.E. (1992) Interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin with a member of the hsp70 family of heat shock proteins. *Science* 258, 484-486
521. Nagy, K., Grunberger, G. és Levy, J. (1990) Insulin antagonistic effects of insulin receptor antibodies on plasma membrane (Ca+Mg)ATPase activity: a possible etiology of type B insulin resistance. *Endocrinology* 126, 45-52
522. Nakai, A., Satoh, M., Hirayoshi, K. és Nagata, K. (1992) Involvement of the stress protein hsp47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 117, 903-914
523. Nasrin, N., Ercolani, L., Denaro, M., Kong, X.F., Kang, I. és Alexander, M. (1990) An insulin-response element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene binds a nuclear protein induced by insulin in cultured cells and by nutritional manipulations *in vivo* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5273-5277
524. Naumann, M., Wulczyn, F.G. és Scheidereit, C. (1993) The NF- $\kappa$ B precursor p105 and the proto-oncogene product Bcl-3 are I $\kappa$ B molecules and control nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. *EMBO J.* 12, 213-222
525. Nelson, T., Wiegand, R. és Brutlag, D. (1981) Ribonucleic acid and other polyanions facilitate chromatin assembly *in vitro*. *Biochemistry* 20, 2594-2601
526. Nelson, R.J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M. és Craig, E.A. (1992) The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell* 71, 97-105
527. Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y. és Ota, M. (1992) Association of the 90-kDa heat shock protein does not affect the ligand-binding ability of androgen receptor. *J. Ster. Biochem.* 42, 803-812
528. Nene, V., Dunne, D.W., Johnson, K.S., Taylor, D.W. és Cordingley, J.S. (1986) Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to heat shock proteins and alpha-crystallins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21, 179-188

529. Neri, M., Descalzi-Cancedda, F. és Cancedda, R. (1992) Heat-shock response in cultured chick embryo chondrocytes. Osteonectin is a secreted heat-shock protein. *Eur. J. Biochem.* 205, 569-574
530. Neufeld, E., Goren, H.J. és Bolnad, D. (1989) Thin-layer chromatography can resolve phosphotyrosine, phosphoserine, and phosphothreonine in a protein hydrolyzate. *Anal. Biochem.* 177, 138-143
531. Newmeyer, D.D. és Forbes, D.J. (1988) Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation. *Cell* 52, 641-653
532. Newmeyer, D.D. és Forbes, D.J. (1990) An N-ethylmaleimide-sensitive cytosolic factor necessary for nuclear protein import: requirement in signal-mediated binding to the nuclear pore. *J. Cell Biol.* 110, 547-557
533. Newmeyer, D.D., Lucocq, J.M., Bürglin, T.R. és De Robertis, E.M. (1986) Assembly *in vitro* of nuclei active in nuclear protein transport: ATP is required for nucleoplasmin accumulation. *EMBO J.* 5, 501-510
534. Newport, J. (1987) Nuclear reconstitution in vitro: stages of assembly around protein-free DNA. *Cell* 48, 205-217
535. Newport, J.W. és Forbes, D.J. (1987) The nucleus: structure, function and dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 535-566
536. Nicotera, P., McConkey, D.J., Jones, D.P. és Orrenius, S. (1989) ATP stimulates Ca uptake and increases the free Ca concentration in isolated rat liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 453-457
537. Nicotera, P., Orrenius, S., Nilsson, T. és Berggren, P-O. (1990) An inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  pool in liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6858-6862
538. Nigg, E.A., Hily, H., Eppenberger, H.M. és Dutley, F. (1985) Rapid and reversible translocation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase type II from the Golgi complex to the nucleus. *EMBO J.* 4, 2801-2806
539. Nigg, E.A., Baeuerle, P.A. és Lüthmann, R. (1991) Nuclear import-export: in search of signals and mechanisms. *Cell* 66, 15-22
540. Nilsson, P., Mannermaan R-M., Oikarinen, J. és Grundström, T. (1992) DNA binding of histone H1 is modulated by nucleotides. *FEBS Lett.* 313, 67-70
541. Nishida, E., Koyasu, S., Sakai, H. és Yahara, I. (1986) Calmodulin-regulated binding of the 90 kDa heat shock protein to actin filaments. *J. Biol. Chem.* 261, 16033-16036
542. Nojiri, H., Stroud, M. és Hakomori, S. (1991) A specific type of ganglioside as a modulator of insulin-dependent cell growth and insulin receptor tyrosine kinase activity. Possible association of ganglioside-induced inhibition of insulin receptor function and monocytic differentiation induction in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 266, 4531-4537
543. Noll, M. (1974) Internal structure of the chromatin subunit. *Nucl. Ac. Res.* 1, 1573-1578
544. O'Brien, R.M. és Granner, D.K. (1991) Regulation of gene expression by insulin. *Biochem. J.* 278, 609-619
545. O'Brien, R.M., Houslay, M.D., Milligan, G. és Siddle, K. (1987/a) The insulin receptor tyrosyl kinase phosphorylates holomeric forms of the guanine nucleotide regulatory proteins Gi and Go. *FEBS Lett.* 212, 281-288
546. O'Brien, R.M., Siddle, K., Houslay, M.D. és Hall, A. (1987/b) Interaction of the human insulin receptor with the ras oncogene product p21. *FEBS Lett.* 217, 253-259



547. O'Brien, R.M., Soos, M.A. és Siddle, K. (1987/c) Monoclonal antibodies to the insulin receptor stimulate the intrinsic tyrosine kinase activity by cross-linking receptor molecules. *EMBO J.* 6, 4003-4010
548. O'Brien, R.M., Houslay, M.D., Brindle, N.P.J., Milligan, G., Whittaker, J. és Siddle, K. (1989) Binding to GDP-agarose identifies a novel 60kDa substrate for the insulin receptor tyrosyl kinase in mouse NIH-3T3 cells expressing high concentrations of the human insulin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 743-748
549. O'Brien, R.M., Lucas, P.C., Forest, C.D., Magnuson, M.A. és Granner, D.K. (1990) Identification of a sequence in the PEPCK gene that mediates a negative effect of insulin on transcription. *Science* 249, 533-537
550. O'Brien, R.M., Bonovich, M.T., Forest, C.D. és Granner, D.K. (1991) Signal transduction convergence: phorbol esters and insulin inhibit phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription through the same 10-base-pair sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6580-6584
551. Ohmori, H., Murakami, T., Furutani, A., Higashi, K., Hirano, H., Gotoh, S., Kuroiwa, A., Masui, A., Nakamura, T. és Amalric, F. (1990) Simultaneous activation of heat shock protein (hsp70) and nucleolin genes during in vivo and in vitro prereplicative stages of rat hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 189, 227-232
552. Oikarinen, J. (1991) Histone H1 and the regulation of transcription by nuclear receptors. *FEBS Lett.* 294, 6-10
553. Oikarinen, J., Tarkka, T. és Mannermaa, R.-M. (1993) Protein kinase and ATP/GTPase activities of the chromosome. közlésre benyújtva
554. Okamoto, K., Isohashi, F., Ueda, K., Kokufu, I. és Sakamoto, Y. (1988) Purification and characterization of an adenosine triphosphate-stimulated factor that enhances the nuclear binding of activated glucocorticoid-receptor complex from rat liver. *Endocrinology* 123, 2752-2761
555. Olson, M.O.J., Rivers, Z.M., Thompson, B.A., Kao, W-Y. és Case, S.T. (1983) Interaction of nucleolar phosphoprotein C23 with cloned segments of rat ribosomal deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 22, 3345-3351
556. O'Malley, B.W. (1990) The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol. Endo.* 4, 363-369
557. O'Malley, K., Mauron, A., Barchas, J.D. és Kedes, L. (1985) Constitutively expressed rat mRNA encoding a 70-kilodalton heat-shock-like protein. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3476-3483
558. Omatsu-Kanbe, M. és Kitasato, H. (1990) Insulin stimulates the translocation of Na/K-dependent ATPase molecules from intracellular stores to the plasma membrane in frog skeletal muscle. *Biochem. J.* 272, 727-733
559. Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U. és Nishizuka, Y. (1989) Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4868-4871
560. Oohara, I. és Wada, A. (1987) Spectroscopic studies on histone-DNA interactions. II. [Amennyiben még itt sem lankadt olvasásának figyelme, engedje meg, hogy őszinte nagyrabecsülésem jeléül egy pohár -korsó- italra tisztelettel meghívjam. Cs. P.] Three transitions in nucleosomes resolved by salt-titration. *J. Mol. Biol.* 196, 399-411
561. Oppermann, H., Levinston, W. és Bishop, J.M. (1981) A cellular protein that associates with the transforming protein of Rous sarcoma virus is also a heat-shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1067-1071

562. Orti, E., Mendel, D.B., Smith, L.I. és Munck, A. (1989) Agonist-dependent phosphorylation and nuclear dephosphorylation of glucocorticoid receptors in intact cells. *J. Biol. Chem.* 264, 9728-9731
563. Oster, U., Kardinal, C., Burghardt, H., Werner, B., Lottspeich és Rüdiger, W. (1992) Natural inhibitors of germination and growth VI. Detection of a carboxyterminal fragment of the heat shock protein hsp 70 after coumarin treatment. *J. Plant. Physiol.* 140, 110-115
564. Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W. és Hartl, F-U. (1989) Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature* 341, 125-130
565. Paine, P., Moore, L. és Horowitz, S. (1975) Nuclear envelope permeability. *Nature* 254, 109-114
566. Palleros, D.R., Welch, W.J. és Fink, A.L. (1991) Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5719-5723
567. Pardue, S., Groshan, K., Raese, J.D. és Morrisonbogorad, M. (1992) hsp70 messenger RNA induction is reduced in neurons of aged rat hippocampus after thermal stress. *Neurobiol. Aging* 13, 661-672
568. Parsell, D.A., Sanchez, Y., Stitzel, J.D. és Lindquist, S. (1991) Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide binding sites. *Nature* 353, 270-273
569. Paulin-Levasseur, M., Giese, G., Scherbarth, A. és Traub, P. (1989) Expression of vimentin and nuclear lamins during the in vitro differentiation of human promyelocytic leukemia cells HL-60. *Eur. J. Cell Biol.* 50, 453-461
570. Payraste, B., Nievers, M., Boonstra, J., Breton, M., Verkleij, A.J. és Van Bergen en Henegouwen, P.M.P. (1992) A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. *J. Biol. Chem.* 267, 5078-5084
571. Peattie, D.A., Harding, M.W., Fleming, M.A., DeCenzo, M.T., Lippke, J.A., Livingston, D.J. és Benasutti, M. (1992) Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90 kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10974-10978
572. Pehrson, J.R. és Fried, V.A. (1992) MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257, 1398-1400
573. Pelech, S.L. és Sanghera, J.S. (1992) Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signalling. *Trends in Biochem. Sci.* 17, 233-238
574. Peleg, S., Schrader, W.T. és O'Malley, B.W. (1989) Differential sensitivity of chicken progesterone receptor forms to sulfhydryl reactive reagents. *Biochemistry* 28, 7373-7379
575. Peralta-Soler, A., Thompson, K.A., Smith, R.M. és Jarett, L. (1989) Immunological demonstration of the accumulation of insulin, but not insulin receptors, in nuclei of insulin-treated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6640-6644
576. Peralta-Soler, A., Smith, R.M. és Jarett, L. (1992) Insulin stimulates accumulation and efflux of macromolecules in isolated nuclei from H35 hepatoma cells. *Diabetes* 41, 194-201
577. Perdew, G.H. és Whitelaw, M.L. (1991) Evidence that the 90-kDa heat shock protein (hsp90) exists in cytosol in heteromeric complexes containing hsp70 and three other proteins with Mr of 63,000, 56,000 and 50,000. *J. Biol. Chem.* 266, 6708-6713



578. Perrot-Applanat, M., Lescop, P. és Milgrom, E. (1992) The cytoskeleton and the cellular traffic of the progesterone receptor. *J. Cell Biol.* 119, 337-348
579. Pershadsingh, H.A. és McDonald, J.M. (1979) Direct addition of insulin inhibits a high affinity Ca-ATPase in isolated adipocyte plasma membranes. *Nature* 281, 495-497
580. Pershadsingh, H.A., Shade, D.L., Delfert, D.M. és McDonald, J.M. (1987) Chelation of intracellular calcium blocks insulin action in the adipocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1025-1029
581. Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J.C. és Nigg, E.A. (1990) In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61, 591-602
582. Petrova, T.V., Vasin, M.V., Koroleva, L.V. és Semenova, L.A. (1990) The effect of emotional stress on the hormonal status indices the level of cyclic nucleotides and content of beta-2-microglobulin in the blood and thymic tissue during the use of a synthetic analog of thyroliberin. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 3, 21-24
583. Pfaller, R., Smythe, C. és Newport, J. W. (1991) Assembly/disassembly of the nuclear envelope membrane: cell cycle-dependent binding of nuclear membrane vesicles to chromatin in vitro. *Cell* 65, 209-217
584. Pham, T.A., McDonnell, D.P., Tsai, M-J. és O'Malley, B.W. (1992) Modulation of progesterone receptor binding to progesterone response elements by positioned nucleosomes. *Biochemistry* 31, 1570-1578
585. Philippe, J. (1991) Insulin regulation of the glucagon gene is mediated by an insulin-responsive DNA element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7224-7227
586. Picard, D. és Yamamoto, K.R. (1987) Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6, 3333-3340
587. Picard, D., Salser, S.J. és Yamamoto, K.R. (1988) A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell* 54, 1073-1080
588. Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M.J., Fortin, M.G., Lindquist, S. és Yamamoto, K.R. (1990) Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* 348, 166-168
589. Pillay, T.S. és Siddle, K. (1991) Insulin-stimulated serine/threonine phosphorylation of the insulin receptor: paucity of threonine 1348 phosphorylation in vitro indicates the involvement of more than one serine/threonine kinase in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 962-971
590. Pina, B., Brüggemeier, U. és Beato, M. (1990) Nucleosome positioning modulates assembly of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. *Cell* 60, 719
591. Pinol-Roma, S. és Dreyfuss, G. (1992) Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* 355, 730-732
592. Plehwe, W.E., Williams, P.F., Caterson, I.D., Harrison, L.C. és Turtle, J.R. (1983) Calcium-dependence of insulin receptor phosphorylation. *Biochem. J.* 214, 361-366
593. Podlecki, D.A., Smith, R.M., Kao, M., Tsai, P., Huecksteadt, T., Brandenburg, D., Lasher, R.S., Jarett, L. és Olefsky, J.M. (1987) Nuclear translocation of the insulin receptor. A possible mediator of insulin's long term effects. *J. Biol. Chem.* 262, 3362-3368

594. Pongratz, I., Strömstedt, P-E., Mason, G.G.F. és Poellinger, L. (1991) Inhibition of the specific DNA binding activity of the dioxin receptor by phosphatase treatment. *J. Biol. Chem.* 266, 16813-16817
595. Pongratz, I., Mason, G.G.F. és Poellinger, L. (1992) Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 267, 13728-13734
596. Pouchelet, M., St-Pierre, E., Bibor-Hardy, V. és Simard, R. (1983) Localization of the 70000 Dalton Heat-induced protein in the nuclear matrix of BHK cells. *Exp. Cell Res.* 149, 451-459
597. Powell, L. és Burke, B. (1990) Internuclear exchange of an inner nuclear membrane protein (p55) in heterokaryons: in vivo evidence for the interaction of p55 with the nuclear lamina. *J. Cell Biol.* 111, 2225-2234
598. Prager, D., Gebremedhin, S. és Melmed, S. (1990) An insulin-induced DNA-binding protein for the human growth hormone gene. *J. Clin. Invest.* 85, 1680-1685
599. Prasad, T.K., Hack, E. és Hallberg, R.L. (1990) Function of the maize mitochondrial chaperonin hsp60: specific association between hsp60 and newly synthesized F1-ATPase alpha subunits. *Mol. Cell. Biol.* 10, 3979-3986
600. Pratt, W.B. (1990) Interaction of hsp90 with steroid receptors: organizing some diverse observations and presenting the newest concepts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 74, C69-C76
601. Pratt, W.B., Jolly, D.J., Pratt, D.V., Hollenberg, S.M., Giguere, V., Cadepond, F.M., Schweizer-Groyer, G., Catelli, M-G., Evans, R.M. és Baulieu, E-E. (1988) A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA-binding, 9 S glucocorticoid receptor complex. *J. Biol. Chem.* 263, 267-273
602. Pratt, W.B., Scherrer, L.C., Hutchinson, K.A. és Dalman, F.C. (1992) A model of glucocorticoid receptor unfolding and stabilization by a heat shock protein complex. *J. Ster. Biochem.* 41, 223-229.
603. Predki, P.F. és Sarkar, B. (1992) Effect of replacement of "zinc finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions. *J. Biol. Chem.* 267, 5842-5846
604. Pronk, G.J., Medema, R.H., Burgering, B.M.T., Clark, R., McCormick, F. és Bos, J.L. (1992) Interaction between the p21ras GTPase activating protein and the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 24058-24063
605. Provencher, S.W. (1982) Contin: a general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Comp. Phys. Commun.* 27, 229-242
606. Provencher, S.W. és Glöckner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20, 33-37
607. Pröfrock, A., Schnefel, S. és Schulz, I. (1991) Receptors for insulin interact with Gi-proteins and for epidermal growth factor with Gi- and Gs-proteins in rat pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 380-386
608. Prusiner, S.B. (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* 252, 1515-1522
609. Przywara, D.A., Bhawe, S.V., Bhawe, A., Wakade, T.D. és Wakade, A.R. (1991) Stimulated rise in neuronal calcium is faster and greater in the nucleus than the cytosol. *FASEB J.* 5, 217-222



610. Puca, G.A., Nola, E., Sica, V. és Bresciani, F. (1977) Estrogen binding proteins of calf uterus. Molecular and functional characterization of the receptor transforming factor: a Ca-activated protease. *J. Biol. Chem.* 252, 1358-1366
611. Puca, G.A., Abbondanza, C., Nigro, V., Armetta, I., Medici, N. és Molinari, A.M. (1986) Estradiol receptor has proteolytic activity that is responsible for its own transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 5367-5371
612. Purello, F., Burnham, D.B. és Goldfine, I.D. (1983) Insulin regulation of protein phosphorylation in isolated rat liver nuclear envelopes: potential relationship to mRNA metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1189-1193
613. Quest, A.F.G., Bloomenthal, J., Bardes, E.S.G. és Bell, R.M. (1992) The regulatory domain of protein kinase C coordinates four atoms of zinc. *J. Biol. Chem.* 267, 10193-10197
614. Rabindran, S.K., Haroun, R.I., Clos, J., Wisniewski, J. és Wu, C. (1993) Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* 259, 230-234
615. Radanyi, C., Renoir, J-M., Sabbah, M. és Baulieu, E-E. (1989) Chick heat-shock protein of Mr=90,000, free or released from progesterone receptor, is in a dimeric form. *J. Biol. Chem.* 264, 2568-2573
616. Randall, L.L. (1992) Peptide binding by chaperone SecB: implications for recognition of nonnative structure. *Science* 257, 241-245
617. Rapoport, T.A. (1992) Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258, 931-936
618. Rapp, U.R., Heidecker, G., Huleihel, M., Cleveland, J.L., Choi, W.C., Pawson, T., Ihle, J.N. és Anderson, W.B. (1988) raf family serine/threonine protein kinases in mitogen signal transduction. *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 53, 173-184
619. Rapuano, M. és Rosen, O.M. (1991) Phosphorylation of the insulin receptor by a casein kinase I-like enzyme. *J. Biol. Chem.* 266, 12902-12907
620. Rawn, J.D. (1989) *Biochemistry*. Neil Patterson Publishers. Burlington, NC, USA
621. Razin, A., Cedar, H. és Riggs, A.D. (1984) (eds) *DNA methylation: biochemistry and biological significance*. Springer Verlag, New York
622. Razin, A., Szyf, M., Kafri, T., Roll, M., Giloh, H., Scarpa, S., Carotti, D. és Cantoni, G.L. (1986) Replacement of 5-methylcytosine by cytosine: a possible mechanism for transient DNA demethylation during differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2827-2831
623. Rechsteiner, M. és Kuehl, L. (1979) Microinjection of the nonhistone chromosomal protein HMG1 into bovine fibroblasts and HeLa cells. *Cell* 16, 901-908
624. Redmond, T., Sanchez, E.R., Bresnick, E.H., Schlesinger, M.J., Toft, D.O., Pratt, W.B. és Welsh, M.J. (1989) Immunofluorescence colocalization of the 90-kDa heat-shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells. *Eur. J. Cell. Biol.* 50, 66-75
625. Reed, B.C., Kaufmann, S.H., Mackall, J.C., Student, A.K. és Lane, M.D. (1977) Alterations in insulin binding accompanying differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4876-4880
626. Reeves, R., Langan, T.A. és Nissen, M.S. (1991) Phosphorylation of the DNA-binding domain of nonhistone high-mobility group I protein by cdc2 kinase: reduction of binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1671-1675

627. Regensteiner, J.G., Mayer, E.J., Shetterly, S.M., Eckel, R.H., Haskell, W.L., Marshall, J.A., Baxter, J. és Hamman, R.F. (1991) Relationship between habitual physical activity and insulin levels among nondiabetic men and women. *Diabetes Care* 14, 1066-1074
628. Reiss, U. és Rothstein, M. (1974) Heat-labile isozymes of isocitrate lyase from aging *Turbatrix Aceti*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 1012-1016
629. Reiter, T. és Penman, S. (1983) "Prompt" heat shock proteins: translationally regulated sythesis of new proteins associated with the nuclear matrix-intermediate filaments as an early response to heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4737-4741
630. Rejman, J., Landers, J., Goldberger, A., McCormick, D.J., Gosse, B. és Spelsberg, T.C. (1991) Purification of a nuclear protein (receptor binding factor-1) associated with the chromatin acceptor sites for the avian oviduct progesterone receptor. *J. Protein Chem.* 10, 651-667
631. Ren, M., Drivas, G., D'Eustachio, P. és Rush, M.G. (1993) Ran/TC4: a small nuclear GTP-binding protein that regulates DNA synthesis. *J. Cell Biol.* 120, 313-323
632. Renkawek, K., de Jong, W.W., Merck, K.B., Frenken, C.W., van Workum, F.P. és Bosman, G.J. (1992) Alpha-B crystallin is present in reactive glia in Creutzfeld-Jakob disease. *Acta Neuropathol. Berl.* 83, 324-327
633. Rennie, P.S., Bowden, J-F., Bruchovsky, N., Frenette, P-S., Foekens, J.A. és Cheng, H. (1987) DNA and protein components of nuclear acceptor sites for androgen receptors in the rat prostate. *J. Ster. Biochem.* 27, 513-520
634. Renoir, J-M., Radanyi, C., Faber, L.E. és Baulieu, E-E. (1990/a) The non-DNA-binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a hsp90-bound 59-kilodalton protein. *J. Biol. Chem.* 265, 10740-10745
635. Renoir, J-M., Radanyi, C., Jung-Testas, I., Faber, L.E. és Baulieu, E-E. (1990/b) The nonactivated progesterone receptor is a nuclear heterooligomer. *J. Biol. Chem.* 265, 14402-14406
636. Rexin, M., Busch, W. és Gehring, U. (1991) Protein components of the nonactivated glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 24601-24605
637. Reyes, H., Reisz-Porszasz, S. és Hankinson, O. (1992) Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256, 1193-1195
638. Riabowol, K., Draetta, G., Brizuela, L., Vandre, D. és Beach, D. (1989) The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell* 57, 393-401
639. Rich, A. (1983) Right-handed and left-handed DNA: conformational information in genetic material. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47, 1-12
640. Rich, A., Nordheim, A. és Wang, A. H-J. (1984) The chemistry and biology of left-handed Z-DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 791-846
641. Richardson, W.D., Mills, A.D., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. és Dingwall, C. (1988) Nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores. *Cell* 52, 655-664
642. Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D. és Klug, A. (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311, 532-537



643. Rieul, C., Cortay, J.-C., Bleicher, F. és Cozzzone, A.J. (1987) Effect of bacteriophage M13 infection on phosphorylation of dnaK protein and other *Escherichia Coli* proteins. *Eur. J. Biochem.* 168, 621-627
644. Rihs, H.-P., Jans, D.A., Fan, H. és Peters, R. (1991) The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 antigen. *EMBO J.* 10, 633-639
645. Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18, 571-573
646. Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. és Dingwall, C. (1991) Two independent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64, 615-623
647. Roberts, B. (1989) Nuclear localization signal-mediated protein transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1008, 263-280
648. Rogers, S., Wells, R. és Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-368
649. Rogue, P., Labourdette, G., Masmoudi, A., Yoshida, Y., Huang, F.L., Huang, K.-P., Zwiller, J., Vincendon, G. és Malviya, A.N. (1990) Rat liver nuclei protein kinase C is the isozyme type II. *J. Biol. Chem.* 265, 4161-4165
650. Romero, G. (1991) Inositolglycans and cellular signalling. *Cell Biol. Internat. Rep.* 15, 827-852
651. Rose, D.W., Wettenhall, R.E.H., Kudlicki, W., Kramer, G. és Hardesty, B. (1987) The 90-kilodalton peptide of the heme-regulated eIF-2- $\alpha$  kinase has sequence similarity with the 90-kilodalton heat shock protein. *Biochemistry* 26, 6583-6587
652. Rose, D.W., Welch, W.J., Kramer, G. és Hardesty, B. (1989) Possible involvement of the 90-kDa heat shock protein in the regulation of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 264, 6239-6344
653. Rosen, O.M. (1987) After insulin binds. *Science* 237, 1452-1458
654. Ross, C.A., Meldolesi, J., Milner, T.A., Satoh, T., Supattapone, S. és Snyder, S.H. (1989) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Nature* 339, 468-470
655. Roth, S.Y. és Allis, C.D. (1992) Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *Trends in Biochem. Sci.* 17, 93-98
656. Roth, R.A., Zhang, B., Chin, J.E. és Kovacina, K. (1992) Substrates and signalling complexes: the tortured path to insulin action. *J. Cell. Biochem.* 48, 12-18
657. Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R. és Anderson, R.G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-682
658. Rothenberg, P.L. és Kahn, C.R. (1988) Insulin inhibits pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of G-proteins. Evidence for a novel interaction between insulin receptors and G-proteins. *J. Biol. Chem.* 263, 15546-15552
659. Rothman, J.E. és Schmid, S.L. (1986) Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell* 46, 5-9
660. Roux, P., Blanchard, J.-M., Fernandez, A., Lamb, N., Jeanteur, P. és Piechaczyk, M. (1990) Nuclear location of c-fos but not v-fos, is controlled by extracellular signals. *Cell* 63, 341-351

661. Rubins, J.B., Benditt, J.O., Dickey, B.F. és Riedel, N. (1990) GTP-binding proteins in rat liver nuclear envelopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7080-7084
662. Rudermann, N.B., Kapeller, R., White, M.F. és Cantley, L.C. (1990) Activation of phosphatidylinositol-3-kinase by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1411-1415
663. Ruff, V.A., Yem, A.W., Munns, P.L., Adams, L.D., Reardon, I.M., Deibel, M.R.Jr. és Leach, K.L. (1992) Tissue distribution and cellular localization of hsp56, an FK506-binding protein. Characterization using a highly specific polyclonal antibody. *J. Biol. Chem.* 267, 21285-21288
664. Sabbah, M., Gouilleux, F., Sola, B., Redeuilh, G. és Baulieu, E-E. (1991) Structural differences between the hormone and antihormone estrogen receptor complexes bound to the hormone response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 390-394
665. Sacks, D.B. és McDonald, J.M. (1988) Insulin-stimulated phosphorylation of calmodulin by rat liver insulin receptor preparations. *J. Biol. Chem.* 263, 2377-2383
666. Sacks, D.B., Davis, H.W., Crimmins, D.L. és McDonald, J.M. (1992) Insulin-stimulated phosphorylation of calmodulin. *Biochem. J.* 286, 211-216
667. Sadis, S. és Hightower, L.E. (1992) Unfolded proteins stimulate molecular chaperone hsc70 ATPase by accelerating ADP/ATP exchange. *Biochemistry* 31, 9406-9412
668. Sadler, I., Chiang, A., Kurihara, T., Rothblatt, J., Way, J. és Silver, P. (1989) A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to dnaJ, an *Escherichia Coli* heat shock protein. *J. Cell Biol.* 109, 2665-2675
669. Sahyoun, N., Wolf, M., Besterman, J., Hsieh, T., Sander, M., LeVine, H. III. Chang, K-J. és Cuatrecasas, P. (1986) Protein kinase C phosphorylates topoisomerase II: topoisomerase activation and its possible role in phorbol ester-induced differentiation of HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1603-1607
670. Saijoh, K., Inoue, Y., Katsuyama, H. és Sumino, k. (1988) The interaction of cations with activity of soluble protein kinase C from mouse brain. *Pharmacol. Toxicol.* 63, 221-224
671. Sale, G.J. (1991) Insulin receptor phosphotyrosyl protein phosphatases and the regulation of insulin receptor tyrosine kinase action. *Adv. Prot. Phosph.* 6, 159-186
672. Saltiel, A.R., Fox, J.A., Sherline, P. és Cuatrecasas, P. (1986) Insulin-stimulated hydrolysis of a novel glycolipid generates modulators of cAMP phosphodiesterase. *Science* 233, 967-972
673. Sanchez, E.R. (1990) Hsp56: a novel heat shock protein associated with untransformed steroid receptor complexes. *J. Biol. Chem.* 265, 22067-22070
674. Sanchez, E.R. (1992) Heat shock induces translocation to the nucleus of the unliganded glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 17-20
675. Sanchez, E.R., Toft, D.O., Schlessinger, M.J. és Pratt, W.B. (1985) Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 260, 12398-12401
676. Sanchez, E.R., Redmond, T., Scherrer, L.C., Bresnick, E.H., Welsh, M.J. és Pratt, W.B. (1988) Evidence that the 90-kilodalton heat shock protein is associated with tubulin-containing complexes in L cell cytosol and in intact PtK cells. *Mol. Endo.* 2, 756-760



677. Sanchez, E.R., Faber, L.E., Henzel, W.J. és Pratt, W.B. (1990/a) The 56-59-kilodalton protein identified in untransformed steroid receptor complexes is a unique protein that exists in cytosol in a complex with both the 70- and 90-kilodalton heat shock proteins. *Biochemistry* 29, 5145-5152
678. Sanchez, E.R., Hirst, M., Scherrer, L.C., Tang, H-Y., Welsh, M.J., Harmon, J.M., Simons, S.S. Jr., Ringold, G.M. és Pratt, W.B. (1990/b) Hormone-free mouse glucocorticoid receptors overexpressed in chinese hamster ovary cells are localized to the nucleus and are associated with both hsp70 and hsp90. *J. Biol. Chem.* 265, 20123-20130
679. Sanghera, J.S., Peter, M., Nigg, E.A. és Pelech, S.L. (1992) Immunological characterization of avian MAP kinases: evidence for nuclear localization. *Mol. Biol. of the Cell* 3, 775-787
680. Saunders, W.S., Cooke, C.A. és Earnshaw, W.C. (1991) Compartmentalization within the nucleus: discovery of a novel subnuclear region. *J. Cell Biol.* 115, 919-931
681. Sawadogo, M. és Sentenac, A. (1990) RNA polymerase B (II) and general transcription factors. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 711-754
682. Schindler, M. és Jiang, L-W. (1986) Nuclear actin and myosin as control elements in nucleocytoplasmic transport. *J. Cell Biol.* 102, 859-862
683. Schindler, M. és Jiang, L-W. (1987) Epidermal growth factor and insulin stimulate nuclear pore-mediated macromolecular transport in isolated rat liver nuclei. *J. Cell Biol.* 104, 849-853
684. Schlessinger, M.J. (1990) Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 265, 12111-12114
685. Schmidt-Zachmann, M.S., Hügle-Dörr, B. és Franke, W.W. (1987) A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family. *EMBO J.* 6, 1881-1890
686. Schowalter, D.B., Sullivan, W.P., Maihle, N.J., Dobson, A.D.W., Conneely, O.M., O'Malley, B.W. és Toft, D.O. (1991) Characterization of progesterone receptor binding to the 90- and 70-kDa heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 21165-21173
687. Schreck, R., Rieber, P. és Baeuerle, P.A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10, 2247-2258
688. Schröder, H.C., Bachmann, M.B., Diehl-Seifert és Müller, W.E.G. (1987) Transport of mRNA from nucleus to cytoplasm. *Prog. Nucl. Ac. Res. and Mol. Biol.* 34, 89-142
689. Schröder, H.C., Rottmann, M., Wenger, R., Bachmann, M., Dorn, A. és Müller, W.E.G. (1988) Studies on protein kinases involved in regulation of nucleocytoplasmic mRNA transport. *Biochem. J.* 252, 777-790
690. Schröder, H.C., Wenger, R., Ugarkovic, D., Frieze, K., Bachmann, M. és Müller, W.E.G. (1990) Differential effect of insulin and epidermal growth factor on the mRNA translocation system and transport of specific poly(A<sup>+</sup>) mRNA and poly(A<sup>-</sup>) mRNA in isolated nuclei. *Biochemistry* 29, 2368-2378
691. Schwartz, A.M. és Clawson, G.A. (1991) Cooperative ATP binding by cloned lamin C. *Exp. Cell Res.* 193, 432-434
692. Seger, R., Ahn, N.G., Boulton, T.G., Yancopoulos, G.D., Panayotatos, N., Radziejewska, E., Ersson, L., Bratlien, R.L., Cobb, M.H. és Krebs, E.G. (1991) Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6142-6146

693. Seufert, W. és Jentsch, S. (1990) Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* 9, 543-550
694. Seydel, U. és Gerace, L. (1991) A 28,000-Da GDP/GTP-binding protein specific to the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* 266, 7602-7608
695. Shannon-Moore, M. és Blobel, G. (1992) The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors. *Cell* 69, 939-950
696. Sheenan, M.A., Mills, A.D., Sleeman, A.M., Laskey, R.A. és Blow, J.J. (1988) Steps in the assembly of replication-competent nuclei in a cell-free system from *mXenopus* eggs. *J. Cell Biol.* 106, 1-12
697. Shi, Y. és Thomas, J.O. (1992) The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2186-2192
698. Shiba, T., Tobe, K., Koshio, O., Yamamoto, R., Shibasaki, Y., Matsumoto, N., Toyoshima, S., Osawa, T., Akanuma, Y., Takaku, F. és Kasuga, M. (1990) Concanavalin A-induced receptor aggregation stimulates the tyrosine kinase activity of the insulin receptor. *Biochem. J.* 267, 787-794
699. Shibahara, S., Müller, R.M. és Taguchi, H. (1987) Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J. Biol. Chem.* 262, 12889-12892
700. Shibamura, M., Kuroki, T. és Nose, K. (1992) Cell-cycle dependent phosphorylation of hsp28 by TGF-beta and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in normal mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1), but not in their ras-transformants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1418-1425
701. Shimizu, T., Kubota, M., Tanizawa, A., Sano, H., Kasai, Y., Hashimoto, H., Akiyama, Y. és Mikawa, H. (1990) Inhibition of both etoposide-induced DNA fragmentation and activation of poly-(ADP-ribose) synthesis by zinc ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169, 1172-1177
702. Shinnick, T.M. (1991) Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 167, 145-160
703. Shoelson, S.E., White, M.F. és Kahn, C.R. (1988) Tryptic activation of the insulin receptor. Proteolytic truncation of the alpha-subunit releases the beta-subunit from inhibitory control. *J. Biol. Chem.* 263, 4852-4860
704. Siddle, K., Nayak, R. and Csermely, P. (1990) The 64K question in diabetes (editorial) *Lancet* 336, 597-598
705. Silva, C.M. és Cidlowski, J.A. (1989) Direct evidence for intra- and intermolecular disulfide bond formation in the human glucocorticoid receptor. Inhibition of DNA binding and identification of a new receptor-associated protein. *J. Biol. Chem.* 264, 6638-6647
706. Silver, P.A. (1991) How proteins enter the nucleus. *Cell* 64, 489-497
707. Simons, T.J.B. (1991) Intracellular free zinc and zinc buffering in human red blood cells. *J. Membr. Biol.* 123, 63-71
708. Sipos, K. és Olson, M.O.J. (1991) Nucleolin promotes secondary structure in ribosomal RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 673-678
709. Sissoeff, I., Grisvard, J. és Guille, E. (1976) Studies on metal ions-DNA interactions; specific behaviour of reiterative DNA sequences. *Progr. Biophys. Molec. Biol.* 31, 165-199
710. Sjolander, A., Yamamoto, K., Huber, B.E. és Lapetina, E.G. (1991) Association of p21ras with phosphatidylinositol-3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7908-7912



711. Skowrya, D., Georgopoulos, C. és Zylicz, M. (1990) The E. Coli dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis dependent manner. *Cell* 62, 939-944
712. Smith, R.M. és Jarett, L. (1987) Ultrastructural evidence for the accumulation of insulin in nuclei of intact 3T3-L1 adipocytes by an insulin-receptor mediated process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 459-463
713. Smith, R.M. és Jarett, L. (1990) Partial characterization of mechanism of insulin accumulation in H35 hepatoma cell nuclei. *Diabetes* 39, 683-689
714. Smith, D.M. and Sale, G.J. (1988) Evidence that a novel serine kinase catalyses phosphorylation of the insulin receptor in an insulin-dependent and tyrosine kinase-dependent manner. *Biochem. J.* 256, 903-909
715. Smith, S. és Stillman, B. (1989) Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell* 58, 15-25
716. Smith, C.D. és Wells, W.W. (1983) Phosphorylation of rat liver nuclear envelopes. II. Characterization of *in vitro* lipid phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 258, 9368-9373
717. Smith, C.D. és Wells, W.W. (1984) Solubilization and reconstitution of a nuclear envelope-associated ATPase. Synergistic activation by RNA and polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 259, 11890-11894
718. Smith, G.A., Hesketh, R.T., Metcalfe, J.C., Feeney, J. és Morris, P.G. (1983) Intracellular calcium measurements by <sup>19</sup>F-NMR of fluorine-labelled chelators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7178-7182
719. Soos, M.A., O'Brien, R.M., Brindle, N.P.J., Stigter, J.M., Okamoto, A.K., Whittaker, J. és Siddle, K. (1989) Monoclonal antibodies to the insulin receptor mimic metabolic effects of insulin but do not stimulate receptor autophosphorylation in transfected NIH 3T3 fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5217-5221
720. Soos, M.A., Whittaker, J., Lammers, R., Ullrich, A. és Siddle, K. (1990) Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem. J.* 270, 383-390
721. Sorger, P.K. és Pelham, H.R.B. (1988) Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54, 855-864
722. Sorger, P.K., Lewis, M.J. és Pelham, H.R.B. (1987) Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature* 329, 81-84
723. Southgate, R., Ayme, A. és Voellmy, R. (1983) Nucleotide sequence analysis of the *Drosophila* small heat shock gene cluster at locus 67B. *J. Mol. Biol.* 165, 35-57
724. Southorn, B.G. és Palmer, R.M. (1990) Inhibitors of phospholipase A2 block the stimulation of protein synthesis by insulin in L6 myoblasts. *Biochem. J.* 270, 737-739
725. Spector, D.L. (1990) Higher order nuclear organization: three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 147-151
726. Spector, N.L., Freedman, A.S., Freeman, G., Segil, J., Whitman, J.F., Welch, W.J. és Nadler, L.M. (1989) Activation primes human B lymphocytes to respond to heat shock. *J. Exp. Med.* 170, 1763-1768

727. Spector, N.L., Samson, W., Ryan, C., Gribben, J., Urba, W., Welch, W.J. és Nadler, L.M. (1992) Growth arrest of human B lymphocytes is accompanied by induction of the low molecular weight mammalian heat shock protein. *J. Immunol.* 148, 1668-1673
728. Speizer, L.A., Watson, M.J., Kanter, J.R. és Brunton, L.L. (1989) Inhibition of phorbol ester binding and protein kinase C activity by heavy metals. *J. Biol. Chem.* 264, 5581-5585
729. Spence, J. és Georgopoulos, C. (1989) Purification and properties of the *Escherichia Coli* heat shock protein, HtpG. *J. Biol. Chem.* 264, 4398-4403
730. Srivastava, P.K. és Maki, R.G. (1991) Stress-induced proteins in immune response to cancer. *Curr. Top. Microbiol. and Immunol.* 167, 109-123
731. Srivastava, S.K. és Singh, U.S. (1990) Insulin activates guanosine-5'-gamma-thio-triphosphate (GTP-gamma-S) binding to a novel GTP-binding protein, G-ir, from human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173, 501-506
732. Srivastava, P.K., DeLeo, A.B. és Old, L.J. (1986) Tumor rejection antigens of chemically induced tumors of inbred mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3407-3411
733. Staddon, J.M., Bouzyk, M.M. és Rozengurt, E. (1992) Interconversion of grp78/BiP. A novel event in the action of *Pasteurella multocida* toxin, bombesin, and platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* 267, 25239-25245
734. Stein, A. (1989) Reconstitution of chromatin from purified components. *Meth. Enzymol.* 170, 585-605
735. Stevenson, M.A., Calderwood, S.K. és Hahn, G.M. (1986) Rapid increases in inositol-trisphosphate and intracellular Ca after heat shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 826-833
736. Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D.G., Cohen, P. és Gaestel, M. (1992) Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* 313, 307-313
737. Storz, G., Tartaglia, L.A. és Ames, B.N. (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation *Science* 248, 189-194
738. Straus, D., Walter, W. és Gross, C.A. (1988) *Escherichia Coli* heat shock gene mutants are defective in proteolysis. *Genes and Dev.* 2, 1851-1858
739. Straus, D., Walter, W. és Gross, C.A. (1990) dnaK, dnaJ, and grpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of sigma-32. *Genes and Dev.* 4, 2202-2209
740. Stumpo, D.J., Stewart, T.N., Gilman, M.Z., és Blackshear, P.J. (1988) Identification of c-fos sequences involved in induction of insulin and phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 263, 1611-1614
741. Subjeck, J.R., Shyy, T., Shen, J. és Johnson, R.J. (1983) Association between the mammalian 110,000-dalton heat shock protein and nucleoli. *J. Cell Biol.* 97, 1389-1395
742. Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J. és White, M.F. (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352, 73-77



743. Surewitz, W.K. és Mantsch, H.H. (1988) New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim. Biophys. Acta* 952, 115-130
744. Surewitz, W.K., Mantsch, H.H. és Chapman, D. (1993) Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* 32, 389-394
745. Suzuki, N., Kobayashi, M., Sakata, K., Suzuki, T. és Hosoya, T. (1991) Synergistic stimulatory effect of glucocorticoid, EGF and insulin on the synthesis of ribosomal RNA and phosphorylation of nucleolin in primary cultured rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1092, 367-375
746. Sweet, L.J., Dudley, D.T., Pessin, J.E. és Spector, A.A. (1987) Phospholipid activation of the insulin receptor kinase: regulation by phosphatidylinositol. *FASEB J.* 1, 55-59
747. Sylvia, V., Curtin, G., Norman, J., Stec, J. és Busbee, D. (1988) Activation of a low specific activity form of DNA polymerase alpha by inositol-1,4-bisphosphate. *Cell* 54, 651-658
748. Szamel, M. (1992) A sejtmembránon keresztül történő jelközvetítés molekuláris szintű mechanizmusai stimulált limfocitában: a plazmamembrán foszfolipidek a T sejt antigén receptorhoz kapcsolt jelátvitel központi molekulái. Doktori értekezés.
749. Tai, P.-K. K., Alberts, M.W., Chang, H., Faber, L.E. és Schreiber, S.L. (1992) Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex. *Science* 256, 1315-1318
750. Takata, Y., Webster, N.J.G. és Olefsky, J.M. (1991) Mutation of the two carboxyl-terminal tyrosines results in an insulin receptor with normal metabolic signaling but enhanced mitogenic signaling properties. *J. Biol. Chem.* 266, 9135-9139
751. Takayama, S., White, M.F. és Kahn, C.R. (1988) Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. *J. Biol. Chem.* 263, 3440-3447
752. Takemoto, H., Yoshimori, T., Yamamoto, A., Miyata, Y., Yahara, I., Inoue, K. és Tashiro, Y. (1992) Heavy chain binding protein (BiP/grp78) and endoplasmic are exported from the endoplasmic reticulum in rat exocrine pancreatic cells, similar to protein disulfide-isomerase. *Arch. Biochem. Biophys.* 296, 129-136
753. Takimoto, G.S., Tasset, D.M., Eppert, A.C. és Horwitz, K.B. (1992) Hormone-induced progesterone receptor phosphorylation consists of sequential DNA-independent and DNA-dependent stages: analysis with zinc finger mutants and the progesterone antagonist ZK98299. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3050-3054
754. Tas, S. (1978) Involvement of disulfide bonds in the condensed structure of facultative heterochromatin and implications on cellular differentiation and aging. *Gerontology* 24, 358-364
755. Thanos, D. és Maniatis, T. (1992) The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kB-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. *Cell* 71, 777-789
756. Thévenin, C., Kim, S.-J. és Kehrl, J.H. (1991) Inhibition of protein phosphatases by okadaic acid induces AP1 in human T cells. *J. Biol. Chem.* 266, 9363-9366
757. Thomas, G. (1992) MAP kinase by any other name smells just as sweet. *Cell* 68, 3-6

758. Thomas, A.P., Martin-Requero, A. és Williamson, J.R. (1985) Interactions between insulin and alpha1-adrenergic agents in the regulation of glycogen metabolism in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 260, 5963-5973
759. Thompson, K.A., Peralta-Soler, A., Smith, R.M. és Jarett, L. (1989) Intranuclear localization of insulin in rat hepatoma cells: insulin/matrix association. *Eur. J. Cell Biol.* 50, 442-446
760. Thorne, S.A., Winrow, V.R. és Blake, D.R. (1992) Stress proteins, self defence, and the myocardium. *Br. Heart J.* 67, 279-280
761. Thömmes, P. és Hübscher, U. (1990) Eukaryotic DNA replication. Enzymes and proteins acting at the fork. *Eur. J. Biochem.* 194, 699-712
762. Tilly, K., Spence, J. és Georgopoulos, C. (1989) Modulation of stability of the *Escherichia Coli* heat shock regulatory factor sigma-32. *J. Bacteriol.* 171, 1585-1589
763. Ting, L-P., Tu, C-L. és Chou, C-K. (1989) Insulin-induced expression of human heat shock protein gene hsp70. *J. Biol. Chem.* 264, 3404-3408
764. Toledano, M.B. és Leonard, W.J. (1991) Modulation of transcription factor NF-kB binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4328-4332
765. Toth, S., Csermely, P., Beregi, E., Szkladanyi, A. és Szabo, L.D. (1989) Decreased cytosolic free calcium concentration of aged human lymphocytes in resting state. *Comprehens. Gerontology* 3, 16-22
766. Tökés, Z.A. és Clawson, G.A. (1989) Proteolytic activity associated with the nuclear scaffold. The effect of self-digestion of lamins. *J. Biol. Chem.* 264, 15059-15065
767. Travers, A.A. (1987) DNA bending and nucleosome positioning. *Trends in Biochem. Sci.* 12, 108-112
768. Treisman, R. (1992) The serum response element. *Trends in Biochem. Sci.* 17, 423-426
769. Trent, J.D., Nimmesgern, E., Wall, J.S., Hartl, F-U. és Horwich, A.L. (1991) A molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium is related to the eukaryotic protein t-complex polypeptide-1. *Nature* 354, 490-493
770. Ullrich, S.J., Robinson, E.A., Lav, L.W., Willingham, M. és Appella, E. (1986) A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat-shock related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3121-3125
771. Ursic, D. és Cuthbertson, M.R. (1991) The yeast homolog to mouse Tcp-1 affects microtubule-mediated processes. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2629-2640
772. Van den Broek, M., Hogervorst, E.J.M., van Bruggen, M.C.J., van Eden, W., van der Zee, R. és van den Berg, W.B. (1989) Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kD mycobacterial heat-shock protein. *J. Exp. Med.* 170, 449-466
773. Van Eden, W., Thole, J.E.R., van der Zee, R., Noordzij, A., van Embden, J.D.A., Hensen, E.J. és Cohen, I.R. (1988) Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocyte in adjuvant arthritis. *Nature* 331, 171-173
774. Vedeckis, W.V., Freeman, M.R., Schrader, W.T. és O'Malley, B.W. (1980) Progesterone-binding components of chick oviduct: partial purification and characterization of a calcium-activated protease which hydrolyzes the progesterone receptor. *Biochemistry* 19, 335-343
775. Vigneri, R., Goldfine, I.D., Wong, K.Y., Smith, G.J. és Pezzino, V. (1978) The nuclear envelope. The major site of insulin binding in rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.* 253, 2098-2103



776. Volkman, L.E., Talhouk, S.N., Oppenheimer, D.I. és Charlton, C.A. (1992) Nuclear F-actin: a functional component of baculovirus-infected lepidopteran cells? *J. Cell Sci.* 103, 15-22
777. Voorter, C.E.M., Wintjes, L., Bloemendal, H. és de Jong, W.W. (1992) Relocalization of alpha-B-crystallin by heat shock in ovarian carcinoma cells. *FEBS Lett.* 309, 111-114
778. Wada, M., Sekine, K. és Itikawa, H. (1986) Participation of the dnaK and dnaJ gene products in phosphorylation of glutamyl-tRNA synthetase and threonyl-tRNA synthetase of *Escherichia Coli* K-12. *J. Bacteriol.* 168, 213-220
779. Walker, J.M., Gooderham, K., Hastings, J.R.B., Mayes, E. és Johns, E.W. (1980) The primary structures of non-histone chromosomal proteins HMG 1 and 2. *FEBS Lett.* 122, 264-270
780. Wang, K.K.W., Villalobo, A. és Roufogalis, B.D. (1989) Calmodulin-binding proteins as calpain substrates. *Biochem. J.* 262, 693-706
781. Waybill, M.M., Yelamarty, R.V., Zhang, Y., Scaduto, R.C. Jr., Lanoue, K.F., Hsu, C-J., Smith, B.C., Tillotson, D.L., Yu, F.T.S. és Cheung, J.Y. (1991) Nuclear calcium gradients in cultured rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 261, E49-E57
782. Weisbrod, S. és Weintraub, H. (1979) Isolation of a subclass of nuclear proteins responsible for conferring a DNAase I sensitive structure on globin chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 630-634
783. Weissman, C. (1991) The prion's progress. *Nature* 349, 569-571
784. Weitzel, G., Pilatus, U. és Rensing, L. (1985) Similar dose response of heat shock protein synthesis and intracellular pH change in yeast. *Exp. Cell Res.* 159, 252-256
785. Welch, W.J. (1992) Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews* 72, 1063-1081
786. Welch, W.J. és Feramisco, J.R. (1984) Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 259, 4501-4513
787. Welch, W.J. és Feramisco, J.R. (1985) Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1229-1237
788. Welch, W.J. és Suhan, J.P. (1985) Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance on intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J. Cell Biol.* 101, 1198-1211
789. Welch, W.J., Garrels, J.I., Thomas, G.P., Lin, J. J-C. és Feramisco, J.R. (1983) Biochemical characterization of the mammalian stress proteins and identification of two stress proteins as glucose- and  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore-regulated proteins. *J. Biol. Chem.* 258, 7102-7111
790. Welsh, F.A., Moyer, D.J. és Harris, V.A. (1992) Regional expression of heat shock protein-70 mRNA and c-fos following focal ischemia in rat brain. *J. Cerebral Blood Flow and Metab.* 12, 204-212
791. Weser, U. és Bischoff, E. (1969)  $^{65}\text{Zn}^{2+}$  uptake by rat liver nuclei in presence of some chelating agents. *Biochim. Biophys. Acta* 204, 542-549
792. Weser, U. és Bischoff, E. (1970) Incorporation of  $^{65}\text{Zn}$  in rat liver nuclei. *Eur. J. Biochem.* 12, 571-575

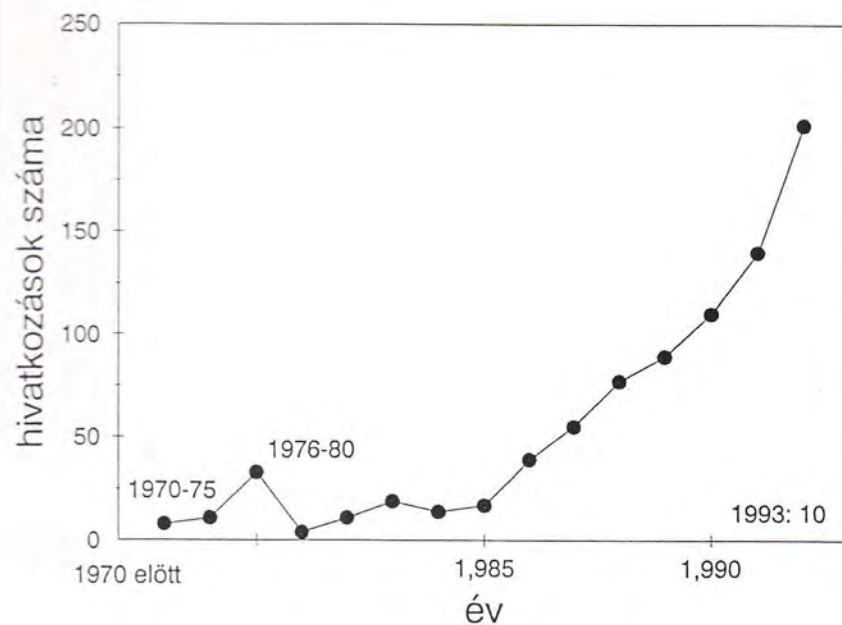
793. Westwood, J.T., Clos, J. és Wu, C. (1991) Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat-shock factor. *Nature* 353, 822-827
794. White, M.F., Livingston, J.N., Backer, J.M., Lauris, V., Dull, T.J., Ullrich, A. és Kahn, C.R. (1988/a) Mutation of the insulin receptor at tyrosine 960 inhibits signal transmission but does not affect its tyrosine kinase activity. *Cell* 54, 641-649
795. White, M.F., Shoelson, S.E., Keutmann, H. és Kahn, C.R. (1988/b) A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 262, 9769-9777
796. Wickner, S., Hoskins, J. és McKenney, K. (1991) Monomerization of repA dimers by heat shock proteins activates binding to DNA replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7903-7907
797. Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. és Jakob, U. (1992) hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature* 358, 169-170
798. Wild, J., Altman, E., Yura, T. és Gross, C.A. (1992) dnaK and dnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia Coli*. *Genes Dev.* 6, 1165-1172
799. Williams, R.S. és Benjamin, I.J. (1991) Stress proteins and cardiovascular disease. *Mol. Biol. Med.* 8, 197-206
800. Williams, D.A., Fogarty, K.E., Tsien, R.Y. és Fay, F.S. (1985) Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the original imaging microscope using fura-2. *Nature* 318, 558-560
801. Williams, D.A., Becker, P.L. és Fay, F.S. (1988) Regional changes in calcium underlying contraction of single smooth muscle cells. *Science* 235, 1644-1648
802. Winfield, J.B. és Jarjour, W.N. (1991) Stress proteins, autoimmunity, and autoimmune disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 167, 161-189
803. Winrow, V.R. és Blake, D. (1991) Stress proteins, hearts and joints. *Lancet* 337, 614-615
804. Wolffe, A.P. (1992) New insights into chromatin function in transcriptional control. *FASEB J.* 6, 3354-3361
805. Workmann, J.L. és Kingston, R.E. (1992) Nucleosome core displacement in vitro via a metastable transcription factor-nucleosome complex. *Science* 258, 1780-1784
806. Worman, H.J., Yuan, J., Blobel, G. és Georgatos, S.D. (1988) A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8531-8534
807. Wu, J., Rossomando, A.J., Her, J-H., Vecchio, R.D., Weber, M.J. és Sturgill, T.W. (1991) Autophosphorylation in vitro of recombinant 42-kilodalton mitogen-activated protein kinase on tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9508-9512
808. Xanthoudakis, S. és Curran, T. (1992) Identification and characterization of ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J.* 11, 653-665
809. Yaffe, M.B., Farr, G.W., Miklos, D., Horwich, A.L., Sternlicht, M.L. és Sternlicht, H. (1992) TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature* 358, 245-248
810. Yalovsky, S., Paulsen, H., Michaeli, D., Chitnis, P.R. és Nechushtai, R. (1992) Involvement of a chloroplast hsp70 heat shock protein in the integration of a protein (light-harvesting complex protein precursor) into the thylakoid membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5616-5619



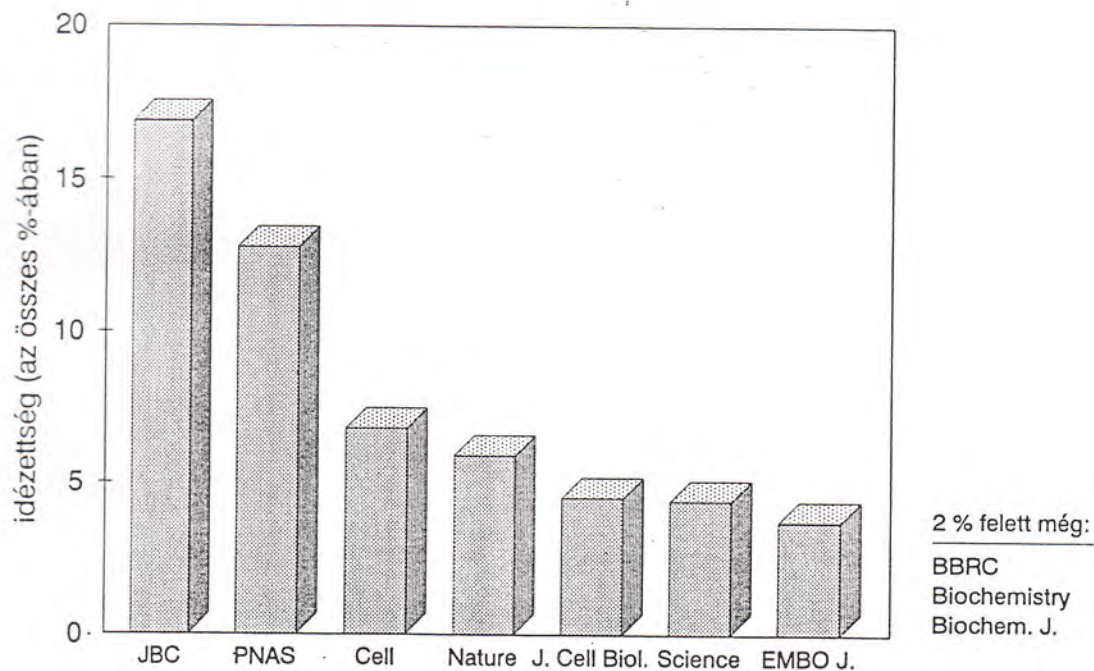
811. Yamamoto, M., Takahashi, Y., Inano, K., Horigome, T. és Sugano, H. (1991) Characterization of the hydrophobic region of heat shock protein 90. *J. Biochem.* 110, 141-145
812. Yang, X-D. és Feige, U. (1992) Heat shock proteins in autoimmune disease. From causative antigen to specific therapy? *Experientia* 48, 650-656
813. Yang-Yen, H-F., Chambard, J-C., Sun, Y-L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J. és Karin, M. (1990) Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62, 1205-1215
814. Yarom, R., Hall, T.A. és Polliack, A. (1976) Electron microscopic X-ray microanalysis of normal and leukemic human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3690-3694
815. Yelamarty, R.V., Miller, B.A., Scaduto, R.C. Jr., Yu, F.T.S., Tillotson, D.L. és Cheung, J.Y. (1990) Three-dimensional intracellular calcium gradients in single human burst-forming units-erythroid-derived erythroblasts induced by erythropoietin. *J. Clin. Invest.* 85, 1799-1809
816. Yem, A.W., Tomasselli, A.G., Heinrikson, R.L., Zurcher-Neely, H., Ruff, V.A., Johnson, R.A. és Deibel, M.R.Jr. (1992) The hsp56 component of steroid receptor complexes binds to immobilized FK506 and shows homology to FKBP-12 and FKBP-13. *J. Biol. Chem.* 267, 2868-2871
817. Ylikomi, T., Bocquel, M.T., Berry, M., Gronemeyer, H. és Chambon, P. (1992) Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J.* 11, 3681-3694
818. Yonezawa, K. és Roth, R.A. (1990) Various proteins modulate the kinase activity of the insulin receptor. *FASEB J.* 4, 194-200
819. Yonezawa, N., Nishida, E., Sakai, H., Koyasu, S., Matsuzaki, F., Iida, K. és Yahara, I. (1988) Purification and characterization of the 90-kDa heat shock protein from mammalian tissues. *Eur. J. Biochem.* 177, 1-7
820. Yonezawa, K., Yokono, K., Shii, K., Ogawa, W., Ando, A., Hara, K., Baba, S., Kaburagi, Y., Yamamoto-Honda, R., Momomura, K., Kadowaki, T. és Kasuga, M. (1992) In vitro association of phosphatidylinositol-3-kinase activity with the activated insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 267, 440-446
821. Young, R.A. és Elliott, T.J. (1989) Stress proteins, infection and immune surveillance. *Cell* 59, 5-8
822. Yuan, J., Simos, G., Blobel, G. és Georgatos, S.D. (1991) Binding of lamin A to polynucleosomes. *J. Biol. Chem.* 266, 9211-9215
823. Yufu, Y., Nishimura, J. és Nawata, H. (1992) High constitutive expression of heat shock protein 90-alpha in human acute leukemia cells. *Leukemia Res.* 16, 597-605
824. Yuh, K.-C.M. és Gafni, A. (1987) Reversal of age-related effects in rat muscle phosphoglycerate kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7458-7462
825. Yu-Sherman, M. és Goldberg, A.L. (1992/a) Involvement of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia Coli*. *EMBO J.* 11, 71-77
826. Yu-Sherman, M. és Goldberg, A.L. (1992/b) Heat shock in *Escherichia Coli* alters the protein-binding properties off the chaperonin groEL by inducing its phosphorylation. *Nature* 357, 167-169
827. Yung, B.Y. és Chan, P-K. (1987) Identification and characterization of a hexameric form of nucleolar phosphoprotein B23. *Biochim. Biophys. Acta* 925, 74-82
828. Zalewski, P.D., Forbes, I.J., Giannakis, C., Cowled, P.A. és Betts, W.H. (1990) Synergy between zinc and phorbol ester in translocation of protein kinase C to cytoskeleton. *FEBS Lett.* 273, 131-134

829. Zalewski, P.D., Forbes, I.J. és Giannakis, C. (1991) Physiological role for zinc in prevention of apoptosis (gene-directed death). *Biochem. Internat.* 24, 1093-1101
830. Zantema, A., de Jong, E., Lardenoije, R. és van der Eb, A.J. (1989) The expression of heat shock protein hsp27 and a complexed 22-kilodalton protein is inversely correlated with oncogenicity of adenovirus-transformed cells. *J. Virol.* 63, 3368-3375
831. Zantema, A., Verlaan-De Vries, M., Maasdam, D., Bol, S. és van der Eb, A.J. (1992) Heat shock protein 27 and alpha-B-crystallin can form a complex, which dissociates by heat shock. *J. Biol. Chem.* 267, 12936-12941
832. Zaret, K.S. és Yamamoto, K.R. (1984) Reversible and persistent changes in chromatin structure accompany activation of a glucocorticoid-dependent enhancer element. *Cell* 38, 29-38
833. Zasloff, M. (1983) tRNA transport from the nucleus in a eukaryotic cell: carrier-mediated translocation process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6436-6440
834. Zasloff, M., Rosenberg, M. és Santos, T. (1982) Impaired nuclear transport of a human variant tRNA<sup>met</sup>. *Nature* 300, 81-84
835. Zeilstra-Ryalls, J., Fayet, O. és Georgopoulos, C. (1991) The universally conserved groE (hsp60) chaperonins. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 301-325
836. Zhao, L.-J. és Padmanabhan, R. (1988) Nuclear transport of adenovirus DNA polymerase is facilitated by interaction with preterminal protein. *Cell* 55, 1005-1015
837. Zick, Y. (1989) The insulin receptor: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 24, 217-269
838. Zick, Y., Sagi-Eisenberg, R., Pines, M., Gierschik, P. és Spiegel, A.M. (1986) Multisite phosphorylation of the alpha subunit of transducin by the insulin receptor kinase and protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9294-9297
839. Ziemiecki, A. (1986) Characterization of the monomeric and complex-associated forms of the gag-onc fusion proteins of three isolates of feline sarcoma virus: phosphorylation, kinase activity, acylation, and kinetics of complex formation. *Virology* 151, 265-273
840. Ziemiecki, A., Catelli, M.-G., Joab, I. és Moncharmont, B. (1986) Association of the heat shock protein hsp90 with steroid hormone receptors and tyrosine kinase oncogene products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138, 1298-1307
841. Zimarino, V., Wilson, S. és Wu, C. (1990) Antibody-mediated activation of *Drosophila* heat shock factor in vitro. *Science* 249, 546-549
842. Zlatanova, J. (1990) Histone H1 and the regulation of transcription of eukaryotic genes. *Trends in Biochem. Sci.* 15, 273-276
843. Zucker, K. és Worcel, A. (1990) The histone H3/H4.N1 complex supplemented with histone H2A-H2B dimers and DNA topoisomerase I forms nucleosomes on circular DNA under physiological conditions. *J. Biol. Chem.* 265, 14487-14496
844. Zylicz, M., LeBowitz, J.H., McMacken, R. és Georgopoulos, C. (1983) The dnaK protein of *Escherichia Coli* possesses an ATPase and autophosphorylating activity and is essential in an in vitro DNA replication system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6431-6435
845. Zylicz, M., Ang, D., Liberek, K. és Georgopoulos, C. (1989) Initiation of lambda DNA replication with purified host- and bacteriophage-encoded proteins: the role of the dnaK, dnaJ and grpE heat shock proteins. *EMBO J.* 8, 1601-1608





39. ábra Az értekezésben felhasznált irodalmi hivatkozások megoszlása a megjelenésük éve szerint



40. ábra Az értekezésben felhasznált irodalmi hivatkozások a fenti folyóiratokból származtak a leggyakrabban

[Az értekezés elkészítése "tisztá időben" 227,5 órát és 851.818 leütést vett igénybe.]

## Zinc Can Increase the Activity of Protein Kinase C and Contributes to Its Binding to Plasma Membranes in T Lymphocytes\*

(Received for publication, September 15, 1987)

Péter Csérmely†, Márta Szamel‡§, Klaus Resch§, and János Somogyi†

From the †Institute of Biochemistry I, Semmelweis University School of Medicine, Budapest POB 260, H-1444 Hungary and the §Division of Molecular Pharmacology, Hannover Medical School, D-3000 Hannover, Federal Republic of Germany

In the primary structure of protein kinase C, the presence of a putative metal-binding site has been suggested (Parker, P. J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M. D., and Ullrich, A. (1986) *Science* 233, 853-859). In the present report, we demonstrate that the most abundant intracellular heavy metal, zinc, can increase the activity of cytosolic protein kinase C. Zinc reversibly binds the enzyme to plasma membranes, and it may contribute to the calcium-induced binding as well. The intracellular heavy metal chelator *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine prevents the phorbol ester- and antigen-induced translocation of protein kinase C. This effect can be totally reversed by the concomitant addition of  $Zn^{2+}$ , while  $Fe^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  are only partially counteractive. Our results suggest that zinc can activate protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes induced by  $Ca^{2+}$ , phorbol ester, or antigen.

The activation and translocation of protein kinase C are well established as key steps in the signal cascade, inducing the proliferation of T lymphocytes (1-3). Binding of protein kinase C to membranes requires an elevated level of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $Ca^{2+}$ -induced or "reversible" binding) or the presence of diacylglycerols which can be very effectively substituted by phorbol esters. These two factors may also act synergistically:  $Ca^{2+}$  may "prime" protein kinase C (and/or its putative docking protein, receptor) for its diacylglycerol- or phorbol ester-stabilized binding to membranes (4-8). However, the mechanism of the translocation of protein kinase C is far from being fully elucidated.

When defining the primary structure of protein kinase C, Parker *et al.* (9) suggested the existence of a putative metal-binding site in the enzyme. We have reported earlier that 12-

*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)<sup>1</sup> treatment of T lymphocytes results in the translocation of heavy metals (mainly zinc) from the nucleus and mitochondria to the cytosol and microsomes (10-12).<sup>2</sup> In our present report we demonstrate that zinc may be involved in both the activation of protein kinase C and its binding to microsomal membranes of T lymphocytes.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—ATP, bovine serum albumin, CHAPS, Chelex 100, 1,2-diolefin, DTT, EDTA, EGTA, Hepes, histone (type III-S), leupeptin,  $\beta$ -mercaptoethanol, Nonidet P-40, phorbol-12,13-dibutyrate, phosphatidylserine, sodium orthovanadate, TMB-8, TPA, and Triton X-100 were from Sigma. Cell culture media and its supplements were Gibco products. BMA 030 anti-CD3 antibody (13) was kindly provided by Dr. F. Seiler and Dr. R. Kurrle (Behringwerke AG, Marburg, Federal Republic of Germany). The antibody was originally referred to as BW 264/56 (13), but was later designated as BMA 030 which is the nomenclature used here. TPEN was obtained from Behring Diagnostics, and H-7 was from Seikagaku America Inc. (St. Petersburg, FL). Polyethylene glycol (*M*, 6000) was purchased from Serva.  $CaCl_2$ ,  $FeSO_4$ ,  $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$ , and  $ZnCl_2$  were ultrapure Merck chemicals. [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol) and [20-<sup>3</sup>H]phorbol-12,13-dibutyrate (18.9 Ci/mmol) were obtained from Amersham Corp. and Du Pont-New England Nuclear, respectively.

**Preparation of T Lymphocytes and Their Subcellular Fractions**—Mouse (CFLP, 6-8 weeks old, male) or rabbit (~1 kg, male) thymocytes were prepared by the method of Kleiman *et al.* (14). Human peripheral blood lymphocytes were obtained by centrifugation of heparinized buffy coat on a Ficoll density gradient. Cells were kept in RPMI 1640 medium supplemented with 10 mM Hepes (pH 7.4). The viability of the cells was never less than 95% as judged by trypan blue exclusion. Each experiment is shown in only one cell type but was usually performed in all three cell types: the results were not significantly different. After preincubation(s) specified in different experiments, cells were suspended in an isolation buffer (consisting of 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, and 20 mM Hepes (pH 7.4), if not otherwise indicated) at a cell density of  $10^8$  cells/ml. Disruption of cells and isolation of their cytosolic and microsomal fractions were done as described earlier (15). Since T lymphocytes contain a relatively small amount of endoplasmic reticulum (15), our microsomal preparation can be regarded as a crude plasma membrane fraction. In this way we use both terms for the designation of the membrane preparation. Microsomes were suspended in the isolation buffer at a protein concentration of 0.5-1.5 mg/ml. Protein concentration was determined simultaneously by the method of Lowry *et al.* (16) and Bradford (17), correcting the results for sulfhydryl compounds, Hepes, and detergents, respectively. Protein kinase C activity was determined immediately after isolation.

**Measurement of Protein Kinase C Activity**—Cytosolic protein kinase C activity was measured from aliquots of the cytosolic fraction without any further purification. Membrane-bound protein kinase C was solubilized from microsomes by incubation with either 0.5% (v/v) Triton X-100 or with 2 mM (2 mg/mg protein) CHAPS in isolation buffer for 20 min at 4 °C, setting the protein concentration to 1.0 to 0.5 mg/ml, respectively. In preliminary experiments we have found that the detergent CHAPS is much more suitable for the solubilization of protein kinase C than Triton X-100 or Nonidet P-40 for two reasons: 1) it does not decrease the activity of protein kinase C significantly, even at concentrations as high as 4-5 mM which was

\*This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft and by research grants from the Hungarian Ministry of Health and from the Hungarian Academy of Sciences. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate; DTT, dithiothreitol; EGTA, [ethylenbis(oxyethylenetriol)]tetraacetic acid; Hepes, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid; H-7, 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine; TMB-8, 8-(*N,N*-diethylamino)octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate; TPEN, *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine.

<sup>2</sup> P. Csérmely and J. Somogyi, *J. Cell. Physiol.*, in press

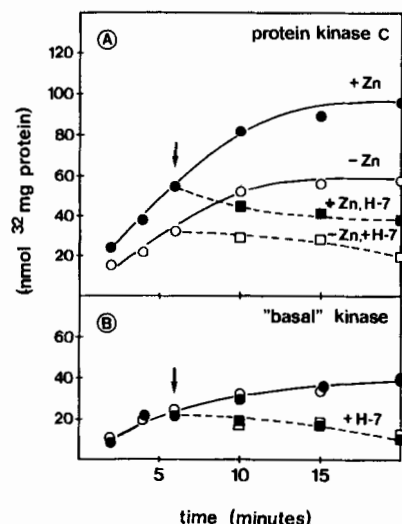


proved by its removal by a Pierce Extracti-Gel D column (data not shown); therefore, we could eliminate the time-consuming DEAE ion-exchange chromatography from our protocol; 2) CHAPS does not significantly disturb the Bradford protein assay (18), in this way a much more exact protein determination could be achieved. After incubation with detergents, the nonsoluble material was removed by centrifugation ( $100,000 \times g$ , 60 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Protein kinase C activity was determined using a reaction medium containing 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4 mM EGTA, 400  $\mu\text{g/ml}$  histone, 400 mM Hepes (pH 7.4), and 60  $\mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP (100 cpm/pmol) with or without 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 200  $\mu\text{g/ml}$  phosphatidylserine, and 20  $\mu\text{g/ml}$  1,2-diolein. (Lipids were dispersed in a double-concentrated Hepes/EGTA/Mg buffer by sonication). The reaction was started by mixing 100  $\mu\text{l}$  of reaction medium with 4–6  $\mu\text{g}$  of sample protein in 100  $\mu\text{l}$  of isolation buffer. After an incubation of 3 min at  $37^\circ\text{C}$ , unless otherwise indicated, the reaction was stopped by the addition of 200  $\mu\text{l}$  of chilled, freshly made trichloroacetic acid (10%, w/v) containing 1 mM ATP and 15 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . 100  $\mu\text{l}$  of bovine serum albumin (2 mg/ml) was added as a carrier, and the precipitated proteins were collected in 0.45- $\mu\text{m}$  Millipore filters. The precipitate was washed by  $5 \times 5\text{ ml}$  of chilled trichloroacetic acid (5%, w/v) containing 15 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , the filters were dried, and the radioactivity was measured. The enzyme activity is expressed as the difference between the values measured in the presence and absence of phospholipids and  $\text{Ca}^{2+}$  in units of nanomoles of  $^{32}\text{P}$  transferred per min/mg protein of the sample.

**Binding of [ $^3\text{H}$ ]Phorbol Dibutyrate**—Binding of [ $^{20}\text{-}^3\text{H}$ ]phorbol-12,13-dibutyrate was measured by modification of the method of Leach *et al.* (19). Briefly, 20–100  $\mu\text{g}$  of protein in 200  $\mu\text{l}$  of isolation buffer was added to 200  $\mu\text{l}$  of binding medium containing 40 mM Hepes (pH 7.4), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , and 10 nM [ $^3\text{H}$ ]phorbol-12,13-dibutyrate. In preliminary experiments, we have found that the presence of bovine serum albumin (at a final concentration of 1–10 mg/ml) in the binding medium drastically reduces the specific binding in the case of both cytosolic and membrane samples, while the nonspecific binding (measured in the presence of 1  $\mu\text{M}$  phorbol-12,13-dibutyrate) remains unaffected. Therefore, bovine serum albumin was omitted from the binding medium. Measurement of phorbol dibutyrate binding to cytosolic samples was done in the presence of 200  $\mu\text{g/ml}$  phosphatidylserine. After an incubation of 30 min at  $37^\circ\text{C}$  samples were cooled to  $0^\circ\text{C}$ , and 50  $\mu\text{l}$  of bovine serum albumin (20 mg/ml) and 200  $\mu\text{l}$  of 30% (w/v) polyethylene glycol were added. Further steps of the binding assay were identical with those described by Leach *et al.* (19). Measurements of [ $^3\text{H}$ ]phorbol dibutyrate binding were done in duplicate with a difference of less than 15%. Some samples were analyzed after freezing in liquid nitrogen and storing 1–4 weeks at  $-80^\circ\text{C}$ . Preliminary experiments indicated no significant difference in the phorbol ester binding capacity of fresh and frozen samples.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Zinc Can Activate Protein Kinase C**—As seen in Fig. 1, cytosolic protein kinase C is activated by the addition of  $\text{Zn}^{2+}$  while the activity of “basal” kinases (measured in the absence of calcium and phospholipids) does not change significantly. The activation of protein kinase C ranges between 30 and 90% in different preparations at optimal total zinc concentrations in the range of 0.7–1.0 mM. The activity of membrane-bound protein kinase C cannot be increased significantly by the addition of zinc. However, at zinc concentrations higher than 2.0 mM, zinc sharply inhibits the activity of both cytosolic and membrane-bound protein kinase C (data not shown). Under optimal conditions for the activation of protein kinase C, zinc has a free concentration in the range of  $10^{-8}\text{ M}$ , while the inhibition occurs at free  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations in the micromolar range. The approximate free zinc concentrations were estimated after Bartfai (20) using the stability constants of EGTA, EDTA, and DTT (given in Refs. 20 and 21) corrected to pH 7.4 with the corresponding  $\alpha_{\text{H}}$  values. We have to note that even the estimation of free  $\text{Zn}^{2+}$  concentrations is extremely difficult in a system that contains three chelators (EGTA, EDTA, DTT), three divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), endogenous chelators (proteins), and cations of the cytosolic fraction. In this way the values of free  $\text{Zn}^{2+}$  concen-



**FIG. 1. Activation of protein kinase C by zinc.** Cytosolic protein kinase C was isolated from rabbit thymocytes, and its activity was measured as described under “Experimental Procedures.” In panel A the activity of protein kinase C and in panel B the activity of basal kinases are shown. Open symbols represent activities measured in the absence and filled symbols in the presence of zinc at a total concentration of 0.75 mM. At the arrows the protein kinase inhibitor H-7 was added to aliquots of the reaction mixtures, and protein kinase activities were measured at different time points in the absence ( $\circ$ — $\circ$ ,  $\bullet$ — $\bullet$ ) and presence ( $\square$ — $\square$ ,  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ) of H-7 at a final concentration of 100  $\mu\text{M}$ . Data are representatives of four experiments with standard errors less than 15%.

trations can be regarded only as very rough estimates.

The variation of both the optimal concentration of zinc and the rate of activation of protein kinase C may reflect that the metal-binding site of the enzyme is differently saturated with endogenous heavy metals in different preparations. This possible diversity may be related to the existence of different, genetically defined isoforms of the enzyme, as reported by many laboratories (22, 23 and references therein). In their early report Nishizuka and his co-workers (24) did not find any effect of zinc on the activity of protein kinase C. However, in their early studies they investigated the proteolytic product of the enzyme (protein kinase M) which lacks the regulatory domain. Since the metal-binding site has been proposed to be part of the regulatory domain (9), this apparent discrepancy supports the role of the putative metal-binding site in the zinc-induced activation of protein kinase C.

The cause of the zinc-induced protein kinase C activation is neither the effect of the  $\text{Cl}^-$  anions, since it can be demonstrated by  $\text{ZnSO}_4$  or zinc acetate as well, nor the effect of  $\text{Ca}^{2+}$  ions which are displaced by zinc in their EGTA-, EDTA-complexes, since no activation of protein kinase C occurs if we add equimolar excess of calcium instead of zinc (data not shown). The activation cannot be attributed to the activation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase, since no activation occurs in the presence of both zinc and calcium (and in the absence of phospholipids) (not shown). Zinc does not influence the “basal” protein kinase activity (Fig. 1). This argues against the general role of proteolysis in the zinc-induced enzyme activation. The activation is a “real” activation of the kinase and not the inhibition of the corresponding phosphatases, since after the inhibition of protein kinase C by the protein kinase inhibitor, H-7 (25), the decline in the level of phosphorylation has a similar rate in the absence and presence of zinc (Fig. 1). However, zinc is known to be a better inhibitor of phosphotyrosine protein phosphatases than those of phosphoserine and phosphothreonine phosphatases (26). This raises



TABLE I

Binding of protein kinase C to plasma membranes induced by calcium and zinc

The cytosol and crude plasma membrane fraction of rabbit thymocytes were isolated as described under "Experimental Procedures." The isolation buffer contained 20 mM Hepes (pH 7.4), 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and the specific additions indicated. After isolation, protein kinase C activity was determined as described under "Experimental Procedures." Data are mean  $\pm$  S.D. of three experiments.

Method of isolation (specific additions to the isolation buffer)	Protein kinase C activity	
	Cytosol	Plasma membranes
	nmol $^{32}$ P/min/mg protein	
EDTA (2 mM), EGTA (1 mM)	6.0 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.3
EDTA (2 mM), EGTA (1 mM), 50 $\mu$ g/ml leupeptin	6.1 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.4
CaCl <sub>2</sub> (3.1 mM), EGTA (1 mM), EDTA (2 mM)	5.1 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.3
CaCl <sub>2</sub> (0.1 mM), 50 $\mu$ g/ml leupeptin	2.0 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.8
"Ca-plasma membranes" + EGTA extraction"	4.6 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.4
ZnCl <sub>2</sub> (50 $\mu$ M), 50 $\mu$ g/ml leupeptin	2.5 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.7
"Zn-plasma membranes" + EGTA extraction"	4.8 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.3

"Plasma membranes isolated in the presence of 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> or 50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> were treated with EGTA and EDTA at final concentrations of 1.0 and 2.0 mM, respectively, in the presence of 20 mM Hepes (pH 7.4), and 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol for 60 min at 4 °C. After incubation, membrane vesicles were separated by centrifugation. "Cytosol" denotes the supernatant and "plasma membranes" the pellet, respectively, in these cases.

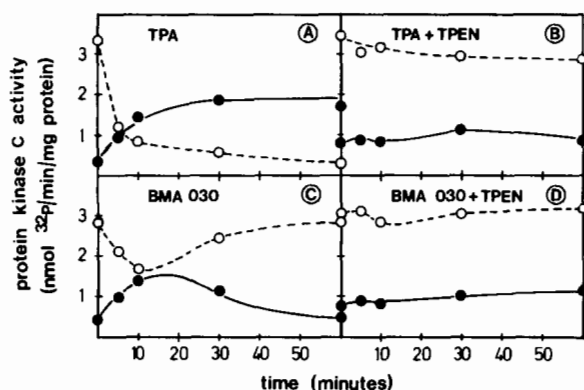


FIG. 2. The effect of the intracellular heavy metal chelator TPEN on the translocation of protein kinase C. Human peripheral blood lymphocytes were isolated as described under "Experimental Procedures." Cells were preincubated at 37 °C with TPEN (panels B and D) at a final concentration of 50  $\mu$ M or with its solvent dimethyl sulfoxide (0.5% v/v; panels A and C) for 20 min, and the incubation was continued with TPA (panels A and B) or with the anti-CD3 antibody BMA 030 (panels C and D) at final concentrations of 20 nM and 20 ng/ml, respectively. (The concentration of BMA 030 was selected as the optimum for its mitogenic activity, data not shown.) The incubation was terminated at time points indicated by rapid cooling to 0 °C and centrifugation of the cells. Cytosol and crude plasma membrane fractions were isolated, and their protein kinase C activity was measured as described under "Experimental Procedures." Open and closed circles represent protein kinase C activities of the cytosol and plasma membranes, respectively. Data are representatives of three experiments.

the possibility that zinc develops a heretofore hidden induction of protein kinase C activity via tyrosine phosphorylation. Our results demonstrate no activation of the cytosolic enzyme after preincubation with 60  $\mu$ M ATP in the absence or presence of 100  $\mu$ M sodium vanadate, another known inhibitor of phosphotyrosine protein phosphatases (27) (data not shown). This argues against the role of tyrosine phosphorylation in

the zinc-induced activation of cytosolic protein kinase C.

**Zinc Induces the Reversible Binding of Protein Kinase C to Microsomes**—The results of Table I show that zinc induces the binding of protein kinase C to plasma membranes similarly to the reversible binding induced by calcium which was observed by several groups (5–7, 28). The endogenous calcium content of cytosolic and microsomal fractions can contribute to the zinc-induced binding of protein kinase C. However, we got very similar results after the samples had been treated with the chelating resin, Chelex 100, to remove endogenous calcium (data not shown). This strengthens the conclusion that zinc can induce the binding of protein kinase C to microsomes. The zinc-induced binding is also reversible in the sense that protein kinase C activity can be recovered in the supernatant after EGTA treatment. Interestingly, calcium alone (under conditions when heavy metals are chelated) can induce only a partial translocation of protein kinase C activity to plasma membranes. This suggests that zinc which is usually present in solutions as a contaminant at concentrations as high as 0.5–1  $\mu$ M (as determined by plasma emission spectroscopy (12)) may contribute to the "Ca<sup>2+</sup>-induced" binding of protein kinase C and thus plays a general role in the reversible binding of the enzyme to membranes.

**The Chelation of Heavy Metals Can Abolish the TPA- and Antigen-induced Translocation of Protein Kinase C: the Effect Can Be Reversed by the Addition of Zinc**—Fig. 2 shows that in agreement with earlier reports (see Refs. 1, 3 and references therein), TPA causes a sustained translocation of protein kinase C while the antibody directed against the T cell receptor induces a transient change in the localization of the enzyme activity. Fig. 2 also shows that the intracellular heavy metal chelator TPEN, re-introduced by Arslan *et al.* (29), can abolish the TPA- and antigen-induced translocation of protein kinase C in T lymphocytes. The reason for this inhibition is not the chelation of intracellular calcium ions by TPEN because TPEN causes no decrease in the intracellular calcium concentration (29)<sup>2</sup> and the calcium antagonist TMB-8 is not able to prevent the translocation of protein kinase C (Table II).

As shown in Table II, TPEN loses its ability to prevent the translocation of protein kinase C if it is administered together with zinc, forming a Zn-TPEN complex. This suggests that the reason for the inhibition is not the effect of TPEN as a chemical compound but the effective intracellular chelation of heavy metals (most probably zinc) during the activation of T lymphocytes. The selectivity for zinc is further supported by the fact that two out of the four most abundant intracellular heavy metals (in the order of decreasing total concentration: zinc, copper  $\approx$  iron, and manganese (11, 12)), iron and manganese, can only partially reverse the effect of TPEN (Table II). Fe- and Mn-TPEN alone did not cause any effect in the distribution and activity of protein kinase C (data not shown). Copper was not examined since it has a 5 magnitudes higher affinity for TPEN than zinc (30). In this way copper displaces zinc from its complex with TPEN, making it impossible to discriminate between their effects.

The translocation of Ca<sup>2+</sup>- and phospholipid-dependent histone kinase activity cannot be regarded as an unambiguous sign of the translocation of protein kinase C as a protein because of possible changes in the substrate specificity of the enzyme (31). Therefore, we have investigated the distribution of [<sup>3</sup>H]phorbol dibutyrate receptors simultaneously. Our results in Table II show that the distribution of phorbol dibutyrate receptor is corresponding to the distribution of protein kinase C activity in different samples. These results suggest that the changes in the distribution of protein kinase C



TABLE II

The effect of different agents on the TPA- and antigen-induced translocation of protein kinase C

Human peripheral blood lymphocytes and their cytosolic and crude plasma membrane fractions were isolated, and the protein kinase C activity and [<sup>3</sup>H]phorbol dibutyrate-binding capacity were analyzed as described under "Experimental Procedures." Treatment of the cells with different agents was performed as described in the legend of Fig. 2, with the exception that the time of incubation with TPA or the anti-CD3 antibody BMA 030 was 10 min at 37 °C. Zn-TPEN, Fe-TPEN, and Mn-TPEN were produced by mixing equimolar amounts of TPEN and ZnCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, and MnCl<sub>2</sub>, respectively. The complexes were administered to get the same final concentration for TPEN (50 μM) as in the treatment with TPEN alone. Cells were treated with TMB-8 at a final concentration of 100 μM for 20 min at 37 °C. Data are mean ± S.D. of three experiments.

Treatment	Protein kinase C activity		[ <sup>3</sup> H]Phorbol dibutyrate binding	
	Cytosol	Plasma membranes	Cytosol	Plasma membranes
	nmol <sup>32</sup> P/min/mg protein		fmol/mg protein	
Control	3.4 ± 0.6	0.7 ± 0.3	1200 ± 120	150 ± 30
+ TPA	0.4 ± 0.2	1.8 ± 0.4	80 ± 10	560 ± 60
+ BMA 030 antibody	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2	700 ± 110	510 ± 90
+ TPEN	3.5 ± 0.4	0.6 ± 0.2	1010 ± 30	180 ± 40
+ TPEN, TPA	2.9 ± 0.5	0.6 ± 0.1	950 ± 50	230 ± 20
+ Zn-TPEN, TPA	0.3 ± 0.1	1.5 ± 0.2	ND <sup>a</sup>	470 ± 50
+ TPEN, BMA 030	3.1 ± 0.4	0.8 ± 0.2	1130 ± 70	ND <sup>a</sup>
+ Zn-TPEN, BMA 030	1.7 ± 0.4	1.6 ± 0.3	760 ± 80	360 ± 60
+ Fe-TPEN, TPA	1.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	750 ± 20	150 ± 40
+ Mn-TPEN, TPA	1.5 ± 0.7	1.1 ± 0.3	580 ± 20	250 ± 20
+ TMB-8	3.6 ± 0.3	0.8 ± 0.3	1350 ± 140	200 ± 20
+ TMB-8, TPA	0.3 ± 0.05	1.6 ± 0.3	40 ± 20	570 ± 40
+ TMB-8, BMA 030	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.2	800 ± 50	540 ± 20

<sup>a</sup> ND, not detectable.

activity reflect real changes in the distribution of the enzyme in our system.

**Addendum**—While this manuscript was being reviewed, Murakami *et al.* (32) published similar results regarding the biphasic activation and inactivation of protein kinase C by Zn<sup>2+</sup>.

#### REFERENCES

- Nishizuka, Y. (1986) *Science* **233**, 305–312
- Dröge, W. (1986) *Immunol. Today* **7**, 340–343
- Farrar, W. L., and Ruscelli, F. W. (1986) *J. Immunol.* **136**, 1266–1273
- Ashendel, C. L., and Minor, P. M. (1986) *Carcinogenesis* **7**, 517–521
- Wolf, M., Le Vine, H., III, May, W. S., Jr., Cuatrecasas, P., and Sahyoun, N. (1985) *Nature* **317**, 546–549
- Wolf, M., Cuatrecasas, P., and Sahyoun, N. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 15718–15722
- Gopalakrishna, R., Barsky, S. H., Thomas, T. P., and Anderson, W. B. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 16438–16445
- Hurst, N. P., Zalewski, P. D., Forbes, I. J., and Valente, L. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**, 554–559
- Parker, P. J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M. D., and Ullrich, A. (1986) *Science* **233**, 853–859
- Csermely, P., and Somogyi, J. (1986) in *Proceedings of the 2nd European Congress on Cell Biology, Acta Biol. Hung.* **37**, 208
- Csermely, P., Gueth, S., and Somogyi, J. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 863–868
- Csermely, P., Fodor, P., and Somogyi, J. (1987) *Carcinogenesis* **8**, 1663–1666
- Kurrie, R., Seifert, W., Trautwein, A., and Seiler, F. R. (1985) *Transplant. Proc.* **17**, 880–884
- Kleiman, W. J., Friedman, D. L., and Di Sabato, G. (1984) *Methods Enzymol.* **108**, 43–49
- Ferber, E., Resch, K., Wallach, D. F. H., and Imm, W. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **266**, 494–504
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Fanger, B. D. (1987) *Anal. Biochem.* **162**, 11–17
- Leach, K. L., James, M. L., and Blumberg, P. M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 4208–4212
- Bartfai, T. (1979) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **10**, 219–242
- Bjerrum, J., Schwarzenbach, G., and Sillén, L. G. (1957) *Stability Constants of Metal Ion Complexes*, Part I, The Chemical Society, London
- Sekiguchi, K., Tsukuda, M., Ogita, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**, 797–802
- Jaken, S., and Kiley, S. C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 4418–4422
- Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., and Nishizuka, Y. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 7610–7616
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S., and Sasaki, Y. (1984) *Biochemistry* **23**, 5036–5041
- Sparks, J. W., and Brautigan, D. L. (1986) *Int. J. Biochem.* **18**, 479–504
- Swarup, G., Cohen, S., and Garbers, D. L. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 1104–1109
- Niedel, J. E., Kuhn, L. J., and Vandenberg, G. R. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 36–40
- Arslan, P., Di Virgilio, F., Beltrame, M., Tsien, R. Y., and Pozzan, T. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 2719–2727
- Adreneg, G., Hubmann, E., Podder, N. G., and Wenk, F. (1977) *Helv. Chim. Acta* **60**, 123–140
- Cochet, C., Souvignat, C., Keramidis, M., and Chambaz, E. M. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**, 1031–1037
- Murakami, K., Whiteley, M. K., and Routtenberg, A. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 13902–13906

**ZINC INCREASES THE AFFINITY OF PHORBOL ESTER RECEPTOR  
IN T LYMPHOCYTES**

Péter Csermely<sup>1</sup>, Márta Szamel<sup>1,2</sup>, Klaus Resch<sup>2</sup> and  
János Somogyi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inst. Biochem.I., Semmelweis Univ. Sch. Med.  
POB 260 Budapest, H-1444 Hungary

<sup>2</sup>Div. Molecular Pharmacology, Medical School Hannover  
D-3000 Hannover, Fed. Rep. Germany

Received June 8, 1988

---

In the primary structure of the major phorbol ester receptor, protein kinase C the presence of putative metal (zinc) binding sites has been suggested. We have demonstrated earlier that zinc activates protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes. Here we report that zinc increases the phorbol ester binding affinity of cytosolic protein kinase C. The effect of zinc on the membrane-bound enzyme is much less pronounced. Our results raise the possibility that cytosolic protein kinase C is a mixture of isoenzymes with different sensitivity towards zinc ions.

---

© 1988 Academic Press, Inc.

Six years ago Castagna et al (1) have discovered that tumor promoter phorbol esters specifically and directly activate protein kinase C. After their initial studies numerous reports have demonstrated that indeed, the phorbol ester receptor is protein kinase C (2-4).

Defining the primary structure of protein kinase C Parker et al (5) have found cysteine-repeating sequences in the regulatory domain of the enzyme which often appears as a motif of Zn<sup>2+</sup>- and DNA-binding domains (6,7). Examining the possible role of these "zinc-fingers" we have found that zinc can activate protein kinase C at nanomolar free concentration (8,9). Simultaneously Murakami et al (10) also demonstrated a zinc-induced activation of the enzyme. Besides the activation of protein kinase C zinc seems to contribute to the Ca<sup>2+</sup>-, phorbol ester- and antigen-induced binding of the enzyme to plasma membranes in T lymphocytes (8,9).

In the present report as a next step in the elucidation of interactions between protein kinase C and zinc we examine the effect of zinc on binding of radioactive phorbol ester to its cytosolic and microsomal receptors in T lymphocytes.



## MATERIALS AND METHODS

Materials: bovine serum albumin, dithio-treitol, EDTA, EGTA, Hepes, phorbol dibutyrate, phosphatidyl serine and Triton X-100 were from Sigma. Cell culture media were Gibco products. N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) was obtained from Calbiochem. Polyethylene glycol (M.w.: 6000) was purchased from Serva.  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  and  $\text{ZnCl}_2$  were ultra-pure Merck chemicals.  $[20\text{-}^3\text{H}]\text{phorbol-12,13-dibutyrate}$  ( $^3\text{H-pdbu}$ ), 18.9 Ci/mmol) was obtained from Du Pont-New England Nuclear.

Preparation of microsomes and cytosol of T lymphocytes: Rabbit (1 kg, male) thymocytes were prepared by the method of Kleiman et al (11) in Eagle's Minimal Essential Medium supplemented with 10 mM Hepes (pH 7.4). Cells were suspended in isolation buffer (consisting of 1 mM EGTA, 2 mM EDTA, 5 mM dithio-treitol and 20 mM Hepes, pH 7.4) at a cell density of  $10^8$  cells/ml. Disruption of cells and isolation of their cytosolic and microsomal fractions were done as described earlier (12). Microsomes were suspended in isolation buffer at a protein concentration of 0.5-1.5 mg/ml. Protein concentration was determined by the method of Bradford (13).

Binding of  $[^3\text{H}]\text{phorbol-dibutyrate}$ : Binding of  $[20\text{-}^3\text{H}]\text{phorbol-12,13-dibutyrate}$  was measured by modification of the method of Leach et al (3) as described earlier (9). Measurements of  $[^3\text{H}]\text{phorbol-dibutyrate}$  binding were done in duplicates with a difference of less than 15 %. Data are expressed as a difference of  $[^3\text{H}]\text{phorbol-dibutyrate}$  binding in the absence and presence of  $1\text{ }\mu\text{M}$  unlabeled phorbol-dibutyrate (specific binding).

## RESULTS

Figure 1. shows the dependence of  $[^3\text{H}]\text{phorbol-12,13-dibutyrate}$  ( $^3\text{H-pdbu}$ ) binding on the total concentration of zinc ions. Zinc increases the cytosolic binding of phorbol-dibutyrate to approximately 2-fold, while it affects only slightly the membrane binding of the phorbol ester. Zinc produces its maximal effect on the cytosolic phorbol ester receptor at a final concentration of 0.35-0.4 mM which corresponds to a free concentration of zinc in the range of  $10^{-9}$  M. The approximate free zinc concentration was estimated after Bartfai (14) using the stability constants of EGTA, EDTA and dithio-treitol --given in refs. 14 and 15-- corrected to pH 7.4 with the corresponding  $\alpha_{\text{H}}$  values. We have to note that this value can be regarded only as a very rough estimate, since even the estimation of free  $\text{Zn}^{2+}$  concentration is extremely difficult in a system which contains three chelators (EGTA, EDTA, dithio-treitol), three divalent cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ), endogenous chelators (proteins) and cations of the cytosol.

The aspecific binding of the cytosolic and membrane samples were  $39 \pm 6$  and  $58 \pm 8$  fmol respectively in the experiments of Figure 1. Zinc did not influence significantly the aspecific binding of  $[^3\text{H}]\text{phorbol-dibutyrate}$  throughout the whole concentration range tested. Without phosphatidyl serine zinc had no effect on  $^3\text{H-pdbu}$  binding to membrane samples while it had only a very slight effect on the cytosolic binding of phorbol-dibutyrate. The effect of zinc was similar if we tested it at other protein concentrations (data not shown).

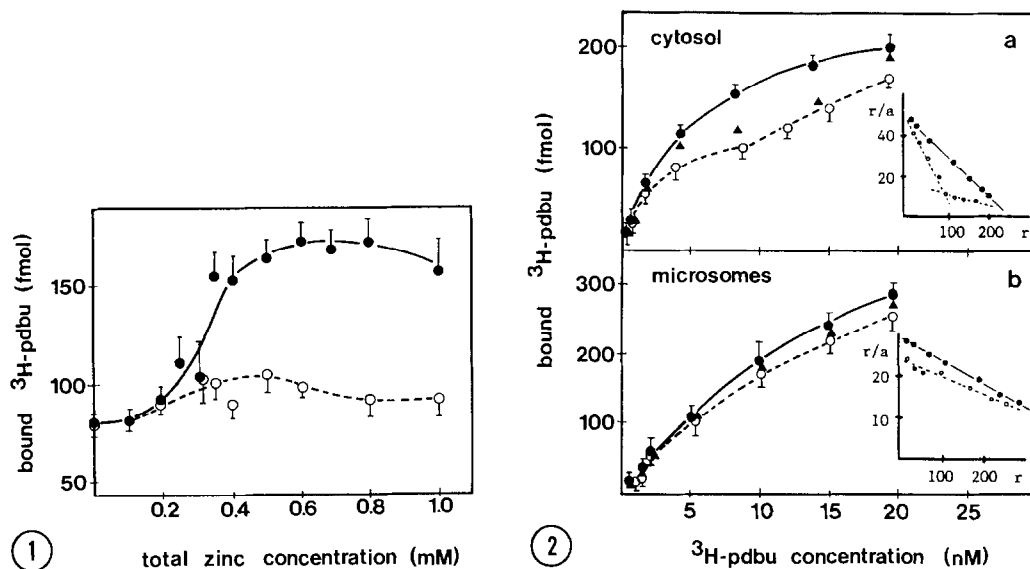


Figure 1. The effect of zinc on the binding of  $[^3\text{H}]$ phorbol-dibutyrate. Cytosolic (●—●) and microsomal (○ - - ○) fractions of rabbit thymocytes were isolated and their  $[^3\text{H}]$ phorbol-dibutyrate ( $[^3\text{H}]$ -pdbu) binding was analysed as described in "Materials and Methods". The binding medium contained 10 nM  $[^3\text{H}]$ phorbol-dibutyrate, 50  $\mu\text{g}$  of cytosolic and 100  $\mu\text{g}$  of microsomal protein, respectively and  $\text{ZnCl}_2$  at final concentrations indicated. Data are means  $\pm$  SDs of three separate experiments.

Figure 2. Concentration dependency of  $[^3\text{H}]$ phorbol-dibutyrate ( $[^3\text{H}]$ -pdbu) binding in zinc depleted and supplemented cytosol (a) and microsomes (b). The cytosol and microsomes of rabbit thymocytes were isolated and binding of  $[^3\text{H}]$ -pdbu was measured as described in "Materials and Methods". Binding medium contained 50  $\mu\text{g}$  of cytosolic and 200  $\mu\text{g}$  of microsomal protein, respectively;  $\text{ZnCl}_2$  at final concentration of 0.7 mM (●—●), 100  $\mu\text{M}$  TPEN (○ - - ○) or no addition (▲).  $[^3\text{H}]$ -pdbu was added at final concentrations indicated. The insets show the Scatchard analysis of the binding. Data are means  $\pm$  SDs of three separate experiments.

Figure 2. shows the difference in the concentration dependency of  $[^3\text{H}]$ phorbol-dibutyrate binding in the presence (filled circles) and absence of zinc (open circles). The removal of endogenous zinc was enhanced by the addition of the hydrophobic chelator of heavy metals, N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN, 16). TPEN has 7 and 2 orders of magnitude higher affinity for zinc than EGTA and EDTA, respectively (15,17) and it can penetrate to hydrophobic environment as well. In this way TPEN may have a much higher efficacy in removal of zinc from its binding sites than EGTA or EDTA. In the zinc depleted cytosol the binding curve of phorbol-dibutyrate and its Scatchard analysis (see inset in Figure 2., panel a) suggests the presence of at least two binding sites for  $[^3\text{H}]$ phorbol-dibutyrate of different affinity for the phorbol ester. After the addition of zinc (filled circles) the binding of phorbol-dibutyrate can be characterised only



with one, "high-affinity" binding site. The binding constant of the high affinity site is in the range of 3-5 nM while the "low affinity" site of the zinc-depleted sample has a binding constant  $\approx 27$  nM. The high affinity binding in the zinc depleted cytosol corresponds to approximately 1/3 of the overall binding sites. Phorbol ester binding in the presence of only EGTA and EDTA is similar to that of the TPEN treated samples (see triangles).

Zinc has a much slighter effect on the phorbol-dibutyrate binding of microsomal samples (Figure 2., panel b). Microsomal samples show only a "low affinity" binding. Their binding constants are  $\approx 21$  and  $\approx 28$  nM in the presence or in the absence of zinc, respectively. The difference in the binding constant of high affinity cytosolic and microsomal phorbol ester receptors is in good agreement with the results of several other laboratories (4,18). The overall increase in the binding constant of microsomal phorbol-dibutyrate binding compared to the high affinity binding sites of the cytosol may reflect the reduced accessibility of phorbol ester binding sites, a possible occupation of the binding sites by endogenous diacyl-glycerols or simply the "dilution" of hydrophobic phorbol ester by the membrane lipids.

#### DISCUSSION

Our present report demonstrates that zinc markedly increases the binding affinity of cytosolic phorbol ester receptors while it has only a slight effect on the phorbol-dibutyrate binding of microsomal samples. The effect of zinc can not be a simple aspecific aggregation of the polyethylene glycol precipitated proteins since zinc does not increase the aspecific binding of phorbol-dibutyrate and it has markedly different effects on cytosolic and microsomal samples.

Calcium is known to increase the binding affinity of phorbol ester to its receptor (17,19,20). Zinc having a higher affinity to EDTA and EGTA than calcium excludes  $\text{Ca}^{2+}$  from its complexes with these chelators. However, the effects of zinc were specific since the addition of equimolar  $\text{CaCl}_2$  did not cause a significant increase in the binding of  $^3\text{H}$ -pdbu (data not shown). The free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in our binding medium was approx. 110  $\mu\text{M}$  while Sando at Young (18) have demonstrated that  $^3\text{H}$ -pdbu binding has a saturation above a free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of 10  $\mu\text{M}$ . The effects of zinc are different from those of  $\text{Ca}^{2+}$ . Calcium induces a marked increase in the affinity of  $^3\text{H}$ -pdbu binding of particulate fractions (19,20). On the contrary, zinc has only a slight effect on the microsomal phorbol ester binding.

If endogenous zinc is depleted from the cytosol by the addition of N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) the cytosolic phorbol-

-dibutyrate binding can be characterised by multiple (at least two) binding sites with different affinities. Our results are similar to the data of Ashendel (4) who also demonstrated the presence of a high and a low affinity binding site of  $^3\text{H}$ -tetradecanoyl-phorbol-acetate in the cytosol. This phenomena may reflect the presence of isoenzymes of protein kinase C which were discovered just recently (21-23). Taken these data together it can be supposed that cytosol contains various isoforms of phorbol ester receptor/protein kinase C which are different in respect of their zinc content. The addition of zinc may "prime" the "low affinity" cytosolic phorbol ester receptor and "convert" it to a "high affinity" one. Further experiments are needed to clarify whether TPEN-treated cytosolic protein kinase C represents a partially or totally zinc-depleted enzyme. If TPEN deplets only a part of the zinc content of protein kinase C the existence of phorbol ester receptors with even lower affinity may be anticipated.

Zinc has a much smaller effect on the affinity of membrane-bound phorbol ester receptors. Our recent studies suggested that zinc is necessary for the binding of phorbol ester receptors to microsomal membranes (9). Membrane-bound protein kinase C may be saturated with zinc --as a possible prerequisite of membrane binding-- and therefore additional zinc causes only a slight increase in its binding affinity towards phorbol esters. The zinc binding site(s) of protein kinase C may be buried after membrane binding and/or the affinity of these sites may be higher than that of TPEN. This may explain the slight difference between phorbol ester binding of TPEN- and zinc-treated microsomal preparations. However, to strengthen this hypothesis numerous further evidences are needed. The investigation of interrelationships between zinc and the isoforms of protein kinase C is in progress in our laboratory.

In recent studies we demonstrated that phorbol ester treatment causes an intracellular translocation of zinc from the nucleus and mitochondria to the cytosol and microsomes of T lymphocytes (24,25). The phorbol ester-induced increase in the zinc concentration of the cytosol was supported further by the observation that phorbol ester (or diacyl glycerol) treatment impairs the  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting ability of Ca-ionophores most probably by enhancing the formation of stable Zn-ionophore complexes (26). This effect can be generalised: zinc can substitute  $\text{Ca}^{2+}$  in a number of  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites (27). In this way zinc may be involved in the phorbol ester (protein kinase C)-induced attenuation of  $\text{Ca}^{2+}$  signals.

On the other hand the intracellular translocation of zinc after phorbol ester treatment activates protein kinase C, supports its binding to plasma



membranes (9) and enhances the affinity of cytosolic protein kinase C towards phorbol-dibutyrate. These effects may take place at a later period of T lymphocyte activation (approximately after 1.5 hours, see ref. 26). Thus zinc may be involved in the prolonged activation of protein kinase C under conditions when the initial activators of the enzyme (mostly: diacyl glycerols) have been already metabolised. In this way the zinc-induced increase in phorbol ester binding affinity may have a physiological importance in the activation of T lymphocytes.

## REFERENCES

1. Castagna, M., Takai, Y., Kaibushi, K., Jano, K., Kikkawa, V. and Nishizuka, Y. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7847-7851.
2. Niedel, J.E., Kuhn, L.J. and Vandenbark, G.R. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 36-40.
3. Leach, K.L., James, M.L. and Blumberg, P.M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4208-4212.
4. Ashendel, C.L. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 822, 219-242.
5. Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D. and Ullrich, A. (1986) *Science* 233, 853-859.
6. Berg, J.M. (1986) *Science* 232, 485-487.
7. Evans, R.M. and Hollenberg, S.M. (1988) *Cell* 52, 1-3.
8. Csermely, P., Szamel, M., Resch, K. and Somogyi, J. (1987) *Proc. of the 18th Int. Leukocyte Culture Conference, Montpellier*. In: *Immunobiology* 174 (S1) 147-148.
9. Csermely, P., Szamel, M., Resch, K. and Somogyi, J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 6487-6490.
10. Murakami, K., Whiteley, M.K. and Routtenberg, A. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 13902-13906.
11. Kleiman, W.J., Friedman, D.L. and DiSabato, G. (1984) *Methods in Enzymology* 108, 43-49.
12. Ferber, E., Resch, K., Wallach, D.F.H. and Imm, W. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 266, 494-504.
13. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 162, 248-254.
14. Bartfai, T. (1979) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 10, 219-242.
15. Bjerrum, J., Schwarzenbach, G. and Sillén, L.G. (1957) *Stability Constants of Metal Ion Complexes, Part I.*, The Chemical Society, London.
16. Arslan, P.F., DiVirgilio, F., Beltrame, M., Tsien, R.Y. and Pozzan, T. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2719-2727.
17. Adrenegg, G., Hubmann, E., Podder, N.G. and Wenk, F. (1977) *Helv. Chim. Acta* 60, 123-140.
18. Sando, J.J. and Young, M.C. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2642-2647.
19. Dunphy, W.G., Kochenburger, R.J., Castagna, M. and Blumberg, P. (1981) *Cancer Res.* 41, 2640-2647.
20. Ashendel, C.L., Staller, J.M. and Boutwell, R.K. (1983) *Cancer Res.* 43, 4333-4337.
21. Woodgett, J.R. and Hunter, T. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 4836-4843.
22. Sekiguchi, K., Tsukuda, M., Ogita, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 797-802.
23. Jaken, S. and Kiley, S.C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4418-4422.
24. Csermely, P., Gueth, S. and Somogyi, J. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 863-868.
25. Csermely, P., Fodor, P. and Somogyi, J. (1987) *Carcinogenesis* 8, 1663-1666.
26. Csermely, P. and Somogyi, J. (1988) *J. Cell. Physiol.* in press.
27. Haberman, E. and Richardt, G. (1986) *Trends in Pharmacol Sci.* 7, 298-230.

# Tumor Promoter 12-0-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetate (TPA) Can Reduce the Ca-Transporting Ability of Ca-Ionophores in T Lymphocytes: The Involvement of Intracellular Heavy Metal Ions

PÉTER CSERMELY\* AND JÁNOS SOMOGYI

*Institute of Biochemistry I., Semmelweis University, School of Medicine, Budapest H-1444, Hungary*

12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) can significantly reduce the Ca-ionophore-induced rise in the intracellular calcium concentration ( $Ca_i$ ) of T lymphocytes measured by quin2 or fura-2 fluorescence. This counteraction of TPA is maximal at a preincubation of 90 min at TPA concentrations higher than 20 nM.  $^{45}Ca$  uptake and efflux measurements directly indicate that TPA does not activate the calcium extrusion systems in thymocytes but impairs the Ca-transporting ability of Ca-ionophores. TPA causes no immobilization of the Ca-ionophores as it is demonstrated by the lack of significant changes in fluorescence and fluorescence polarisation of A23187 during TPA incubation. Similarly the energy transfer between the Tyr, Try groups of membrane proteins and A23187 shows no significant difference in control and TPA treated thymocytes. This indicates that A23187 is not in a membrane protein-bound form after TPA preincubation. The intracellular heavy metal chelator, N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) restores the ionophoretic ability of Ca-ionophores in TPA pretreated cells to the control level. Diacyl-glycerols also impair the Ca-transporting ability of Ca-ionophores. TPEN prevents this effect as well. These findings suggest that TPA and diacyl-glycerols may cause an increase in the availability of intracellular heavy metal ions. Our results may reflect a new, physiologically important mechanism of the action of diacyl-glycerols and phorbol esters.

The tumor promoter 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) is mitogenic for T lymphocytes of wide origin (Whitfield et al., 1973; Mastro and Mueller, 1974; Wang et al., 1975; Mastro and Smith, 1983; Gelfand et al., 1985) and synergistically enhances the mitogenic effects of lectins (Mastro and Mueller, 1974; Wang et al., 1975; Gelfand et al., 1985) or calcium ionophores (Wang et al., 1975; Mastro and Smith, 1983). However, in the past years several reports have demonstrated that TPA can *inhibit* the DNA synthesis of mitogen activated T lymphocytes. The exact mechanism of this antiproliferative effect of TPA is not known (Gescher, 1985; Dröge, 1986).

The presence of extracellular calcium is an important requirement for T lymphocyte activation (Alford, 1970; Imboden et al., 1985). In the past years it has been proved that, indeed, a rise in the intracellular calcium concentration ( $Ca_i$ ) is one of the earliest events of the activation process (Tsien et al., 1982; Hesketh et al., 1983; Imboden et al., 1985). Recently numerous reports have demonstrated that TPA is able to block the agonist-induced rise in  $Ca_i$  in various cell-types (Rickard and Sheterline, 1985; Poll and Westwick, 1986; Mendoza et

al., 1986 and references therein). Mastro and Smith (1983) have shown that the synergistic, co-mitogenic effect of TPA depends on the duration of TPA incubation and on the sequence of addition of TPA and the calcium ionophore, A23187.

In the light of these findings the possibility arises that the antiproliferative and "Ca-blocking" effect of TPA can be linked. However, in case of antigens or lectins several other changes also occur besides the rise in  $Ca_i$  (Imboden et al., 1985). Therefore the aim of this study was to investigate the effect of TPA in a "model-system", where *only* a rise in the intracellular calcium

Received May 20, 1987; accepted December 4, 1987.

Abbreviations used:  $Ca_i$ , intracellular calcium concentration;  $Ca_o$ , extracellular calcium concentration; DMSO, dimethyl sulfoxide; EGTA, ethylene-glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid; OAG, oleoylacetyl-glycerol; TPA, 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate; TPEN, N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylene-diamine.

\*To whom reprint requests/correspondence should be addressed.



concentration served as an initial signal for increased cell proliferation. In this way we have studied whether TPA can affect the Ca-ionophore-induced rise in  $Ca_i$ . In the present paper we report that TPA can greatly reduce the Ca-ionophore-induced rise in  $Ca_i$  of thymocytes. This effect is not due to the TPA-induced activation of Ca-extrusion processes or immobilization of Ca-ionophores. The counteraction of TPA can be explained mostly by an increased availability of intracellular heavy metal ions. These findings have been published earlier in a preliminary form (Csermely and Somogyi, 1986).

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

A23187, ionomycin, TPEN and fura-2 acetoxymethyl ester were from Calbiochem. Calmidazolium (R24571), dioctanoyl-glycerol, Hepes, oleoyl-acetyl-glycerol, quin2 acetoxymethyl ester and TPA were Sigma products. Triton X-100 was from Serva, dimethyl-sulfoxide from Fluka.  $^3H$ -quin2 acetoxymethyl ester (370 MBq/mmol) was an Amersham product.  $^{45}CaCl_2$  (4.3 GBq/mmol) was from the National Institute of Isotopes (Budapest, Hungary). Cell culture media and the supplements used were from Gibco. Diphenyl-oxazole and 1,4-di(2-(5-phenyl)-oxazolyl)benzene were from Koch-Light Laboratories (Colnbrook, Berks, England).  $CaCl_2$  and  $MgCl_2$  were Merck ultrapure products. All the other reagents used were of best analytical purity.

### Isolation of mouse thymocytes and TPA-incubation

Mouse (CLFP, 6–8 weeks old, male) thymocytes were prepared by the method of Kleiman et al. (1984). After isolation, cells were incubated with TPA (at concentrations and times indicated) or with the solvent dimethyl sulfoxide (DMSO) at a final concentration less than 0.2% (v/v). Cell density was  $5 \times 10^6$  cells/ml, the incubation was performed at 37°C in Eagle's minimal essential medium supplemented with 10 mM Hepes (pH 7.4), essential amino acids, streptomycin and penicillin 100 U/ml each. In the experiments viability was never below 95% as judged by trypan blue exclusion.

### Measurement of intracellular calcium concentration

Loading of quin2 and measurement of its fluorescence was carried out as described earlier (Csermely and Somogyi, 1987). Briefly, thymocytes were incubated with quin2 acetoxymethyl ester or with fura-2 acetoxymethyl ester at a final concentration of 20  $\mu M$  or 2  $\mu M$  respectively at 37°C. The medium of incubation contained 143 mM NaCl, 1 mM  $Na_2SO_4$ , 5 mM KCl, 1 mM  $NaH_2PO_4$ , 0.5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $CaCl_2$ , 5 mM glucose and 10 mM Hepes, pH 7.4 (standard medium). In the first 20 min of incubation, the cell density was  $5 \times 10^7$  cells/ml, then the cells were diluted to tenfold with standard medium and incubated further for 20 min. The amount of extracellular indicator was routinely checked by the method of Hesketh et al. (1983) and Pollock et al. (1986). The intracellular concentration of quin2 was determined using  $^3H$ -quin2 acetoxymethyl ester. The intracellular volume of mouse thymocytes was taken as 104 fl (Hesketh et al., 1983).

In case of TPA preincubation up to 90 min, cells were first loaded with quin2 then incubated with TPA. In case of incubations longer than 45 min the experiments were (also) done under conditions when TPA preincubation

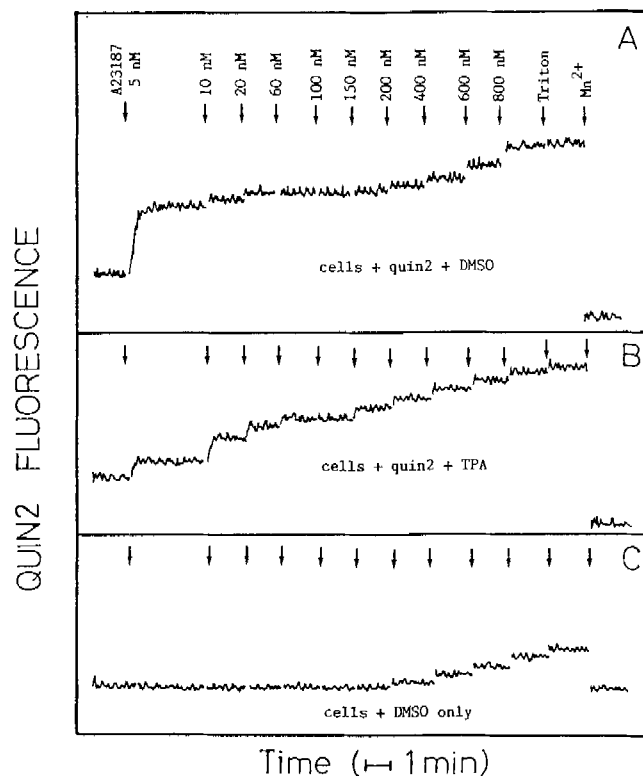


Fig. 1. The effect of TPA preincubation on the A23187-induced rise in  $Ca_i$  of mouse thymocytes. Mouse thymocytes were incubated with DMSO (panel A, C) or with TPA at a final concentration of 50 nM (panel B) for 90 min as described in Materials and Methods. In case of panels A and B quin2 loading and measurement of  $Ca_i$  was done as described in Materials and Methods. Panel C shows the autofluorescence of cells before and after the addition of A23187. At the arrows A23187 (in the final concentrations indicated), Triton X-100 (0.05% v/v) and  $MnCl_2$  (10  $\mu M$ ) were added. The fluorescence scales in panels A–C are identical. The traces shown are representatives of six separate experiments. The intracellular quin2 concentration was in the range of 0.8–1.2 mM.

included the quin2 loading procedure. (In this case TPA concentration was maintained at a constant throughout the incubation.) At time points where the two experimental protocols were overlapping (45, 60 and 90 min) there was no significant difference in the results (not shown).

Fluorescence measurements were performed in a Spectrofluor JY3 (Jobin Yvon, Longjumeau, France) spectrofluorimeter. The excitation/emission wavelength pair was 339/492 nm in case of quin2 measurements and 340/510 nm in case of fura-2 measurements, respectively (4 nm slits). The samples were measured in 1 cm square quartz cuvetts thermostatted to 37°C. The calibration of the fluorescence signal and the calculation of the intracellular calcium concentration was done as described earlier (Pollock et al., 1986, Csermely and Somogyi, 1987).

### $^{45}Ca$ uptake and efflux measurements

$^{45}Ca$  uptake was measured by incubation of mouse thymocytes in Eagle's minimum essential medium supplemented with 10 mM Hepes (pH 7.4), essential amino acids, streptomycin and penicillin 100 U/ml each and 40 kBq/ml ( $2\text{--}2.5 \times 10^6$  cpm/ml)  $^{45}CaCl_2$ . Incubation was

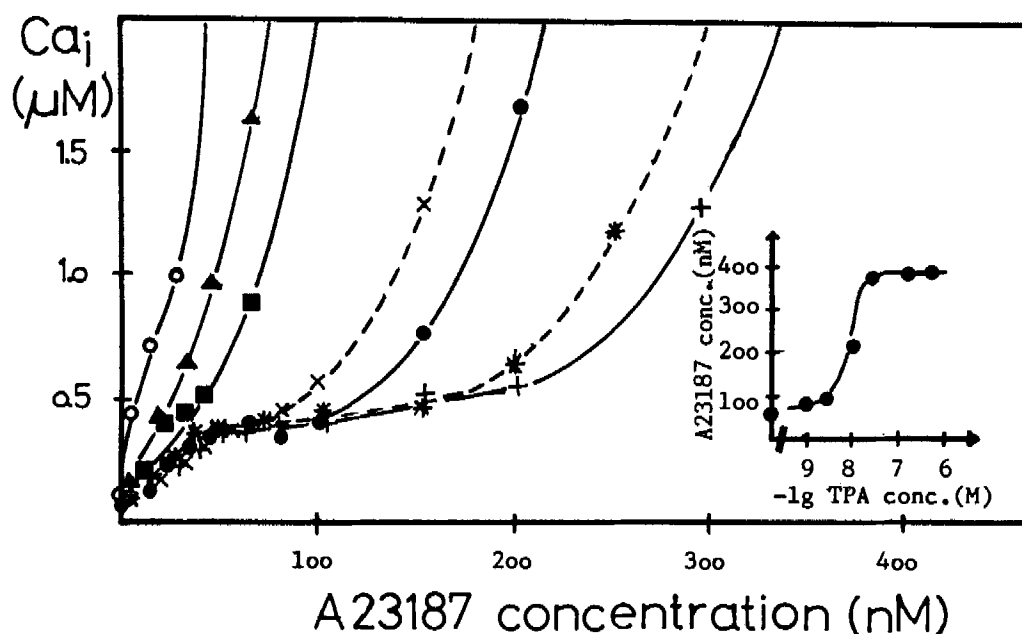


Fig. 2. The time and concentration dependence of the effect of TPA preincubation on the A23187-induced rise in  $Ca_i$ . Treatment of mouse thymocytes with TPA, measurement and calculation of  $Ca_i$  was done as described in Materials and Methods. The fluorescence signal of quin2 was followed for 5–10 min after each addition and the  $Ca_i$  was calculated from the final, steady-state value. Data points are values after serial additions of A23187. However remeasurement of some data points after prompt addition of A23187 in appropriate concentration

resulted in no significant differences in  $Ca_i$ . Samples were incubated with DMSO for 150 min ( $\circ-\circ$ ); or with TPA (at a final concentration of 20 nM) for 15 min ( $\blacktriangle-\blacktriangle$ ), 30 min ( $\blacksquare-\blacksquare$ ), 45 min ( $\bullet-\bullet$ ), 90 min ( $+ - +$ ), 120 min ( $* - *$ ) or 240 min ( $\times - \times$ ). The inset shows the TPA concentration dependence of A23187 concentrations necessary to reach calcium equilibration (incubation time: 90 min). Data are representative of three separate experiments. The intracellular quin2 concentration was in the range of 0.6–1.3 mM.

done in Eppendorf tubes at a cell density of  $5 \times 10^6$  cells/ml at  $37^\circ\text{C}$  for the times indicated. The final volume of the sample was 1 ml. After the incubation cells were centrifuged in a microfuge. After the removal of the supernatant the tips of the Eppendorf tubes were cut and placed into scintillation vials. Radioactivity was determined by liquid scintillation; the scintillation cocktail contained 5.9 g/l diphenyl-oxazole, 160 mg/l 1,4-di(2-(5-phenyl)-oxazolyl)benzene, 30% (v/v) Triton X-100 and 70% (v/v) toluene.

For  $^{45}\text{Ca}$  efflux measurements cells were loaded with  $^{45}\text{Ca}$  by incubation with 160 kBq/ml ( $10^7$  cpm/ml)  $^{45}\text{CaCl}_2$  for 30 min. Other conditions of incubation were the same as described for  $^{45}\text{Ca}$  uptake measurements. The excess of  $^{45}\text{Ca}$  was removed by centrifugation (400 g, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ) and cells were washed twice with the same volume of Eagle's medium. Cells were resuspended in the same medium (with no  $^{45}\text{Ca}$  added) at a cell density of  $5 \times 10^6$  cells/ml. At times indicated 0.5 ml aliquots of the cell suspension were withdrawn and centrifuged in a microfuge. Radioactivity of  $2 \times 0.2$  ml of the supernatant was determined.

#### Measurement of A23187 fluorescence and fluorescence polarisation

A23187 fluorescence was measured after Pfeiffer et al. (1974). The excitation-emission wavelength pair was 370 nm and 430 nm, respectively. Fluorescence polarisation measurements were made using polarization filters. (Oriental Co., Stamford, CT, USA) by the general procedure of Chen and Bowman (1965). For the calculation of the

emission anisotropy we used the formula of Jablonski  $r = (I_{vv} - G \times I_{vh}) / (I_{vv} + 2G \times I_{vh})$  where  $I_{vv}$  and  $I_{vh}$  is the fluorescence intensity at vertical-vertical or vertical-horizontal filter positions respectively. The grating factor ( $G$ , the ratio of the fluorescence intensities measured at horizontal-vertical and horizontal-horizontal filter positions) was 0.90 in our experiments.

#### Energy transfer measurements

Energy transfer measurements were done after Hyono et al. (1985). Excitation wavelength was 270 nm and the emission spectra were recorded after serial addition of A23187 at final concentrations indicated. Both the excitation and emission slits were 4 nm, cell density was set to  $2 \times 10^6$  cells/ml. Emission spectra were corrected to the fluorescence of A23187 observed at 270 nm excitation. A23187 fluorescence was measured in the presence of soybean lecithin liposomes mimicking the hydrophobic environment of plasma membranes. Liposomes were prepared by sonication using a Sonic 300 dismembrator (Artex Inc. Co., Farmingdale, NY, USA). The optimal density of liposomes (0.2–2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was set to get the same increase in A23187 fluorescence (measured at different A23187 concentrations) as by addition of mouse thymocytes at a cell density of  $2 \times 10^6$  cells/ml.

#### RESULTS

##### TPA can reduce the A23187-induced rise in the intracellular calcium concentration

In Figure 1 the effect of TPA preincubation on the A23187-induced rise in the intracellular calcium concen-



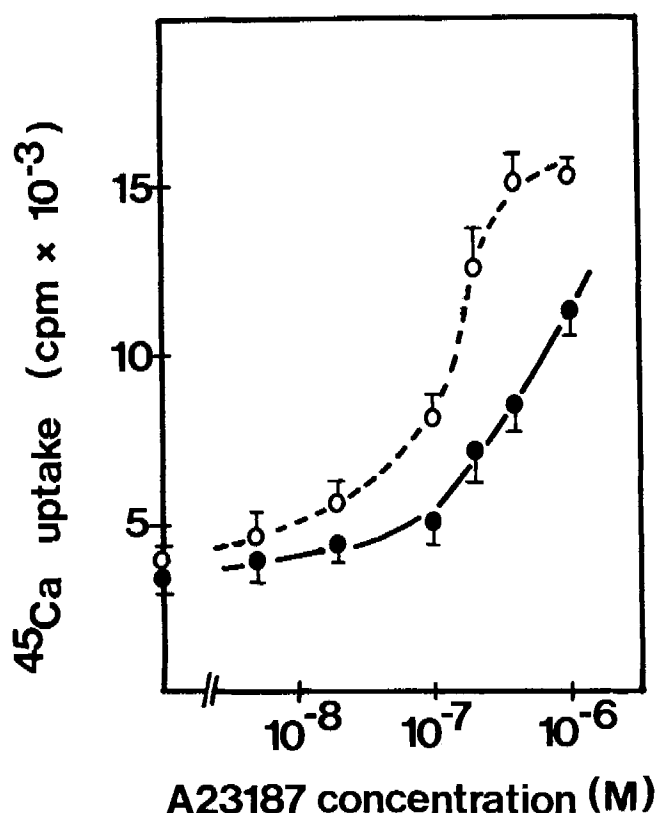


Fig. 3. The effect of TPA preincubation on the A23187-induced  $^{45}\text{Ca}$ -uptake. Mouse thymocytes were incubated with DMSO (open circles) or with TPA at a final concentration of 20 nM (closed circles) for 90 min.  $^{45}\text{Ca}$  uptake measurements were done as described in Materials and Methods. Preliminary experiments indicated maximal  $^{45}\text{Ca}$  uptake at 2 min of incubation in the presence of A23187 (not shown). Therefore this incubation time was chosen for  $^{45}\text{Ca}$  uptake measurements in the presence of Ca-ionophores. Data are means  $\pm$  SDS of three separate experiments done in triplicates.

tration (quin2 fluorescence) is shown. Control cells were incubated with the solvent of TPA, dimethyl sulfoxide (less than 0.2% v/v, panel A). Panel C shows the autofluorescence of cells before and after the addition of A23187. (The fluorescence of A23187 was identical if we measured it in TPA-preincubated cells, data not shown.) If panel A and C are compared it can be seen that after the addition of 20 nM of A23187 the increase in the fluorescence in panel A is due to the autofluorescence of A23187. The addition of Triton X-100 does not cause a further increase in quin2 fluorescence. Thus  $\text{Ca}_i$  is equilibrated with the extracellular calcium concentration ( $\text{Ca}_o$ ) at A23187 concentrations higher than 20 nM.

The preincubation of mouse thymocytes with TPA (50 nM, 90 min) markedly reduces the ionophoretic ability of A23187 (panel B). The minimal A23187 concentration sufficient to equilibrate  $\text{Ca}_i$  with  $\text{Ca}_o$  is increased to 200 nM which is tenfold of the control value.

In Figure 2 the time and concentration dependence of the TPA-induced attenuation of the Ca-ionophoretic ability of A23187 can be seen. As it has been already shown in Figure 1, in control cells ( $\text{O}-\text{O}$ )  $\text{Ca}_i$  is equilibrated with  $\text{Ca}_o$  ( $=1$  mM) at A23187 concentrations higher than 20 nM. After 9 min preincubation with TPA at a final concentration of 20 nM ( $+-+$ ) this equilibrating, "minimal effective concentration" of A23187 was in the range of 200–400 nM. This TPA-induced increase in the minimal effective concentration of A23187 is time dependent and transient: it can be hardly detected if the preincubation time is less than 30 min and it declines if mouse thymocytes are preincubated with TPA for more than 90–120 min.

Examining the concentration dependence of this TPA-induced increase in the minimal effective concentration of A23187 (inset in Figure 2) it can be seen that it is maximal at TPA concentrations higher than 20 nM where protein kinase C is fully activated (Castagna et al., 1982).

#### TPA reduces the ionophore-induced uptake of $^{45}\text{Ca}$

In Figure 3 the uptake of  $^{45}\text{Ca}$  can be seen as the function of A23187 concentration. If the cells were preincubated with TPA (20 nM, 90 min) the uptake of  $^{45}\text{Ca}$  is markedly decreased compared to the values measured in untreated cells. The data of Figure 3 give direct

TABLE 1.  $^{45}\text{Ca}$  uptake and efflux in control and TPA treated mouse thymocytes<sup>1</sup>

Incubation time uptake/efflux	$^{45}\text{Ca}$ uptake (cpm $\times 10^{-3}/5 \times 10^6$ cells)		$^{45}\text{Ca}$ efflux (cpm $\times 10^{-3}/5 \times 10^6$ cells)	
	Control cells	TPA treated cells	Control cells	TPA treated cells
5 min	4.0 $\pm$ 0.4	3.9 $\pm$ 0.3	n.d. <sup>2</sup>	n.d.
10 min	7.9 $\pm$ 0.8	6.0 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.4
+10 $\mu\text{M}$ calmidazolium	17.2 $\pm$ 1.4	18.0 $\pm$ 0.6	0.8 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.2
20 min	13.1 $\pm$ 1.0	10.2 $\pm$ 0.8	3.5 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.4
60 min	18.1 $\pm$ 2.0	15.3 $\pm$ 1.3	7.8 $\pm$ 0.8	7.0 $\pm$ 0.9
+10 $\mu\text{M}$ calmidazolium	n.d.	n.d.	2.5 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.4

<sup>1</sup>Isolation of cells, TPA preincubation (20 nM TPA, 90 min),  $^{45}\text{Ca}$  uptake and efflux measurements were done as described in Materials and Methods. The values of  $^{45}\text{Ca}$  efflux correspond to the radioactivity that appeared in the supernatant. Data are corrected to the value of "0 min incubation" and expressed as means  $\pm$  SDs of three separate experiments run in triplicates.

<sup>2</sup>n.d. = not determined.

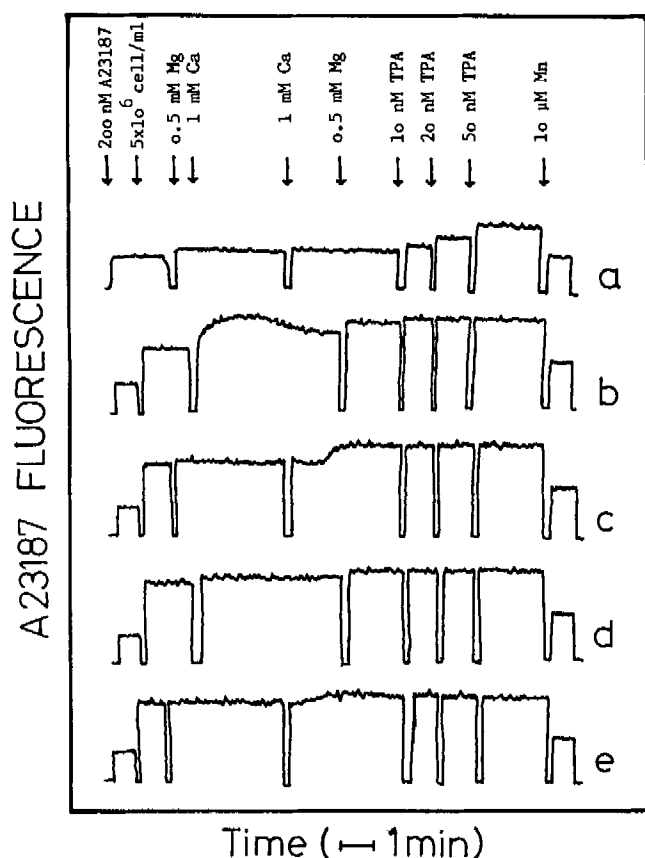


Fig. 4. The effect of TPA and TPA preincubation on the fluorescence of A23187 in mouse thymocytes. A23187 fluorescence was measured as described in Materials and Methods. Traces show the A23187 fluorescence in  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  free standard medium. Thymocytes were incubated with DMSO (traces b, c) or TPA (50 nM final concentration, 90 min; traces d, e) as described in Materials and Methods. After incubation cells were centrifuged at  $200\times g$  for 5 min and resuspended in  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  free standard medium at a cell density of  $5 \times 10^7$  cells/ml. The fluorescence scales of traces a-e are identical. Traces are representatives of five experiments.

evidence for the assumption that TPA changes not only the steady state value of  $\text{Ca}_i$  but it impairs the Ca-transporting ability of Ca-ionophores, too. TPA treatment cannot totally abolish the A23187-induced increase in the uptake of  $^{45}\text{Ca}$ . On the other hand, a significant inhibition can be observed in any concentra-

tion of A23187 tested. This shows that TPA diminishes the activity of some/all of the A23187 molecules.

#### TPA does not alter the uptake and efflux of $^{45}\text{Ca}$

The attenuation of the A23187-induced rise in the  $\text{Ca}_i$  after TPA treatment can also be explained (on the analogy of neutrophils, Rickard and Sheterline, 1985) by the activation of Ca-extrusion systems. Therefore we have investigated the effect of TPA on the  $^{45}\text{Ca}$  uptake and efflux in thymocytes (Table 1).

Our data show no significant differences between the  $^{45}\text{Ca}$  uptake and efflux of control and TPA treated cells. The changes are insignificant, even in the case when the plasma membrane calcium pump is blocked with the selective calmodulin-antagonist, calmidazolium (R24571). Thus neither the calmidazolium inhibited, nor the remaining Ca-extrusion systems are activated after TPA treatment.

#### Fluorescence properties of A23187 after TPA treatment

The TPA-induced impairment of the activity of Ca-ionophores can be a consequence of their immobilization in the plasma membrane after TPA treatment. This possibility can be examined most easily utilizing the fluorescent properties of A23187.

Figure 4 shows the fluorescence of A23187 in buffer, in control and TPA treated cells. In trace a A23187 is added to  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  free medium. Apolar environment is known to enhance the A23187 fluorescence to severalfold (Pfeiffer et al., 1974). This might be the reason why the addition of the hydrophobic TPA enhances the fluorescence intensity of A23187 in standard medium (Fig. 4, trace a). TPA has no autofluorescence under these conditions (not shown) thus in a polar solvent a direct interaction between TPA and A23187 may occur showing the mutual exclusion of TPA and A23187 from the structure of water. Manganese quenches the fluorescence of A23187 (traces a-e); this is in agreement with earlier data of Pfeiffer et al. (1974).

In Figure 4 traces b and c show the fluorescence of A23187 in control (DMSO incubated) mouse thymocytes. The increase in the fluorescence upon addition of the cells is due to the insertion of A23187 to the hydrophobic plasma membrane. Upon addition of  $\text{Ca}^{2+}$  either in absence (trace b) or in presence (trace c) of  $\text{Mg}^{2+}$  a transient increase of the A23187 fluorescence can be seen. Under these conditions there is no fluorescence change upon the addition of TPA.

Traces d and e were recorded in the presence of TPA preincubated (50 nM, 90 min) mouse thymocytes. The

TABLE 2. The emission anisotropy of A23187 fluorescence in standard medium, in control and TPA incubated mouse thymocytes<sup>1</sup>

A23187 concentration (nM)	Emission anisotropy		
	Standard medium	Cells + DMSO (90 min)	Cells + TPA (20 nM, 90 min)
50	0.141 ± 0.021	0.215 ± 0.018	0.204 ± 0.023
100	0.129 ± 0.020	0.208 ± 0.029	0.191 ± 0.020
200	0.118 ± 0.025	0.176 ± 0.016	0.164 ± 0.014
400	0.126 ± 0.017	0.169 ± 0.010	0.151 ± 0.009

<sup>1</sup>Cells were incubated with DMSO or TPA and the emission anisotropy was measured as described in Materials and Methods. Cell density of the samples was  $5 \times 10^6$  cells/ml. Data are means ± SD of five separate experiments.



increase in the A23187 fluorescence after addition of the TPA preincubated cells is not significantly different from the increase observed at the addition of control cells (compare traces *d* and *e* with traces *b* and *c*). Extending the investigations we could not find any difference between the A23187 fluorescence (from 20 nM to 800 nM) in control and TPA preincubated cells (data not shown). This indicates that there is no significant change in the "hydrophobicity" of the environment of A23187 during TPA incubation of mouse thymocytes.

TPA preincubation prevents, or greatly diminishes the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced transient rise in A23187 fluorescence (compare traces *d* and *e* with traces *b* and *c*). The prevention of the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced rise in A23187 fluorescence can also be achieved by the previous addition of 10  $\mu\text{M}$  calmidazolium (R24571), a known inhibitor of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -pump (not shown). This suggests that the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced transient increase in the A23187 fluorescence might be related to the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced activation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -pump. Therefore the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced transient increase in A23187 fluorescence might be regarded as an "active-state" of the Ca-ionophore, A23187. This "active-state" does not occur after TPA preincubation of mouse thymocytes, which can be regarded as an additional sign of the TPA-induced impairment of Ca-ionophoretic activity.

$\text{Mn}^{2+}$  quenches the A23187 fluorescence. Examining the concentration dependence of this quenching effect we have found that there is no difference between the "quenching activity" of  $\text{Mn}^{2+}$  in control and TPA-preincubated cells. Half-maximal quenching occurs in both cases at 0.3  $\mu\text{M}$   $\text{Mn}^{2+}$  concentration in the presence of 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (not shown). This means that the relative affinity constant of A23187 in T lymphocytes for  $\text{Mn}^{2+}$  versus  $\text{Ca}^{2+}$  remains approximately  $3 \times 10^3$  if cells are incubated with TPA. Thus TPA preincubation does not shift the preference of A23187 to heavy metal ions compared to  $\text{Ca}^{2+}$  in T lymphocytes.

Table 2 shows the emission anisotropy values of A23187 fluorescence. The emission anisotropy is a sensitive marker of the rotational mobility and so the possible immobilization of any fluorophore. The emission anisotropy of A23187 significantly increases upon addition of mouse thymocytes in any A23187 concentrations tested. This indicates a significant immobilization of A23187 upon insertion into the plasma membrane. However, there is no further increase in the emission anisotropy if the cells have been preincubated with TPA. On the contrary a slight ( $P < 0.2$  in case of 50–200 nM A23187,  $P < 0.025$  in case of 400 nM A23187) decrease in the emission anisotropy can be demonstrated. This might reflect an increased membrane fluidity after TPA preincubation. Thus the fluorescent properties of A23187 demonstrate that no major immobilization of A23187 occurs after TPA incubation of mouse thymocytes.

#### Energy transfer measurements indicate no immobilization of A23187

A23187 can be immobilized not only by a decrease in the overall membrane fluidity but by binding to certain proteins in the plasma membrane. This possibility may be examined using the phenomenon of the energy transfer. Energy transfer may occur between two fluorophores if the fluorescence emission spectrum of the first

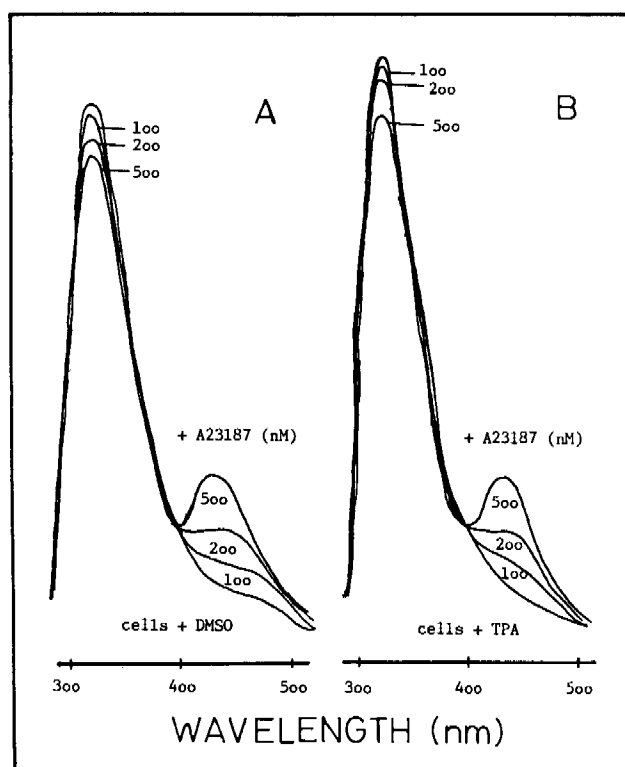


Fig. 5. Energy transfer between the Tyr, Try groups of membrane proteins and A23187 in mouse thymocytes. Mouse thymocytes were incubated with DMSO (panel A) TPA (20 nM final concentration, 90 min; panel B) as described in Materials and Methods. After incubation cells were resuspended in standard medium at a cell density of  $2 \times 10^6$  cells/ml. The Ca-ionophore, A23187 was added at final concentrations of 100, 200 and 500 nM as indicated. The energy transfer measurements were done as described in "Materials and Methods". Emission spectra were corrected to the fluorescence of A23187 and the spectra are representatives of five separate experiments. The fluorescence scales of panels A and B are identical.

(the donor) is overlapping with the fluorescence excitation spectrum of the other (the acceptor). At the emission maximum of the Tyr, Try fluorescence (330 nm) A23187 can be excited; its secondary emission occurs at 430 nm. The rate of this energy transfer strictly depends on the average distance between the two fluorophores (Tyr, Try and A23187); as the fluorophores are getting closer and closer the rate of energy transfer dramatically increases. Thus changes in the energy transfer indicate very sensitively the binding of A23187 to membrane proteins after TPA treatment.

In Figure 5, the energy transfer between the Tyr, Try groups of membrane proteins and A23187 is demonstrated. Since spectra of Figure 5 were carefully corrected for the autofluorescence of A23187 (see Materials and Methods) the secondary emission of A23187 indicates a real energy transfer in the system. This is supported by the fact that the overall decrease in the Tyr, Try emission intensity is roughly corresponding to the overall increase in the secondary emission of A23187 (Fig. 5). Thus the insignificant differences between the energy transfer occurring in control (panel A) and TPA

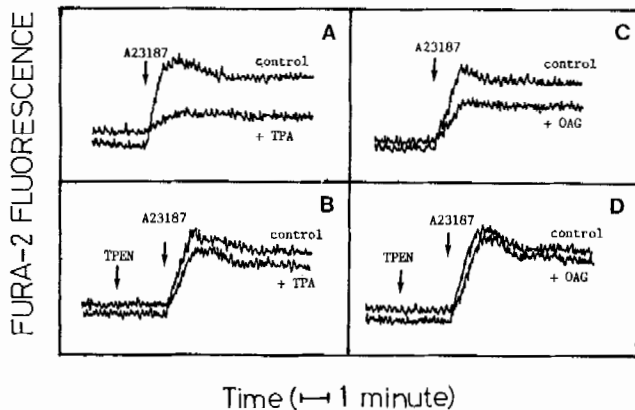


Fig. 6. Intracellular heavy metal chelator, TPEN restores the TPA-reduced ionophoretic ability of Ca-ionophores to the control level. Mouse thymocytes were incubated with DMSO (traces "control"), with TPA (20 nM final concentration, 90 min; traces "+TPA"), or with oleoyl-acetyl-glycerol (50  $\mu$ g/ml final concentration, 20 min; traces "+OAG"). The cells were loaded with fura-2 and  $Ca_i$  was measured as described in "Materials and Methods". Panels A and C show the Ca-ionophoretic effect of A23187 without, panels B and D with TPEN. At the arrows A23187 and TPEN were added as indicated at final concentrations of 20 nM and 50  $\mu$ M respectively. Traces are representatives of three separate experiments. The fluorescence scales of panels A-D are identical.

preincubated cells (panel B) indicate a roughly equivalent energy transfer, i.e., average distance between membrane proteins and A23187 in these cells.

#### Involvement of intracellular heavy metal ions in the effect of TPA and oleoyl-acetyl-glycerol (OAG)

Figure 6 demonstrates the involvement of intracellular heavy metal ions in the TPA-induced attenuation of the Ca-ionophoretic ability of A23187. In panel A the effect of 20 nM A23187 can be seen in control and TPA preincubated (20 nM, 90 min) mouse thymocytes. Panel C shows that preincubation with oleoyl-acetyl-glycerol (OAG) also diminishes the A23187-induced rise in  $Ca_i$ . In preliminary experiments the maximal effect of oleoyl-acetyl-glycerol was observed after 20 min preincubation (data not shown). However the effect of OAG is significantly smaller than the effect of TPA (compare panels A and C in Fig. 6). It seems plausible that OAG has been metabolised by the time its effect would be fully devel-

oped. (This requires 90 min preincubation in case of TPA.) In panels B and D the intracellular heavy metal chelator TPEN (reintroduced by Arslan et al., 1985) was added to the thymocytes preincubated with either TPA (panel B) or with OAG (panel D). In the presence of this chelator the efficiency of A23187 was restored to the control level. These results can be essentially reproduced using the ten-hundredfold more efficient Ca-ionophore, ionomycin (Csermely and Somogyi, 1987; not shown). We have gotten similar results using rabbit thymocytes instead of mouse thymocytes (not shown).

The data of Table 3 indicate that the intracellular heavy metal chelator, TPEN restores the ionophore-induced  $^{45}Ca$  uptake to the control level after TPA treatment. Oleoyl-acetyl-glycerol induces similar changes as TPA in the uptake of  $^{45}Ca$ , these effects can be antagonized by TPEN as well. These results give further evidence for the assumption that intracellular heavy metal ions play a role in the counteraction of TPA, diacylglycerols and Ca-ionophores.

#### DISCUSSION

Our initial question has been whether TPA can affect the Ca-ionophore-induced rise in the intracellular calcium concentration ( $Ca_i$ ). We have found that TPA is able to diminish greatly the Ca-ionophore-induced rise in  $Ca_i$  (Fig. 1). This observation is surprising since it cannot be explained by the common assumption that protein kinase C (the major phorbol ester receptor) phosphorylates and thus inactivates the putative receptor-linked Ca-channels, or enzymes (receptors) of the inositol trisphosphate pathway (Poll and Westwick, 1986; Mendoza et al., 1986).

On the basis of Figures 1 and 2 we cannot conclude that TPA preincubation impairs the  $Ca^{2+}$ -transporting ability of Ca-ionophores since the reduction of the fluorescence signal (apparent  $Ca_i$ ) can be the consequence of the quenching of quin2 induced by heavy metals (Hesketh et al., 1983). However, the same phenomenon can be observed using fura-2 (Fig. 6). Fura-2 is known to be much less sensitive to heavy metals than quin2 (Gryniewicz et al., 1985). Therefore the reproducibility of the data of quin2 measurements (Figs. 1 and 2) by fura-2 (Fig. 6) indicates that TPA treatment causes real changes in the Ca-ionophore-induced rise in  $Ca_i$ .

Data of Figures 1, 2 and 6 suggest that TPA treatment diminishes the  $Ca^{2+}$ -transporting ability of A23187. However to prove this hypothesis direct measurements of the  $Ca^{2+}$ -fluxes are necessary. Figure 3 gives a direct

TABLE 3. The effect of the heavy metal chelator, TPEN on the uptake of  $^{45}Ca$ <sup>1</sup>

A23187 concentration (nM)	Control thymocytes	$^{45}Ca$ uptake (cpm $\times 10^{-3}$ )			
		+ TPA	+ TPA, TPEN	+ OAG	OAG, + TPEN
0	3.7 $\pm$ 0.3	3.5 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.3	3.6 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 0.4
100	11.6 $\pm$ 0.8	7.4 $\pm$ 0.7	11.1 $\pm$ 0.9	8.1 $\pm$ 0.9	10.7 $\pm$ 1.3
200	14.9 $\pm$ 1.3	8.1 $\pm$ 1.0	13.9 $\pm$ 1.5	10.2 $\pm$ 1.2	13.1 $\pm$ 1.1

<sup>1</sup> Isolation of mouse thymocytes, preincubation and  $^{45}Ca$  uptake measurements were done as described in Materials and Methods. Cells were preincubated with DMSO (control cells), with TPA at a final concentration of 20 nM for 90 min, with OAG at a final concentration of 50  $\mu$ g/ml for 20 min or with TPEN at a final concentration of 100  $\mu$ M for 90 or 20 min respectively as indicated. The uptake of  $^{45}Ca$  was terminated after 2 min (see legend of Fig. 6). Data are means  $\pm$  SDs of three separate experiments run in triplicates.



evidence that TPA indeed impairs the  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting ability of Ca-ionophores since a marked decrease in the uptake of  $^{45}\text{Ca}$  can be demonstrated after TPA treatment at various A23187 concentrations.

Thinking about the possible explanations of the phenomenon observed at least five different reasons can be suspected: (1) the  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion systems are activated and so the increased  $\text{Ca}^{2+}$ -efflux is also responsible for the impaired ability of Ca-ionophores to raise  $\text{Ca}_i$ ; (2) TPA directly interacts with the Ca-ionophores and thus blocks their action; (3) the membrane fluidity is drastically reduced upon TPA treatment, Ca-ionophores become "frozen" in the membrane; (4) the Ca-ionophores are immobilized by binding to certain membrane proteins and finally (5) the availability of intracellular heavy metal ions increases and the excess of heavy metals is able to block the Ca-ionophores.

Tsien et al. (1982) have reported a TPA-induced decrease of quin2 fluorescence in mouse and pig lymphocytes. The TPA-induced decrease in quin2 fluorescence has been regarded as a sign showing the TPA-induced activation of Ca-extrusion systems by several authors (see e.g., Rickard and Sheterline, 1985). Some reports have directly shown a TPA-induced increase in the Ca-efflux in neutrophils (Rickard and Sheterline, 1985 and references therein). However, this observation can not be generalized since in astrocytoma cells (Orellana et al., 1985) and in two secretory cell lines (PC 12 and RINm5F, Di Virgilio et al., 1986) TPA does not effect the efflux rate of  $^{45}\text{Ca}$ .

The results of Table 1 show that in mouse thymocytes there is no significant difference between the  $^{45}\text{Ca}$  uptake and efflux in control and TPA treated cells. These data are in agreement with the results of Grubbs and Maguire (1986) who report also an unchanged  $^{45}\text{Ca}$  uptake and efflux after TPA treatment of S49 lymphoma cells. The effect of TPA is also insignificant if we compare the calmidazolium-induced increases in  $^{45}\text{Ca}$  uptake or calmidazolium-induced decreases in  $^{45}\text{Ca}$  efflux (Table 1). TPA does not activate the calmidazolium-dependent or calmidazolium-independent Ca efflux, this makes explanation 1 ("TPA activates the Ca-extrusion systems") unlikely and so TPA prevents the rise in  $\text{Ca}_i$  solely by the attenuation of  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake in T lymphocytes.

TPA is able to block the effect of 5–10-times higher A23187 concentrations the effect is time dependent, being maximal after 90 min of preincubation (Fig. 2). TPA changes the fluorescence of A23187 in aqueous solutions while it fails to do so in mouse thymocytes (Fig. 4). These observations make explanation 2 (i.e., "TPA directly interacts with the Ca-ionophores") unlikely, because no direct interaction between TPA and A23187 can be demonstrated.

There are conflicting data about the effect of TPA on the membrane fluidity. Stocker et al. (1982) report a TPA-induced decrease in the membrane fluidity in polymorphonuclear leukocytes while in rat embryo cells (Fischer et al., 1974) and in artificial membranes (Deelers et al., 1981) a TPA-induced increase in the membrane fluidity has been observed. A recent report (Goppelt-Strübe and Resch, 1987) demonstrates that the fluorescence polarisation value of a certain fluorescent probe is greatly different in isolated plasma membranes

from that measured in whole cells. In this way the differences of the literary data may arise from the uneven distribution of the hydrophobic fluorescent probe in the different membranes of whole cell systems.

Our results show that if we use the Ca-ionophore (A23187) itself as a "fluorescent probe" its fluorescence polarisation remains essentially unchanged (or slightly decreased) upon TPA treatment (Table 2). This finding shows a slightly increased rotational mobility of the Ca-ionophore. Figure 5 shows an unchanged average distance between A23187 and membrane proteins upon TPA incubation. These observations render explanations 3 and 4 (i.e., "Ca-ionophores are 'frozen' in the plasma membrane or bound to membrane proteins") unlikely.

In Figure 6 and Table 3 it is shown that the intracellular heavy metal chelator TPEN (reintroduced by Arslan et al., 1985) can restore the ionophoretic ability of A23187 to the original level which is observed without TPA or OAG treatment. This suggests that TPA or OAG can increase the availability of intracellular heavy metal ions and so the "excess" of heavy metals could block a part of the Ca-ionophores.

Heavy metals ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , etc.) have 100–1,000 times higher affinities for A23187 than  $\text{Ca}^{2+}$  (Pfeiffer and Lardy, 1976).  $\text{Mn}^{2+}$  ions block the A23187-induced influx of  $\text{Ca}^{2+}$  in lymphocytes (Resch et al., 1978). In the presence of extracellular  $\text{Mn}^{2+}$  ions A23187 raises  $\text{Ca}_i$  only at much higher concentrations than in the absence of  $\text{Mn}^{2+}$  (P. Csermely and J. Somogyi unpublished observations). Thus heavy metal ions are able to impair the  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting properties of Ca-ionophores.

What is the heavy metal responsible for the effects observed? We have demonstrated earlier that the most abundant cytosolic heavy metals are (in the order of decreasing concentrations) Zn, Fe and Cu (Csermely et al., 1987b). Since the fluorescence of A23187 is unchanged upon TPA treatment (Fig. 4) and of these heavy metals only Zn does not quench the fluorescence of A23187 (Pfeiffer et al., 1974; and data not shown) Zn is the most likely candidate as a TPA-induced Ca-blocker.

Our present results are in good agreement with our findings that TPA induces a heavy metal (mainly Zn) translocation from the nucleus and mitochondria to the cytosol and microsomes of thymocytes measured by X-ray fluorescence (Csermely et al., 1987a) and plasma emission spectroscopy (Csermely et al., 1987b). Our results are supported by the earlier observations (Arslan et al., 1985 and references therein) that the  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting ability of A23187 is impaired in ascites tumour cells which have an extraordinarily high availability of heavy metal ions in their cytosol (Arslan et al., 1985).

Our data show that not only TPA, but diacyl-glycerols can also attenuate the  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting ability of Ca-ionophores (Fig. 6 and Table 3). Since TPEN can restore the original efficiency of Ca-ionophores after diacyl-glycerol treatment (Table 3) it seems plausible that diacyl-glycerols induce similar changes in the subcellular distribution of heavy metals like TPA. However to prove this hypothesis direct measurements are necessary which are in progress in our laboratory.

On the basis of our results presented it seems obvious, that TPA and diacyl-glycerols increase the availability (relative amount) of heavy metals in the cytosol and

these heavy metals are able to block Ca-ionophores. These findings have a number of *consequences*: (1) TPA-induced heavy metals may be partly responsible for the TPA-induced block of changes in intracellular calcium concentration; (2) Heavy metals exhibit a higher affinity for a number of calcium binding sites (see e.g., Haberman and Richardt, 1986). Therefore an excess of heavy metal ions can occupy some of the calcium binding sites of different proteins (enzymes, receptors, channels, etc.) influencing their functions; (3) The primary structure of several receptor proteins, e.g., that of cortisol, oestradiol, thyrotropic hormone (Weinberger et al., 1986) or protein kinase C itself (Parker et al., 1986) show the existence of putative Zn-binding sites. The increased availability of heavy metals (mainly Zn) in the cytosol might change the behaviour of these proteins; (4) Our analytical studies (Csermely et al., 1987a,b) have revealed that the *source* of heavy metals appearing in the cytosol (and microsomes) is not extracellular but a decrease in the heavy metal (mainly Zn) content of the nucleus and mitochondria accompanies the TPA-induced increase of heavy metals in the cytosol. Zinc seems to be essential for the function of several proteins, e.g., enzymes involved in RNA and DNA synthesis (Bertini et al., 1986). Therefore the TPA-induced depletion of zinc in the nucleus might be related to the antiproliferative activity of TPA, the arrest of  $G_1 \rightarrow S$  phase transition (Gescher, 1985; Dröge, 1986). In this way the TPA-induced changes in the availability and distribution of heavy metals observed might show a new way of action of TPA. The fact that diacyl-glycerols have very similar effects like TPA probably reflects the physiological significance of this phenomenon.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to Prof. Anthony N. Martonosi (State University of New York, Syracuse, USA) for his advice and support and to Prof. Györgyi Rontó (Institute of Biophysics, Semmelweis University School of Medicine, Budapest, Hungary) for the use of the Jobin Yvon fluorometric facility.

### LITERATURE CITED

- Alford, R.H. (1970) Metal cation requirements for phytohemagglutinin-induced transformation of human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.*, **104**:698-703.
- Arslan, P., Di Virgilio, F., Beltrame, M., Tsien, R.Y., and Pozzan, T. (1985) Cytosolic  $Ca^{2+}$  homeostasis in Erlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free  $Ca^{2+}$ . *J. Biol. Chem.*, **260**:2719-2727.
- Bertini, I., Luchinat, C., Maret, W., and Zeppezauer, M. (Eds., 1986) Zinc enzymes. In: *Progress in Inorganic Biochemistry*, vol. 1, Birkhäuser, Boston.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., and Nishizuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, **257**:7847-7851.
- Chen, R.F., and Bowman, R.L. (1965) Fluorescence polarisation: measurement with ultraviolet-polarizing filters in a spectrofluorimeter. *Science*, **147**:729-732.
- Csermely, P., and Somogyi, J. (1986) Calcium permeability of the T lymphocyte plasma membrane: counteraction of phorbol ester and A23187. *Proc. of the 2nd European Congress on Cell Biology*, In: *Acta Biol. Hung.*, **37**:s208.
- Csermely, P., and Somogyi, J. (1987) The possible pitfalls of the measurement of intracellular calcium concentration of T lymphocytes with the fluorescent indicator quin2. *Immunobiology*, **174**:380-394.
- Csermely, P., Gueth, S., and Somogyi, J. (1987a) The tumor promoter tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA) elicits the redistribution of zinc in subcellular fractions of rabbit thymocytes measured by X-ray fluorescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**:863-868.
- Csermely, P., Fodor, P., and Somogyi, J. (1987b) The tumor promoter tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA) elicits the redistribution of heavy metals in subcellular fractions of rabbit thymocytes as measured by plasma emission spectroscopy. *Carcinogenesis*, **8**:1663-1666.
- Deelers, M., Defrise-Quertain, F., Ruyschaert, J.M., and Malaisse, W.J. (1981) Interaction of phorbol esters with lipid bilayers: thermotropic changes in fluorescence polarisation, phase transition and calcium ionophoresis. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **34**:423-439.
- DiVirgilio, F., Pozzan, T., Wollheim, C.B., Vincentini, L.M., and Meldolesi, J. (1986) Tumor promoter phorbol myristate acetate inhibits  $Ca^{2+}$  influx through voltage gated  $Ca^{2+}$  channels in two secretory cell lines PC12 and RINm5F. *J. Biol. Chem.*, **261**:32-35.
- Dröge, W. (1986) Protein kinase C in T-cell regulation. *Immunol. Today*, **7**:340-343.
- Fischer, P.B., Flamm, M., Schuchter, D., and Weinstein, L.B. (1974) Tumor promoters induce membrane changes detected by fluorescence polarisation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**:1063-1068.
- Gelfand, E.W., Cheung, R.K., Mills, G.B., and Grinstein, S. (1985) Mitogens trigger a calcium-independent signal for proliferation in phorbol-ester-treated lymphocytes. *Nature*, **315**:419-420.
- Gescher, A. (1985) Antiproliferative properties of phorbol ester tumor promoters. *Biochem. Pharmacol.*, **34**:2587-2592.
- Goppelt-Strübe, M. and Resch, K. (1987) Pitfalls in measuring fluorescence polarization in mitogen-stimulated T lymphocytes. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **368**:409-412.
- Grubbs, R.D. and Maguire, M.E. (1986) Regulation of magnesium but not calcium transport by phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, **261**:12550-12554.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**:3440-3450.
- Haberman, E., and Richardt, G. (1986) Intracellular calcium binding proteins as targets for heavy metal ions. *Trends in Pharmacol. Sci.*, **7**:298-230.
- Hesketh, T.R., Smith, G.A., Moore, J.P., Taylor, M.V. and Metcalfe, J.C. (1983) Free cytoplasmic calcium concentration and the mitogenic stimulation of lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, **258**:4876-4882.
- Hyono, A., Kuriyama, S., and Masui, M. (1985) Fluorescence energy transfer between ionophore, A23187 and membrane proteins isolated from outer and cytoplasmic membranes of a Gram-negative bacterium. *Biochim. Biophys. Acta*, **813**:111-116.
- Imboden, J.B., Weiss, A., and Stobo, J.D. (1985) Transmembrane signalling by the T3-antigen receptor complex. *Immunol. Today*, **6**:328-331.
- Kleiman, N.J., Friedman, D.L., and Di Sabato, G. (1984) Preparation of single-cell suspensions from lymphoid organs. *Methods Enzymol.*, **108**:43-49.
- Mastro, A.M., and Mueller, G.C. (1974) Synergistic action of phorbol esters in mitogen activated bovine lymphocytes. *Exp. Cell Res.*, **88**:40-46.
- Mastro, A.M., and Smith, M.C. (1983) Calcium dependent activation of lymphocytes by ionophore A23187 and a phorbol ester tumor promoter. *J. Cell. Physiol.*, **116**:51-56.
- Mendoza, S.A., Lopez Rivas, A., Sinnott-Smith, J.W. and Rozengurt, E. (1986) Phorbol esters and diacylglycerol inhibit vasopressin-induced increases in cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  and  $^{45}Ca^{2+}$  efflux in Swiss 3T3 cells. *Exp. Cell Res.*, **164**:536-545.
- Orellana, S., Solski, P.A., and Brown, J.H. (1985) Phorbol ester inhibits phosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization in cultured astrocytoma cells. *J. Biol. Chem.*, **260**:2719-2727.
- Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D. and Ullrich, A. (1986) The complete primary structure of protein kinase C — the major phorbol ester receptor. *Science*, **233**:853-859.
- Pfeiffer, D.R., and Lardy, H.A. (1976) The effect of  $H^+$  concentration on complex formation with divalent and monovalent cations and the demonstration of  $K^+$  transport in mitochondria mediated by A23187. *Biochemistry*, **15**:935-943.
- Pfeiffer, D.R., Reed, P.W., and Lardy, H.A. (1974) Ultraviolet and fluorescent spectral properties of the divalent cation ionophore A23187 and its metal ion complexes. *Biochemistry*, **13**:4007-4014.
- Poll, Ch., and Westwick, J. (1986) Phorbol esters modulate thrombin-operated calcium mobilization and dense granule release in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, **886**:434-440.



- Pollock, K., Rink, T.J. and Irvine, R.F. (1986) Liberation of (<sup>3</sup>H)arachidonic acid and changes in cytosolic free calcium in fura-2 loaded human platelets stimulated by ionomycin and collagen. *Biochem. J.* **235**:869-877.
- Resch, K., Bouillon, D. and Gerns, D. (1978) Activation of lymphocytes by the ionophore A23187. *J. Immunol.*, **120**:1514-1520.
- Rickard, J.E., and Shetlerline, P. (1985) Evidence that phorbol ester interferes with stimulated Ca<sup>2+</sup> redistribution by activating Ca<sup>2+</sup> efflux in neutrophil leucocytes. *Biochem. J.*, **231**:623-628.
- Stocker, R., Winterhalter, K.H., and Richter, Ch. (1982) Increased fluorescence polarisation of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene in the phorbol myristate acetate-stimulated plasma membrane of human neutrophils. *FEBS Letters*, **144**:199-203.
- Tsien, R.Y., Pozzan, T., and Rink, T.J. (1982) T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> and membrane potential in lymphocytes. *Nature*, **295**:68-71.
- Wang, J.L., McClain, D.A., and Edelman, G.M. (1975) Modulation of lymphocyte mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**:1917-1921.
- Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J., and Evans, R.M. (1986) The c-erb-a gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, **324**:640-646.
- Whitefield, J.F., MacManus, J.P., and Gillan, D.J. (1973) Calcium dependent stimulation by a phorbol ester (PMA): thymic lymphoblast DNA synthesis and proliferation. *J. Cell. Physiol.*, **82**:151-156.

# The tumor promoter tetradecanoylphorbol-13-acetate elicits the redistribution of heavy metals in subcellular fractions of rabbit thymocytes as measured by plasma emission spectroscopy

Péter Csermely, Péter Fodor<sup>1</sup> and János Somogyi

Institute of Biochemistry I., Semmelweis University School of Medicine, POB 260, Budapest, H-1444 Hungary and <sup>1</sup>Department of Chemistry, University of Agriculture, Budapest, Hungary

**Prolonged (90 min) incubation with the tumor promoter 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) causes no significant changes in the elemental composition of whole rabbit thymocytes (25 elements included). The only exception is the amount of magnesium, where a significant increase can be detected. However TPA preincubation elicits the redistribution of heavy metals (mainly Zn and to a much lesser extent Fe and Cu) from the nuclear and large granular (mitochondrial–lysosomal) fraction to the cytosol and microsomes. A significant translocation of calcium and phosphorus from the large granular fraction mainly to the nucleus can also be observed. The TPA-induced heavy metal depletion of the nucleus might play a role in the antiproliferative activity of TPA, the arrest of G<sub>1</sub>–S phase transition. On the other hand the increased amount of heavy metals in the cytosol might be linked to the TPA-induced block of intercellular communication and the desensitization of TPA-treated cells towards extracellular calcium which are well-known properties of neoplastic cells.**

## Introduction

12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA<sup>\*</sup>) is a very potent, well-known tumor promoter (1–3). Since the discovery reported by Castagna *et al.* (4) that active phorbol esters can directly activate protein kinase C, TPA is considered to exert its effects via protein kinase C-induced protein phosphorylations. However, the mechanism of the action of TPA is far from being fully elucidated.

The block of intercellular communication and the desensitization towards changes in the extracellular calcium concentration are well-known properties of tumor cell growth (1–3). TPA elicits such effects in several cell types tested (5,6). On the other hand, TPA is reported to block agonist-induced Ca-fluxes via the phosphorylation of Ca-channels or the receptor–N protein–phospholipase C system (7,8). The TPA-induced block of intercellular communication and the desensitization towards changes in calcium concentration of the medium might be linked to the ability of TPA to block calcium signals and/or Ca-fluxes.

In previous work we have investigated the effect of TPA on the Ca-ionophore-induced rise in intracellular calcium concentration (9). It was found that prolonged incubation with TPA sharply decreases the ionophoretic activity of Ca-ionophores. The optimal conditions of this TPA-induced desensitization needed a 90 min preincubation with TPA concentrations higher than 10 nM. This finding was surprising since it can not be explained by assuming TPA-induced protein phosphorylation. Looking

for possible explanations, mechanisms of the phenomenon we have observed that the intracellular heavy metal chelator, TPEN restores the ionophoretic activity of Ca-ionophores after TPA treatment. This observation led to the hypothesis that TPA may cause changes in the heavy metal content of different subcellular fractions. To test this hypothesis and to examine which heavy metal ion(s) are responsible for the diminution of the effect of Ca-ionophores in this work the changes in heavy metal content of subcellular fractions upon previously optimized (90 min, 20 nM) TPA treatment were investigated by plasma emission spectroscopy.

## Materials and methods

### Materials

TPA and Hepes were from Sigma. Dimethyl-sulfoxide was obtained from Fluka. Cell culture medium ingredients were Gibco products. HNO<sub>3</sub> was a Carlo-Elba ultrapure product. All other chemicals used were of best analytical purity.

### Isolation and TPA treatment of cells

Rabbit thymocytes were isolated by the method of Kleiman *et al.* (10). Cells were incubated with 20 nM of TPA or with the solvent, dimethyl-sulfoxide at a final concentration of 0.05% (v/v; control cells) at 37°C for 90 min at a cell density of 10<sup>7</sup> cells/ml in Eagle's minimum essential medium supplemented with 10 mM Hepes (pH 7.4), essential amino acids, streptomycin and penicillin (100–100 U/ml). Viability of the cells was never <95% as judged by trypan blue exclusion.

### Isolation of subcellular fractions

After incubation cells were centrifuged and resuspended in the isolation buffer containing 140 mM KCl, 0.25 mM MgCl<sub>2</sub> and 20 mM Hepes pH 7.0 at a cell density of 5 × 10<sup>8</sup> cells/ml in a final volume of 10 ml. Isolation of four subcellular fraction (nuclear pellet, large granules, microsomes and cytosol) of rabbit thymocytes disrupted by nitrogen cavitation was performed as described earlier (11–13). Considering the lipid composition of different subcellular fractions and the distribution of various marker enzyme activities (11,13) we can say that in our preparations the nuclear pellet contains only trace amounts of large granules and microsomes (derived from a minor population of partially disrupted cells), in the large granular fraction there is a very small amount of aggregated microsomes and the microsomal and cytosolic fractions contain no cross-contaminations. After centrifugation the nuclear pellet was suspended in 5 ml, the large granular and the microsomal fractions each in 1 ml of isolation buffer.

### Plasma emission spectroscopy measurements

Whole cell suspensions and the subcellular fractions were lyophilized and digested with 2 ml of concentrated HNO<sub>3</sub> at 120°C for 2 h in quartz tubes. The digested samples were diluted with distilled water to 5 ml and their elemental composition was determined using an ICAP-9000 simultaneous ICP spectrometer (Fischer Scientific Co.). Data have been corrected for the amount of different elements in appropriate 'blank' samples. (The appropriate amount of isolation buffer plus HNO<sub>3</sub> in case of whole cells, nuclear pellet, large granules and microsomes; and the isolation buffer carried through all the steps of isolation in case of cytosol.) The correction was never >10% of the total amount of the actual element with three exceptions. In the case of Fe the correction was approximately 50% of the total Fe content of the samples because of the relatively high Fe content of HNO<sub>3</sub>. In the case of Ca and Mg content the correction was 10–20% and 40–80% of the total value respectively because of the Ca-impurities and the Mg content of the isolation buffer.

## Results

Examining the elemental composition of rabbit thymocytes and their subcellular fractions we could not detect any significant amount of As, Co, Ga, Hg, Li and Se. Al, B, Ba, Cd, Cr, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Ti and V were present in trace amounts in our samples and TPA did not cause significant (*P* > 0.05; Student's

\*Abbreviations: TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate; TPEN, *N,N,N',N'*-tetakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine.



**Table I.** The amount and distribution of different elements in control and TPA-treated rabbit thymocytes

Element	Elemental composition (nmol/5 × 10 <sup>9</sup> cells) <sup>a</sup>										Recovery (%) <sup>b</sup>	
	Whole cell		Nuclear fraction		Large granules		Microsomes		Cytosol		Control	+ TPA
	Control	+ TPA	Control	+ TPA	Control	+ TPA	Control	+ TPA	Control	+ TPA		
Ca	2010 (180)	2000 (190)	238 (20)	457 <sup>c</sup> (53)	451 (58)	198 <sup>c</sup> (19)	81 (10)	79 (13)	1020 (70)	1056 (59)	89	90
Cu	177 (12)	177 (12)	65 (6)	59 (4)	20 (2)	13 <sup>c</sup> (1)	18 (1)	13 (0.6)	54 (3)	70 <sup>c</sup> (3)	89	88
Fe	165 (51)	138 (59)	99 (4)	81 <sup>d</sup> (4)	15 (1)	12 (1)	1.3 (0.4)	3.6 <sup>c</sup> (0.6)	25 (6)	19 (1)	85	84
Mg	2100 (40)	2230 <sup>d</sup> (70)	483 (24)	481 (22)	175 (18)	140 (15)	96 (4)	171 <sup>c</sup> (3)	1080 (60)	1170 (70)	87	88
P	40 000 (900)	39 300 (1000)	22 600 (500)	23 800 <sup>d</sup> (500)	6300 (160)	3660 (190)	2200 (50)	3200 <sup>c</sup> (60)	7190 (140)	7220 (120)	96	96
Zn	1060 (60)	1000 (100)	700 (42)	469 <sup>c</sup> (36)	64 (3)	31 (1)	20 (2)	35 <sup>c</sup> (2)	153 (7)	395 <sup>c</sup> (10)	88	93

<sup>a</sup>Preparation of the samples and measurement of their elemental composition was done as described in Materials and methods. Data are means and (in parentheses) + S.D.s of five separate experiments.

<sup>b</sup>Percent of recovery was calculated summarizing the amount of different elements in the four subcellular fractions (columns 2–5) and expressed as a percentage of the total amount of the same element in whole cells (column 1).

<sup>c-d</sup>Significant difference between control and TPA treated sample; level of significance; <sup>c</sup>*P* > 0.001, <sup>d</sup>*P* > 0.01.

*t* test) changes in the amount of elements listed. K and Na were present in great amounts, however, their total concentration and subcellular distribution did not change significantly upon TPA incubation (20 nM, 90 min, 37°C) (data not shown).

Table I shows the amount of Ca, Cu, Fe, Mg, P and Zn (expressed as nmol/5 × 10<sup>9</sup> cells) in whole cells and subcellular fractions of rabbit thymocytes. From the data showing the amount of different elements in control and TPA-treated whole cells (Table I, first column) it can be seen that there is no significant change in the concentration of Ca, Cu, Fe and Zn upon TPA incubation. (This result is not obvious since the cell culture medium contained substantial amounts even from Cu, Fe and Zn corresponding to 12, 148 and 220 nmol metals respectively in medium containing 5 × 10<sup>9</sup> cells; not shown. Thus in our conditions not only an efflux but an uptake of different elements would also have been possible.)

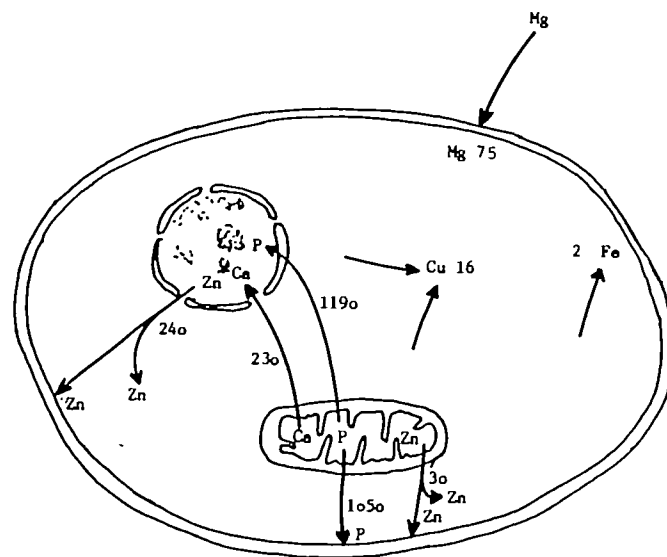
Mg is the only element of which total concentration is increased during TPA incubation. The increased amount of Mg can be found mainly in the microsomal fraction. Furthermore, from the data of Table I it can be seen that there is a significant difference between the Ca-content of nuclear and large granular (mitochondrial-lysosomal) fractions of control and TPA-treated cells. The distribution of phosphorus shows similar changes with the addition that phosphorus content of microsomes has been also increased during TPA incubation.

The distribution of heavy metals (Cu, Fe and Zn) changes similarly after TPA treatment: a translocation from the nuclear and large granular fractions to microsomes and cytosol can be observed. The changes are less dramatic (though significant) in case of Cu and Fe and mostly expressed in case of Zn.

From the last column of Table I it can be seen that the recovery (i.e. the summarized amount of a given element in subcellular fractions expressed as the percentage of the total amount of the same element in whole cells) is all the time >80% and the difference between the recovery of TPA treated and corresponding control samples never exceeds 5%. Therefore the changes observed can not be attributed to the loss of the appropriate element.

## Discussion

Our results, indicating that during TPA incubation a substantial Mg uptake occurs, are in good agreement with the results of



**Fig. 1.** Translocation of different elements after prolonged TPA incubation of rabbit thymocytes. The numbers were calculated from the data of Table I denoting the amounts of elements translocated in nmol/5 × 10<sup>9</sup> cells. For the sake of clarity in the figure the elemental content of the large granular fraction and microsomes is attributed solely to the mitochondria and plasma membrane respectively, the lysosomes and endoplasmic reticulum are not indicated.

Grubbs and Maguire (14). They have observed that TPA induces a significant Mg uptake in S49 lymphoma cells while the Ca-fluxes remained essentially unchanged upon TPA treatment.

The increase in phosphorus content of nucleus and microsomes might reflect (among others) the increased phosphorylation of the proteins in these subcellular compartments. The fact that the calcium content of microsomes is not affected during TPA incubation is consistent with the results of Cox and Carroll (15) who showed that TPA has no effect on the Ca-induced fluorescence of chlorotetracycline, i.e. the amount of mainly plasma membrane-bound calcium. The total calcium content of the cells is in good agreement with the value reported by Waller *et al.* (16).

In Figure 1 the data of Table I are rationalized, showing the

redistribution of different elements in subcellular fractions of rabbit thymocytes during TPA incubation. Figure 1 shows that a substantial redistribution of heavy metals (mainly Zn) occurs from the nucleus and mitochondria (+ lysosomes) to the microsomes and cytosol during TPA incubation. Figure 1 also summarizes the TPA-induced decrease in the calcium content of large granules with the parallel increase of Ca in the nucleus. The TPA-induced 'exchange' of zinc to calcium in the nuclear fraction might activate certain DNA-endonucleases which are Ca-dependent and can be inhibited by zinc (17). The activation of endonucleases might play a role in the biological action of TPA.

As we have mentioned in 'Materials and methods' minor cross-contaminations of the nuclear and large-granular fractions can not be avoided during isolation. However, these contaminations do not change the validity of *comparative* data showing differences between the subcellular fractions of TPA-treated and control thymocytes, because these traces of cross-contaminations are dependent mainly on the method of isolation [appearing very similarly in the case of T lymphocytes of different origin (11,13) or in the case of EL<sub>4</sub> lymphoma cells (18)] and TPA preincubation does not change their appearance significantly (data not shown).

The TPA-induced redistribution of heavy metals is in accordance with our earlier data (9) which suggest an increased availability of heavy metals surrounding the plasma membrane after prolonged incubation with TPA. In an independent study we have detected changes in the heavy metal content of subcellular fractions of control and TPA-treated rabbit thymocytes using X-ray fluorescence. The qualitative evaluation of the X-ray fluorescence spectra and the semi-quantitative data calculated from the spectra recorded show very similar heavy metal redistribution to our present data (19). Our results showing the total Zn and Cu content of rabbit thymocytes are in the range of data published previously; 340–2450 and 20–185 nmol/5 × 10<sup>9</sup> cells respectively (reported mainly from human peripheral blood lymphocytes, 20–28).

The 'zinc depletion' from the nucleus by incubation with the tumor promoter TPA resembles to the results of numerous studies demonstrating diminished nuclear Zn content in malignant lymphocytes compared to normal ones (29,30). The decrease of the Zn content in the nucleus and large granules may cause significant changes in the activity of several enzymes.

Besides its mitogenicity TPA has a well-documented antiproliferative effect too, which can be explained mostly with the arrest of G<sub>1</sub>→S phase transition (31). On the other hand, Zn seems to be essential for the activity of several enzymes necessary for RNA, DNA synthesis such as RNA, DNA polymerases and thymidine kinase (29). Zinc was shown to be necessary for the proliferation of lymphocytes (32) and zinc-deprivation leads to the arrest of G<sub>1</sub>→S phase transition (33). Therefore the TPA-induced depletion of zinc from the nucleus might be related to its antiproliferative activity.

As well as the zinc-depletion from nucleus and large granules there is a significant *increase in the zinc content of microsomes and cytosol*. Günther *et al.* (34) have found several Zn-binding proteins in the cytosol of normal and malignant lymphocytes. In recent reports it has been proved that the primary structure of several receptor proteins e.g. that of cortisol, oestradiol, thyroid hormone (35) and the phorbol ester receptor protein kinase C itself (36) shows the existence of putative Zn-binding sites. The increased availability of Zn in the cytosol might change the behaviour of these proteins.

Heavy metals exhibit a higher affinity for several calcium bind-

ing sites than calcium itself (37). Therefore an excess of heavy metal ions in the cytosol and microsomal fraction might occupy some of the calcium binding sites, channels attenuating the calcium fluxes essential in signal transduction. In this way the TPA-induced heavy metal redistribution might be linked to the TPA-induced block of the intercellular communication (5) and the desensitization of the TPA-treated cells towards extracellular calcium (6).

These complex changes in the heavy metal distribution upon TPA incubation might indicate a new route of action of TPA and help to explain the conflicting data about the need of heavy metals (mainly Zn) in tumor growth (30).

## Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. Endre Körös and Dr Erzsébet Andrásy (Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Eötvös Loránd University Faculty of Natural Science, Budapest, Hungary) for their helpful suggestions and advice.

## References

- Slaga, T.J., Sivak, A. and Boutwell, R.K. (1978) *Mechanisms of Tumor Promotion and Cocarcinogenesis*. Raven Press, New York.
- Hecker, E., Fusenig, N.E., Kunz, W., Marks, F. and Thielman, H.W. (1982) *Cocarcinogenesis and Biological Effects of Tumor Promoters*. Raven Press, New York.
- Börzsönyi, M., Lapis, K., Day, N.E. and Yamasaki, H. (1984) *Models and Etiology of Tumor Promotion*. IARC Scientific Publications, No. 56, International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7847–7851.
- Davidson, J.S., Baumgarten, I.M. and Harley, E.H. (1985) Studies on the mechanism of phorbol-ester induced inhibition of intercellular junctional communication. *Carcinogenesis*, **2**, 89–95.
- Fischer, P.B. and Weinstein, I.B. (1981) Enhancement of cell proliferation in low calcium medium by tumor promoters. *Carcinogenesis*, **6**, 1353–1358.
- Zavoico, G.B., Halenda, S.P., Sha'afi, R.J. and Feinstein, M.B. (1985) Phorbol myristate acetate inhibits thrombin-stimulated Ca<sup>2+</sup> mobilization and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3859–3862.
- Sagi-Eisenberg, R., Lieman, H. and Pecht, I. (1985) Protein kinase C regulation of the receptor-coupled calcium signal in histamine-secreting rat basophilic leukemia cells. *Nature*, **313**, 59–60.
- Csermely, P. and Somogyi, J. (1986) Calcium permeability of the T lymphocyte plasma membrane. Counteraction of phorbol ester and A23187. *Proceedings of the 2nd European Congress on Cell Biology. Acta Biol. Hung.*, **37**, s208.
- Kleiman, N.J., Friedman, D.L. and Di Sabato, G. (1984) Preparation of single-cell suspensions from lymphoid organs. *Methods Enzymol.*, **108**, 43–49.
- Ferber, E., Resch, K., Wallach, D.F.H. and Imm, W. (1972) Isolation and characterization of lymphocyte plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **266**, 494–504.
- Resch, K., Schneider, S. and Szamel, M. (1981) Preparation of right-side-out-oriented subfraction from purified thymocyte plasma membranes by affinity chromatography on Concanavalin-A-Sepharose. *Anal. Biochem.*, **117**, 282–292.
- Kaeffer, V., Szamel, M., Goppelt, M. and Resch, K. (1984) Characterization and subcellular localisation of nucleotide cyclases in calf thymus lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **776**, 133–143.
- Grubbs, R.D. and Maguire, M.E. (1986) Regulation of magnesium but not calcium transport by phorbol ester. *J. Biol. Chem.*, **261**, 12550–12554.
- Cox, A.Ch. and Carroll, R.C. (1986) The effect of tetradecanoyl phorbol acetate on calcium-ion mobilization, protein phosphorylation and cytoskeletal assembly induced by thrombin or arachidonate. *Biochim. Biophys. Acta*, **886**, 390–398.
- Waller, R.L., Brattin, W.J. and Dearborn, D.G. (1984) Cytosolic free calcium concentration and intracellular calcium distribution in lymphocytes from cystic fibrosis patients. *Life Sci.*, **35**, 775–781.
- Duke, R.C., Chervenak, R. and Cohen, J.J. (1983) Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6361–6365.
- Szamel, M., Goppelt, M. and Resch, K. (1985) Characterization of plasma membrane domains of mouse EL<sub>4</sub> lymphoma cells obtained by affinity chromatography on concanavalin A-Sepharose. *Biochim. Biophys. Acta*, **821**, 479–487.



19. Csermely, P., Gueth, S. and Somogyi, J. (1987) Tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA) elicits the redistribution of zinc in subcellular fractions of rabbit thymocytes measured by X-ray fluorescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **144**, 863–868.
20. Vallee, B.L. and Gibson, J.G. II (1948) The zinc content of normal human whole blood, plasma, leucocytes and erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **176**, 445–457.
21. Wolff, H.P. (1956) Untersuchungen zur Pathophysiologie des Zinkstoffwechsels. *Klin. Wochenschr.*, **34**, 409.
22. Fredericks, R.E., Tanaka, K.R., Valentine, W.N. and Mattson, M. (1960) Zinc in human blood cells: normal values and abnormalities associated with liver disease. *J. Clin. Invest.*, **39**, 1651–1656.
23. Dennes, E., Tupper, R. and Wormale, A. (1961) The zinc content of erythrocytes and leucocytes of blood from normal and leukemic subjects. *Biochem. J.*, **78**, 578–587.
24. Whitehouse, R.C., Prasad, A.S., Rabbani, P.J. and Cossack, Z.T. (1982) Zinc in plasma neutrophils, lymphocytes and erythrocytes as determined by flameless atomic spectrophotometry. *Clin. Chem.*, **28**, 475–480.
25. Kanter, R.J., Rai, K.R., Muniz, F., Michael, B., Balkon, J. and Sawitsky, A. (1982) Intracellular zinc in chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **24**, 26–32.
26. Hinks, L.J., Colmsel, M. and Delves, H.T. (1982) Determination of zinc and copper in isolated leukocytes. *Analyst*, **107**, 815–823.
27. Hinks, L.J., Clayton, B.E. and Lloyd, R.S. (1983) Zinc and copper concentrations in leucocytes and erythrocytes in healthy adults and the effect of oral contraceptives. *J. Clin. Pathol.*, **36**, 1016–1021.
28. Ishigama, K. and Nishi, Y. (1985) Superoxide dismutase activity and zinc, copper and manganese concentrations in leukocytes. *Clin. Chem.*, **31**, 1094–1095.
29. Yarom, R., Hall, Th.A. and Polliack, A. (1976) Electron microscopic X-ray microanalysis of normal and leukemic human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3690–3694.
30. van Rigg, A.M. and Pories, W.J. (1980) Zinc and tumor growth. In Siegel, H. (ed.), *Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker, New York, Vol. 10, pp. 207–251.
31. Dröge, W. (1986) Protein kinase C in T-cell regulation. *Immunol. Today*, **7**, 340–343.
32. Alford, R.H. (1970) Metal cation requirements for phytohemagglutinin-induced transformation of human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.*, **104**, 698–703.
33. Vallee, B.L. (1977) Zinc biochemistry in normal and neoplastic growth processes. *Experientia*, **33**, 600–601.
34. Günther, T., Averdunk, R. and Ruehl, H. (1979) Zinc metabolism in normal, lectin-stimulated and leukemic lymphocytes. *Z. Immunitätsforsch.*, **155**, 269–278.
35. Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J. and Evans, R.M. (1986) The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, **324**, 640–646.
36. Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D. and Ullrich, A. (1986) The complete primary structure of protein kinase C — the major phorbol ester receptor. *Science*, **233**, 853–859.
37. Habermann, E. and Richardt, G. (1986) Intracellular calcium binding proteins as targets for heavy metals. *Trends Pharmacol. Sci.*, **7**, 298–300.

Received on April 22, 1987; accepted on August 6, 1987

## The 90-kDa Heat Shock Protein (hsp-90) Possesses an ATP Binding Site and Autophosphorylating Activity\*

(Received for publication, September 24, 1990)

Peter Csermely† and C. Ronald Kahn§

From the Research Division, Joslin Diabetes Center, and Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215

The 90-kDa heat shock protein (hsp-90) is an abundant cytosolic protein believed to play a role in maintenance of protein trafficking and closely associated with several steroid hormone receptors. Incubation of highly purified hsp-90 with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP results in its autophosphorylation on serine residues. There are several lines of evidence which suggest that this activity is due to a kinase intrinsic to hsp-90 rather than some closely associated protein kinases: 1) the phosphorylation persists after the removal of casein kinase II by heparin chromatography and after immunoprecipitation of hsp-90 with anti-hsp-90 antibodies. 2) The approximate  $K_M$  for ATP of the reaction is 0.16 mM, higher than that of many other protein kinases. 3) Phosphorylation is not affected by a number of activators and inhibitors of other known kinases which might associate with hsp-90. 4) The phosphorylation displays a unique cation dependence being most active in the presence of  $Ca^{2+}$  and practically inactive with  $Mg^{2+}$ , although the autophosphorylation in the presence of  $Mg^{2+}$  is activated by histones and polyamines. 5) The activity is remarkably heat-stable; incubation of hsp-90 for 20 min at 95 °C results in only a 60% decrease in autophosphorylation. 6) Finally, and most importantly, purified hsp-90 can be labeled with azido-ATP and it is able to bind to ATP-agarose. The binding shows similar cation dependence to the autophosphorylation. These data are in agreement with the presence of a consensus sequence for ATP binding sites in the primary structure of the protein similar to that observed in the 70-kDa heat-shock proteins. Our data suggest the 90-kDa heat shock protein possesses an enzymatic activity analogous in many respects to the similar activity of the 70-kDa heat shock proteins. This may represent an important, previously unrecognized function of hsp-90.

temperatures above their natural range and to various other environmental stresses (1–4). The major heat shock proteins can be grouped into three size classes based on their approximate molecular weights and degrees of homology. One class is composed of proteins with molecular size between 15 and 30 kDa; members of the second and most highly conserved group have molecular sizes of approximately 70 kDa; and the third class consists of heat shock proteins with molecular sizes ranging between 80 and 105 kDa.

A member of the latter group, the 90-kDa heat shock protein (hsp-90),<sup>1</sup> is present in most, if not all, prokaryotic and eukaryotic cells and may constitute up to 1–2% of the total cytosolic protein. hsp-90 is associated with most steroid hormone receptors in their non-ligand-bound state and is believed to act as a “molecular chaperone” preventing the premature association of steroid receptors with DNA (2–5). hsp-90 also forms complexes with a number of protein kinases, including casein kinase II, double-stranded DNA-activated protein kinase, heme-regulated eIF-2 $\alpha$  kinase, protein kinase C, and various tyrosine kinases (4, 6–12). In addition, hsp-90 associates with the microfilamental and microtubular network, raising the possibility that it may use these cellular trajectories in targeting the steroid receptors and other proteins to the nucleus (13–15). Despite this information, the exact function of hsp-90 is incompletely elucidated.

In the present report we present evidence that hsp-90 possesses an ATP binding site and the ability to phosphorylate itself on serine residues. These findings represent the first demonstration of an apparent enzyme activity associated with this abundant cellular protein and may help to understand its function in normal and stressed cells.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Chemicals**—Butyl-Sepharose 4B, DEAE-Sepharose Fast Flow, and Sepharose S-200 resins were purchased from Pharmacia LKB Biotechnology Inc. Spectragel HA hydroxylapatite resin was from Spectrum Medical Industries (Los Angeles, CA). Bio-Gel P-6DG resin and all the chemicals used for polyacrylamide gel electrophoresis were from Bio-Rad. The rabbit (AC88 and D7a) and sheep anti-hsp-90 antibodies were kindly provided by Drs. David O. Toft (Mayo Medical School, Rochester, MN) and Michael J. Welsch (University of Michigan, Medical School, Ann Arbor, MI), respectively. AC88 recognizes “free” hsp-90, i.e. hsp-90 which is not complexed with steroid hormone receptors, whereas D7a and the goat anti-hsp-90 antibodies react with both the free and “bound” hsp-90 (16, 17). Anti-phosphotyrosine antibodies were a gift of Dr. Morris F. White (Joslin Diabetes Center). Protein A-acrylamide beads, constant boiling 6 N HCl, and Triton X-100 were obtained from Pierce Chemical Co. The tyrosine kinase inhibitor tyrphostin (18) was kindly provided by Dr. Joseph Schles-

Heat shock proteins are a set of predominantly cytoplasmic proteins universally expressed in organisms in response to

\* This work was supported by Research Grant DK 33201 from the National Institutes of Health, by NIH Grant DK 36836 for the Joslin Diabetes and Endocrinology Research Center, by a Pfizer Biomedical Research Award, and by the Marilyn M. Simpson Research Program in Diabetes. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† Recipient of Fogarty International Research Fellowship Award 1F05 TW04319-01 B1-5. On leave from the Institute of Biochemistry I., Semmelweis University, Medical School, Budapest, Hungary.

§ To whom correspondence should be addressed: Joslin Diabetes Ctr., One Joslin Place, Boston, MA 02215. Tel.: 617-732-2635; Fax: 617-732-2593.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: hsp-90, 90-kDa heat shock protein; TPCK, L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone; Hepes, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; EGTA, [ethylenbis-(oxyethylenitrilo)]tetraacetic acid; DTT, dithiothreitol; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.



singer (Rorer Biotechnology, King of Prussia, PA). [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (111 TBq/mmol), and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]GTP (111 TBq/mmol) were from Du Pont-New England Nuclear; [ $\alpha$ - $^{32}$ P]8-azido-ATP (366 GBq/mmol) was from ICN Biomedicals Inc. (Irvine, CA). TPCK-trypsin was obtained from Worthington. All the other chemicals used were from Sigma.

**Isolation of hsp-90**—The 90-kDa heat shock protein was isolated from livers of 2–3 month-old, male Sprague-Dawley rats using the method of Yonezawa *et al.* (19) with the following modifications: in all buffers Hepes was used instead of Tris; ATP (at a final concentration of 1 mM) was included in the buffers of the butyl-Sepharose 4B and DEAE-Sepharose Fast Flow chromatographies; a gel filtration step was added using a Sepharose S-200 (60  $\times$  2 cm) column in between the DEAE and hydroxylapatite ion exchange chromatographies. hsp-90 was detected by immunoblotting with sheep anti-hsp-90 antibody. After the Spectragel HA hydroxylapatite chromatography the purified hsp-90 was dialyzed against 4 liters of 50 mM Hepes, pH 7.4, 0.5 mM DTT buffer. The purity of this preparation was higher than 95% (usually higher than 98%) as judged by densitometry of Coomassie Blue-stained SDS slab gels. A significant portion of the small amount of contaminating proteins were derived from proteolysis of hsp-90 and were recognized by the anti-hsp-90 antibody D7a in immunoblots. For some experiments, an even more highly purified preparation of hsp-90 was prepared in which any trace amounts of casein kinase II potentially associated with hsp-90 were removed by heparin affinity chromatography (20). This preparation is referred to as "highly purified hsp-90" or heparin-purified hsp-90.

**Phosphorylation and Dephosphorylation of hsp-90**—5  $\mu$ g of the appropriate hsp-90 preparation was incubated in the presence of 50 mM Hepes, pH 7.4, 200  $\mu$ M of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP or [ $\gamma$ - $^{32}$ P]GTP (5,000–6,000 and 10,000–12,000 cpm/pmol, respectively) and 10 mM of the indicated divalent cation for 20 min at 30  $^{\circ}$ C. The reaction was stopped by boiling for 5 min in the presence of Laemmli buffer (21) containing 10 mM EDTA, and 20 mM DTT. Samples were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The radioactivity of the hsp-90 bands was quantitated by densitometry of the autoradiograms and by direct Cerenkov counting of the bands in 20% methanol.

In some experiments hsp-90 was prephosphorylated before labeling with [ $^{32}$ P]ATP. 1 mg of hsp-90, or "heparin-purified" hsp-90, was incubated for 30 min at room temperature in the presence of 50 mM Hepes, pH 7.4, 2 mM ATP, and 5 mM  $Mg^{2+}$  or  $Ca^{2+}$ , respectively; the excess of ATP was removed by gel filtration on a Bio-Gel P-6DG column. In other experiments hsp-90 was dephosphorylated before [ $^{32}$ P]ATP labeling. For these, 0.5 mg of heparin-purified hsp-90 was incubated with 30 units of alkaline phosphatase immobilized on agarose in the presence of 50 mM Hepes, pH 8.0, and 5 mM  $MgCl_2$  at room temperature with continuous rotation. After 2 h, the buffer was changed to 50 mM Hepes, pH 7.4, and the sample was concentrated using Centricon 30 ultrafilters.

**Covalent Labeling of hsp-90 with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]Azido-ATP**—5  $\mu$ g of hsp-90 was preincubated with 4  $\mu$ M [ $\alpha$ - $^{32}$ P]azido-ATP in the dark in separate wells of a 96-well microtiter plate at 4  $^{\circ}$ C for 15 min in a buffer containing 50 mM Hepes, pH 7.4, and 10 mM of the indicated divalent cation. The reaction mixture was irradiated with a 100-watt long wavelength UV lamp (Black Ray, UVP Inc., San Gabriel, CA) for 5 min at 4  $^{\circ}$ C from a distance of 10 cm. Samples were transferred to Eppendorf microfuge tubes containing 30  $\mu$ l of Laemmli buffer (21) supplemented with 10 mM EDTA and 20 mM DTT, boiled for 5 min, and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The radioactivity of the hsp-90 bands was quantitated by densitometry of the autoradiograms and by liquid scintillation counting.

**Immunoprecipitation of hsp-90**—hsp-90 was immunoprecipitated with rabbit (AC88 and D7a) or sheep anti-hsp-90 antibodies. The reaction mixtures of the phosphorylation or 8-azido-ATP labeling experiments (containing 5  $\mu$ g of hsp-90) were incubated overnight with 10  $\mu$ g of the affinity purified antibodies at 4  $^{\circ}$ C in the presence of 10 mM ATP, or in the dark, respectively. Samples were diluted to 0.5 ml with 50 mM Hepes, pH 7.4, and 30  $\mu$ l of protein A-acylamide beads was added. After 2 h of rotation at 4  $^{\circ}$ C, samples were centrifuged and successively washed with 1 ml each of buffers containing 50 mM Hepes, pH 7.4, supplemented with 0.1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Triton X-100, and 0.1% (v/v) Triton X-100, respectively. The final pellets were eluted with Laemmli buffer (21) containing 20 mM DTT and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

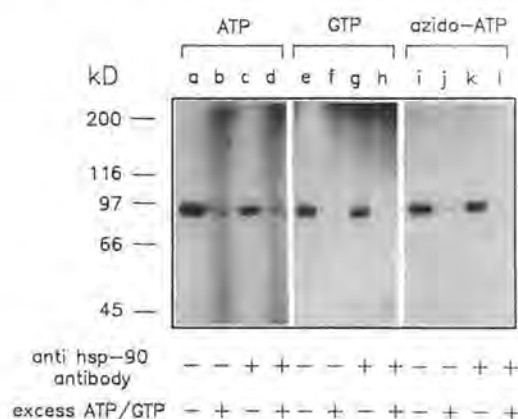
**Phosphoamino Acid Analysis**—Phosphoamino acid analysis was carried out by the method of Cooper *et al.* (22). hsp-90 bands were excised from the acrylamide gel, soaked in 20% methanol, digested with the addition of 2  $\times$  100  $\mu$ g of TPCK-trypsin in 50 mM ammonium carbonate for 24 h at 37  $^{\circ}$ C. The tryptic digest was lyophilized and

hydrolyzed in constant boiling 6 N HCl at 110  $^{\circ}$ C for 60 min. The hydrolysates were washed with 2  $\times$  1 ml of distilled water and subjected to electrophoresis on TLC plates at pH 3.5. Plates were dried, stained with ninhydrin, and analyzed by autoradiography.

**Other Methods**—ATPase activity was determined in a 0.1-ml reaction medium containing 5  $\mu$ g of hsp-90, 0.5 mM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (200,000 cpm/sample), 5 mM of the indicated divalent cation, and 50 mM Hepes, pH 7.4, or 50 mM Tris, pH 8.4. The amount of [ $^{32}$ P] inorganic phosphate was determined by extraction of its phosphomolybdate complex to organic phase and liquid scintillation counting (23). ATP-dependent protease activity was measured by the detection of the hydrolysis of fluorescein isothiocyanate-labeled casein (24). The reaction mixture contained 5  $\mu$ g of hsp-90, 2 mg/ml fluorescein isothiocyanate-labeled casein, 50 mM Hepes, pH 7.4, 0.5 mM DTT, with or without 5 mM ATP and 5 mM  $MgCl_2$  or  $CaCl_2$ . Samples were incubated at 30  $^{\circ}$ C for 60 min, precipitated with trichloroacetic acid, and the fluorescence of the neutralized supernatants was measured (24). Protein concentrations were determined using the method of Bradford (25) and bovine  $\gamma$ -globulin as standard.

## RESULTS

**Phosphorylation of hsp-90**—Incubation of heparin affinity chromatography purified hsp-90 with 0.2 mM [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP and 5 mM  $Ca^{2+}$  resulted in heavy labeling of the 90-kDa hsp band (Fig. 1, lane a). This label persisted after immunoprecipitation with anti-hsp-90 antibody (lane c). In the presence of excess ATP (10 mM) the labeling was decreased by about 80% (lanes b and d). Thus, highly purified hsp-90 appeared to undergo autophosphorylation catalyzed by a saturable enzymatic process. Neither  $^{32}$ P-labeled inorganic phosphate nor [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP was able to label hsp-90 (data not shown), thereby excluding the possibility that the observed effect was due to either tight association of radioactive ATP with some highly charged regions of hsp-90 or poly-(ADP-ribosylation) of the protein (26). By contrast, [ $\gamma$ - $^{32}$ P]GTP induced similar phosphorylation of hsp-90 as [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (Fig. 1, lanes e–h). When analyzed at multiple concentrations of nucleotide triphosphate, the  $K_M$  of the reaction was 0.16 mM for ATP and 0.44 mM for GTP (Fig. 2).



**FIG. 1. Autophosphorylation and azido-ATP labeling of hsp-90.** 5  $\mu$ g of heparin affinity purified hsp-90 was phosphorylated by 200  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (lanes a–d) or [ $\gamma$ - $^{32}$ P]GTP (lanes e–h) in the presence of 10 mM  $Ca^{2+}$  for 20 min at 30  $^{\circ}$ C as described under "Experimental Procedures." Samples represented in lanes b, d, f, and h were phosphorylated in the presence of 10 mM ATP or 10 mM GTP, respectively. In separate experiments, 5  $\mu$ g of heparin affinity purified hsp-90 was labeled with 4  $\mu$ M [ $\alpha$ - $^{32}$ P]azido-ATP (lanes i–l) in the presence of 10 mM  $Ca^{2+}$  by illuminating with UV light for 5 min at 4  $^{\circ}$ C as described under "Experimental Procedures." Samples represented by lanes j and l were labeled in the presence of 10 mM ATP. After the phosphorylation or labeling, some samples were immunoprecipitated with the rabbit anti-hsp-90 antibody D7a as described under "Experimental Procedures" (lanes c, d, g, h, k, and l). Samples were subjected to SDS-PAGE and autoradiography. The autoradiogram shown is representative of three separate experiments.



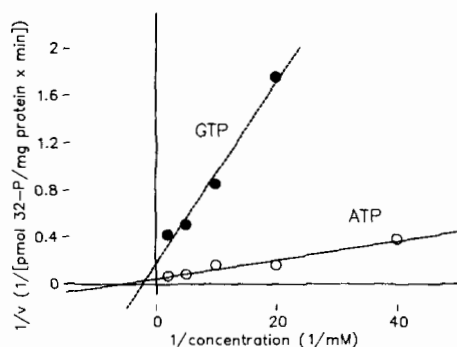


FIG. 2. Double-reciprocal plot of the ATP and GTP dependence of hsp-90 autophosphorylation. 5  $\mu$ g of heparin affinity purified hsp-90 was phosphorylated by various concentrations of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (○—○) or [ $\gamma$ - $^{32}$ P]GTP (●—●) in the presence of 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  for 20 min at 30 °C as described under "Experimental Procedures." Preliminary experiments indicated that the autophosphorylation was a linear function of time up to 30 min in the concentration range tested. Samples were analyzed by SDS-PAGE and the amount of incorporated  $^{32}$ P was calculated by measuring the radioactivity of the hsp-90 bands. Data represent the mean of two separate experiments.

Since it is well known that the 90-kDa heat shock protein forms complexes with a number of serine, threonine, and tyrosine protein kinases (4, 6–12), we examined the effect of known inhibitors and activators of these enzymes on the phosphorylation of hsp-90. The phosphorylation of hsp-90 in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  was strongly inhibited by both heparin and 5,6-dichlorobenzimidazole riboside suggesting that casein kinase II was present at this step of purification. By contrast, the phosphorylation of heparin affinity purified hsp-90 in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  was not significantly affected by 50  $\mu$ g/ml double-stranded DNA, 5  $\mu$ g/ml heparin, 5 mM 5,6-dichlorobenzimidazole riboside, 200  $\mu$ M hemin, 100  $\mu$ M H-7 (1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine, 100  $\mu$ g/ml phosphatidylserine plus 10  $\mu$ g/ml diacylglycerol, and 100  $\mu$ M of the tyrosine kinase inhibitor tyrphostin (18) which modify the activity of the double-stranded DNA-activated protein kinase, casein kinase II, heme-regulated eIF-2 $\alpha$  kinase, protein kinase C, and various tyrosine kinases, respectively (4, 6–12, 18; data not shown). Thus, it seemed unlikely that a contaminating protein kinase was responsible for the observed phosphorylation of hsp-90.

**Covalent Labeling of hsp-90 with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]8-Azido-ATP**—Observing the phosphorylation of hsp-90 in highly purified preparations of the protein and gaining some evidence that none of the kinases known to be associated with hsp-90 seem to be involved in this process, we examined whether hsp-90 could be covalently labeled with radioactive azido-ATP. Following incubation and UV radiation of hsp-90 with the ATP affinity reagent the 90-kDa band was heavily labeled. This labeled band was immunoprecipitated with anti-hsp-90 antibodies (Fig. 1, lanes i and k). ATP (10 mM) effectively competed for labeling by radioactive azido-ATP in both the non-immunoprecipitated and immunoprecipitated samples (lanes j and l).

**Binding of hsp-90 to ATP-Agarose**—In addition to labeling with azido-ATP, 30 and 76% of the heparin affinity purified hsp-90 was able to bind to ATP-agarose in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ , respectively, both ions which support autophosphorylation (Table I, and see below). The binding of hsp-90 was negligible in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$ , without divalent cations or without covalently attached ATP. These results provide further evidence that hsp-90 has a nucleotide binding site.

TABLE I

## Binding of hsp-90 to ATP-agarose

50  $\mu$ g of purified hsp-90 was applied to a 50- $\mu$ l ATP-agarose (A4793, Sigma) or agarose (A0169, Sigma) microcolumn equilibrated with a buffer containing 50 mM Hepes, pH 7.4, and 10 mM of the divalent cation indicated. The column was washed with 4  $\times$  0.2 ml of the same buffer, and the bound hsp-90 was eluted with 4  $\times$  0.2 ml of Hepes, pH 7.4, 10 mM EDTA solution. The amount of hsp-90 was quantified by determination of protein content of each fraction collected. The percentage of hsp-90 bound represents the relative amount of protein in the EDTA elution as a percentage of total hsp-90 recovered. Data are the mean of two separate experiments.

hsp-90 in the presence of	% bound
$\text{Mg}^{2+}$ -(ATP-agarose)	5
$\text{Ca}^{2+}$ -(ATP-agarose)	30
$\text{Mn}^{2+}$ -(ATP-agarose)	76
EDTA, EGTA-(ATP-agarose)	4
$\text{Mn}^{2+}$ -(agarose)	10

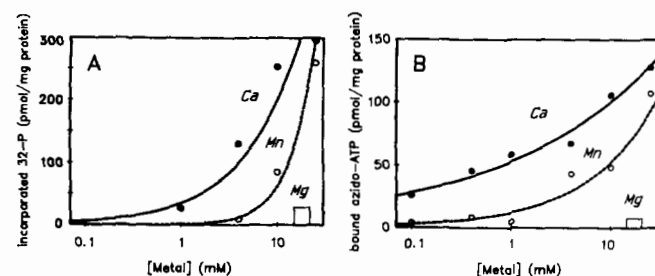


FIG. 3. Divalent cation dependence of the autophosphorylation and azido-ATP labeling of hsp-90. 5  $\mu$ g of heparin affinity purified hsp-90 was phosphorylated by 200  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP for 20 min at 30 °C (A) or labeled with 4  $\mu$ M [ $\alpha$ - $^{32}$ P]azido-ATP using 5-min UV illumination at 4 °C (B) as described under "Experimental Procedures." The phosphorylation or labeling was carried out in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (filled circles) or  $\text{Mn}^{2+}$  (open circles) at indicated final concentrations. The bars represent experiments done in the presence of 25 mM  $\text{Mg}^{2+}$ . Samples were analyzed by SDS-PAGE. The amount of incorporated  $^{32}$ P or bound azido-ATP was calculated by measuring the radioactivity of the hsp-90 bands. Data represent the mean of two separate experiments.

**Metal Dependence of the Phosphorylation and Azido-ATP Labeling of hsp-90**—The autophosphorylation of hsp-90 was supported by  $\text{Ca}^{2+}$  and, to a lesser extent, by  $\text{Mn}^{2+}$  at final concentrations higher than 1 mM (Fig. 3A). The azido-ATP labeling of heparin affinity purified hsp-90 displayed similar dependence on  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  (Fig. 3B). In contrast, there was virtually no autophosphorylation or azido-ATP labeling in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  even at final concentrations as high as 25 mM (Fig. 3, A and B). Neither the phosphorylation nor the azido-ATP labeling reached saturation in the concentration range tested. In our experiments, however, some precipitation of the samples occurred if the concentration of the divalent cations was raised above 25 mM; therefore, we did not extend the concentration range above this value. Calmodulin, a modulator of the association of hsp-90 with actin (14), did not induce any significant changes in the level of hsp-90 phosphorylation in the presence of either micromolar or millimolar  $\text{Ca}^{2+}$  (data not shown). From the data of Fig. 3 it can be calculated that under our normal assay conditions (10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 0.2 mM ATP), 1–2% of the total hsp-90 became phosphorylated or covalently labeled after 20 min at 30 °C using an hsp-90 concentration of 0.1 mg/ml.

The metal dependence of the phosphorylation of hsp-90 in standard hsp-90 preparations displayed a markedly different pattern than the highly purified hsp-90. For "standard" hsp-90,  $\text{Mg}^{2+}$  was the most active among the three divalent cations tested, while  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  induced a much slighter effect



(data not shown). This different behavior most probably reflects the presence of some casein kinase II in the less purified preparations which readily phosphorylates hsp-90 in the presence of Mg-ATP (20).

**Histones, and Protamine, but Not Polyamines Activate hsp-90 Phosphorylation in the Presence of Magnesium**—Autophosphorylation of hsp-90 was modified by polycations depending on the divalent metal ion used for activation. Lysine-rich histone lowered the phosphorylation of heparin affinity purified hsp-90 in the presence of calcium, had no effect in the presence of manganese, and activated several-fold the phosphorylation in the presence of magnesium (Fig. 4). The effect of lysine-rich histones on the calcium-induced autophosphorylation of hsp-90 varied in different experiments. In most of the experiments lysine-rich histone lowered the autophosphorylation only slightly (Table II, column "Ca<sup>2+</sup>"); however, in one of the experiments (shown in Fig. 4) the inhibition was almost complete. In the presence of Mg<sup>2+</sup>-lysine-rich histones produced a more pronounced activation of hsp-90 autophosphorylation than the arginine-rich fractions (Table II, column "Mg<sup>2+</sup>"). Type II-S histone, a mixture of lysine- and arginine-rich fractions, displayed an intermediate activity. Protamine showed similar characteristics as lysine-rich histone. These effects, however, are not a general feature of polycations since polyamines did not change the phosphorylation of hsp-90 (Table II, column "Mg<sup>2+</sup>"). This latter observation also argues against the possibility that the magnesium-dependent kinase activity is due to the activation of a contaminating kinase by histones or protamine, since the kinase most likely associated with hsp-90, casein kinase II, is

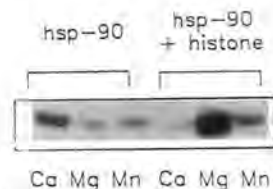


FIG. 4. The effect of lysine-rich histone on the divalent cation dependence of hsp-90 autophosphorylation. The autophosphorylation of 5  $\mu$ g of heparin affinity purified hsp-90 was carried out in the absence or presence of 5  $\mu$ g of lysine-rich histone (Type III-S, Sigma) with 10 mM final concentration of the indicated divalent cation and 200  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP for 20 min at 30 °C as described under "Experimental Procedures." After phosphorylation samples were subjected to SDS-PAGE and autoradiography. The autoradiogram shown is representative of three separate experiments.

TABLE II  
Autophosphorylation of hsp-90 in the presence of various basic substances

The phosphorylation of heparin affinity purified hsp-90 was carried out as described under "Experimental Procedures" in the absence or presence of 5  $\mu$ g of various basic substances and 10 mM of Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> as indicated. Samples were analyzed by SDS-PAGE, the 90-kDa bands of the gels were cut out, and the amount of their radioactivity was quantified by liquid scintillation counting. Data are representative of three separate experiments.

	<sup>32</sup> P incorporated	
	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>
	pmol/mg protein	
Control	120	10
+Histone (type II-S)	93	50
+Histone (Arg-rich)	82	30
+Histone (Lys-rich)	80	150
+Protamine	110	120
+Putrescine	115	13
+Spermidine	110	10
+Spermine	119	11

also activated by polyamines (27, 28). The assumption that histones and protamine activate the same kinase activity which is displayed at the Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation of hsp-90 is further supported by the fact that this Mg<sup>2+</sup>-dependent activity is also heat-stable (data not shown).

**Heat Stability of hsp-90 Phosphorylation**—The effect of a 10-min preincubation at various temperatures on the activity of hsp-90 in the presence of Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> is shown in Fig. 5A. The magnesium-dependent activity (which was most probably derived from casein kinase II since it could be inhibited by the inhibitors of this enzyme) displayed a typical heat inactivation pattern for many enzymes, being almost completely inactivated at 55 °C within 10 min. However, the Mn<sup>2+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation of hsp-90 was extremely heat-stable with a significant amount of the activity remaining after a 10-min preincubation at 95 °C. Furthermore, the Ca<sup>2+</sup>- and Mn<sup>2+</sup>-dependent autophosphorylation of hsp-90 persisted even after 20 min of preincubation at 95 °C, while the Mg<sup>2+</sup>-dependent activity was eliminated after 2 min (Fig. 5B). In the experiments shown, the preincubations were carried out in the absence of the divalent cations. Similar data were obtained if the preincubations were done in the presence of the indicated cations. The heparin-purified hsp-90 preparation in the presence of Ca<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> displayed identical heat inactivation pattern as the less purified hsp-90, although in this case Mg<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation was too low to obtain a reasonable pattern of heat inactivation (data not shown).

**Phosphoamino Acid Analysis**—The phosphorylation of heparin affinity purified hsp-90 occurred predominantly on phosphoserine both in the presence of Ca<sup>2+</sup> (Fig. 6A) or Mg<sup>2+</sup> plus lysine-rich histone (Fig. 6B). These results are in agreement with our other experiments which showed that phosphorylated hsp-90 was not immunoprecipitated with anti-phosphotyrosine antibodies and that the phosphate group(s) of hsp-90 is acid-stable but alkali-sensitive (data not shown). The acid stability of the label also argues against the presence of any phospholysine, phosphoarginine, or phosphohistidine residues (29). Polyacrylamide gel electrophoresis at pH 2.0 (30) did not produce any significant increase in the amount of radioactive label recovered, suggesting no alkaline-sensitive acyl-phosphate intermediates (data not shown).

**Effect of Pre- and Dephosphorylation on the Autophosphorylation of hsp-90**—The prephosphorylation of heparin affinity

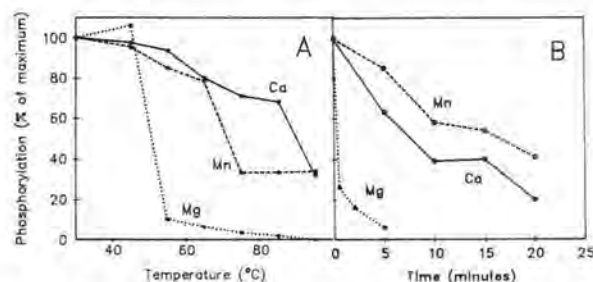


FIG. 5. Heat stability of hsp-90 phosphorylation. 5  $\mu$ g of hsp-90 was incubated in 50 mM Hepes buffer, pH 7.4, for 10 min at indicated temperatures (A) or at 95 °C for indicated times (B). After heat treatment, samples were cooled to 30 °C and phosphorylated with 200  $\mu$ M [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP in the presence of 10 mM Ca<sup>2+</sup> (open circles), 10 mM Mn<sup>2+</sup> (filled circles), or 10 mM Mg<sup>2+</sup> (stars) for 20 min as described under "Experimental Procedures." After phosphorylation samples were analyzed by SDS-PAGE. The radioactivity of the hsp-90 bands was measured and expressed as a percentage of control sample which had a heat treatment at 30 °C for 10 min. "100% phosphorylation" was 580, 150, and 60 pmol of <sup>32</sup>P/mg protein in the presence of Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>, respectively. Data represent the mean of two separate experiments.



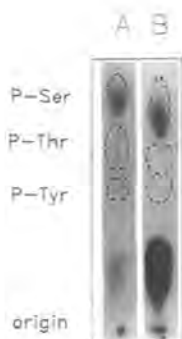


FIG. 6. Phosphoamino acid analysis of hsp-90. 5  $\mu$ g of heparin affinity purified hsp-90 was phosphorylated by 200  $\mu$ M [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP in the presence of 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (A) or 5  $\mu$ g of lysine-rich histone and 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  (B) for 20 min at 30  $^{\circ}\text{C}$  and subjected to SDS-PAGE as described under "Experimental Procedures." The 90-kDa hsp-90 band was excised, digested by  $2 \times 100$   $\mu$ g of TPCK-trypsin at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 24 h, hydrolyzed in 6 N HCl at 110  $^{\circ}\text{C}$  for 60 min, and subjected to high voltage electrophoresis at pH 3.5 on a TLC plate. Plates were dried, stained with ninhydrin, and analyzed by autoradiography. The autoradiogram shown is a representative of three separate experiments.

TABLE III

Effect of prephosphorylation and dephosphorylation on the autophosphorylation and azido-ATP labeling of hsp-90

Heparin affinity purified hsp-90 was phosphorylated or labeled with azido-ATP without any previous treatment ("Control"), after prephosphorylation in the presence of 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , or after dephosphorylation by immobilized alkaline phosphatase as described under "Experimental Procedures." In the case of the  $\text{Mg}^{2+}$ -prephosphorylated hsp-90, hsp-90 was first phosphorylated in the presence of 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  and then subjected to heparin affinity chromatography and successive phosphorylation or azido-ATP labeling. After phosphorylation or labeling with azido-ATP samples were analyzed by SDS-PAGE, the 90-kDa bands of the gels were cut out, and the amount of their radioactivity was quantified by liquid scintillation counting. Data are the mean of two (in the case of "Dephosphorylated hsp-90," four) separate experiments.

	$^{32}\text{P}$ -incorporated		Azido-ATP-bound	
	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$
	pmol/mg protein			
Control	112	30	192	24
$\text{Ca}^{2+}$ -prephosphorylated hsp-90	44	14	260	29
$\text{Mg}^{2+}$ -prephosphorylated hsp-90	90	31	197	27
Dephosphorylated hsp-90	53	16	171	38

ity purified hsp-90 in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  diminishes the amount of radioactive label acquired in a subsequent incubation of the protein with  $\text{Ca}^{2+}$  and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (Table III). If we prephosphorylated hsp-90 in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  (where the phosphorylation was most probably induced by casein kinase II), the amount of autophosphorylation did not change significantly. However, if hsp-90 was dephosphorylated first with immobilized alkaline phosphatase, the subsequent radioactive phosphorylation was significantly diminished. A control experiment where only the buffer of alkaline phosphatase, but not the enzyme itself was added did not result in any significant changes in autophosphorylation (data not shown). Azido-ATP binding to hsp-90 was not significantly altered by any of these treatments (Table III).

**hsp-90 Does Not Possess an ATPase- or ATP-dependent Protease Activity**—The existence of a nucleotide binding site in the 90-kDa heat shock protein prompted us to speculate whether the protein might display ATP-dependent activities other than phosphorylation, such as ATPase or ATP-dependent protease activities. Since the 70-kDa heat shock proteins are ATPases (2–4), we examined whether hsp-90 was also

able to hydrolyze ATP. hsp-90 showed no significant ATPase activity at pH 7.4 or at pH 8.5 in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , or  $\text{Mn}^{2+}$  (data not shown).

Nonlysosomal protein degradation utilizes mostly ATP-dependent proteases (31). Since in some of our preparations we observed some minor bands moving around 70–80 kDa which were recognized by anti-hsp-90 antibodies in immunoblots which may be products of some limited proteolysis, we examined whether hsp-90 had any ATP-dependent protease activity. However, hsp-90 did not cause any significant proteolysis of fluorescein isothiocyanate-labeled casein, a good substrate of ATP-dependent proteases (31), either in the absence or in the presence of ATP and  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , or  $\text{Mn}^{2+}$  (data not shown).

## DISCUSSION

The 90-kDa heat shock protein (hsp-90) is a highly conserved stress protein which is abundant in the cytoplasm of most prokaryotic and eukaryotic cells. Although the synthesis of hsp-90 is strongly induced by elevated temperatures and by various other stimuli, relatively high amounts of hsp-90 are also detected in unstressed cells (1–4). This has led to the hypothesis that hsp-90 has an important function in cells which becomes even more needed after injury or stress. Although the exact function of hsp-90 is uncertain, it has a tendency to form complexes with a variety of other proteins, including steroid receptors, protein kinases, actin, and tubulin (2–15). Our present knowledge is very much limited concerning the mechanism, consequences, and significance of these associations. One of the major missing links is that thus far no intrinsic activity other than binding of proteins has been assigned to hsp-90. The current study provides evidence that hsp-90 possesses a nucleotide binding site and may be a kinase able to autophosphorylate itself.

When incubated with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP or [ $\gamma$ - $^{32}$ P]GTP, highly purified preparations of hsp-90 become phosphorylated in a time-dependent manner. Since hsp-90 is known to be associated with a number of protein kinases (4, 6–12), one possible explanation of this phenomenon is that traces of contaminating kinases are still present in the hsp-90 and induce the phosphorylation of the 90-kDa band. Several lines of evidence show, however, that this is not the case:

1) The phosphorylation of hsp-90 persists after the removal of casein kinase II by heparin affinity chromatography and after immunoprecipitation of hsp-90 by anti-hsp-90 antibodies.

2) The approximate  $k_M$  of the reaction is 0.16 mM for ATP. This is much higher than the reported values for most other protein kinases and considerably higher than that for casein kinase II (6  $\mu\text{M}$ ) (28) or protein kinase C (1.5–15  $\mu\text{M}$ ) (32). Furthermore, phosphorylation is not affected by a number of activators and inhibitors of the known kinases which might associate with hsp-90.

3) The phosphorylation displays a unique cation dependence being most active in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , moderately active in the presence of  $\text{Mn}^{2+}$  but practically inactive with  $\text{Mg}^{2+}$ .

4) The activity is remarkably heat-stable. hsp-90 retains significant autophosphorylation activity even after incubation for 20 min at 95  $^{\circ}\text{C}$ .

5) The phosphorylation is substrate-specific. Although hsp-90 is capable of autophosphorylation, thus far, in preliminary experiments, we have not observed a significant phosphorylation of histones, protamine, casein, phosphatidyl, actin, Kempide (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly), and angiotensin, well known substrates of the kinases usually associated with hsp-



90, by the purified hsp-90 preparation (data not shown).

Thus, the data strongly suggest that hsp-90 itself possesses an intrinsic autophosphorylating activity.

Consistent with this observation, hsp-90 possesses an ATP binding site. hsp-90 can be labeled with 8-azido-ATP and can bind to ATP-agarose. Examination of the primary sequence of the protein (33) and comparison of it to the consensus sequence for ATP binding sites in other heat shock proteins (34–37) reveals that hsp-90 contains homologous regions for both the “A” and “B” sequences associated with ATP binding (Table IV). Although this is a different type of ATP binding site than that of other serine or tyrosine kinases, it is highly homologous with the ATP binding sites of the 70-kDa heat shock proteins. hsp-90 can also utilize GTP for its autophosphorylation. GTP has a similar efficiency as ATP in competing with azido-ATP binding (data not shown). However, hsp-90 does not have an ideal sequence match with the GTP binding consensus sequence (38), and the  $k_M$  for GTP (0.44 mM) is too high to permit GTP as the preferred substrate over ATP *in vivo*. The almost identical metal dependence of the autophosphorylation and azido-ATP labeling further supports our conclusion that hsp-90 is a kinase capable of autophosphorylating itself.

The ability of hsp-90 to undergo autophosphorylation depends on the pre-existing phosphorylation state of the protein. The somewhat unexpected finding that dephosphorylation of hsp-90 actually decreases its successive autophosphorylation suggests that phosphorylation *in vivo* on a specific residue(s) may be necessary for the autophosphorylation reaction. A similar phenomenon has been observed in reticulocytes where hsp-90 is not able to stimulate the heme-sensitive eIF-2 $\alpha$  kinase in its dephosphorylated form (39).

Under our experimental conditions relatively minor amounts (1–2%) of the total hsp-90 became phosphorylated. This extent of autophosphorylation is significantly smaller than the stoichiometric, or almost stoichiometric autophosphorylation of most protein kinases (40). However, in the case of the dnaK protein of *Escherichia coli*, which shows an extensive analogy with hsp-90 (see below), the extent of autophosphorylation is similarly low, 1–4% (41). It is also

possible that only a subpopulation of hsp-90 (isoform, monomer, prephosphorylated hsp-90, or otherwise different hsp-90) is participating in the autophosphorylation and this subpopulation incorporates stoichiometric amounts of phosphate. Further experiments are needed to resolve this question.

The autophosphorylation and ATP binding of hsp-90 show many similarities with the properties of the 70-kDa heat shock proteins (hsp-70) and the related dnaK protein of *E. coli*. The hsp-70 family is highly conserved through evolution and displays an ATP binding consensus sequence similar to that of hsp-90. Likewise, the dnaK protein, which is highly homologous with the eukaryotic hsp-70 proteins, possesses a similar ATP binding sequence and is also able to autophosphorylate itself (41–43). Autophosphorylation of dnaK has properties almost identical to those we have observed for hsp-90. Both hsp-90 and dnaK have similar metal ion dependence for autophosphorylation with  $\text{Ca}^{2+} > \text{Mn}^{2+} \gg \text{Mg}^{2+}$  (43). The concentration dependence of the autophosphorylation with  $\text{Ca}^{2+}$  is also similar (41, 43). Both proteins display a remarkable heat stability being still significantly active even after a treatment at 95 °C (41–43) both hsp-90 and the dnaK protein are able to utilize GTP as a substrate (41), and the overall fraction of the protein being autophosphorylated is similar, about 1–4% (41). The analogy, however, is not complete. hsp-90 autophosphorylates predominantly on serine, whereas dnaK phosphorylates on threonine. dnaK protein also possesses an ATPase activity which we could not detect in hsp-90. This latter difference might be anticipated by analyzing the primary structures of the two proteins. The ATPase activity of the dnaK protein has been found to be associated with its highly conserved amino-terminal portion which shows no homology whatever with hsp-90 (44).

One attractive hypothesis for a physiological function of hsp-90-associated kinase activity would relate to the association of hsp-90 with various steroid hormone receptors. Most steroid hormone receptors are multiply phosphorylated on serin residues, and hsp-90 is a component of the “nontransformed” (8 S) form of steroid receptors which is observed in the absence of ligand binding (2–5). About 10 years ago a calcium-dependent protein kinase activity was also reported

TABLE IV  
ATP binding sequences of hsp-90 and related proteins

Protein	Residues	Sequence <sup>a</sup>
Type A sequence <sup>b</sup>		
Consensus sequence (34, 35) <sup>c</sup>		<b>A/G-X-X-X-X-G-K-T/S-X-X-X-X-X-X-I/V</b>
Rat hsp-70 (36)	131–144	<b>A-E-A-Y-L-G-K-T---V-T-N-A-V---V</b>
<i>E. coli</i> dnaK (37)	127–140	<b>A-E-D-Y-L-G-E-P---V-T-E-A-V---V</b>
	41–54	<b>A-Y-T-Q-D-G-E-T---L-V-G-Q-P-A</b>
Murine hsp-90- $\alpha$ (33)	534–549	<b>L-K-E-F-E-G-K-T---L-V-S-V-T-K-E-G</b>
hsp-90- $\beta$ (33)	526–541	<b>L-K-E-F-D-G-K-S---L-V-S-V-T-K-E-G</b>
Type B sequence <sup>b</sup>		
Consensus sequence (34, 35)		<b>H/R/K- - - X<sub>(5-8)</sub> - - - <math>\phi</math>-X-<math>\phi</math>-<math>\phi</math>-D/E<sup>d</sup></b>
Rat hsp-70 (36)	56–69	<b>K-N-Q-V-A-M-N-P-T-N-T-V-F-D</b>
	187–199	<b>K-K-V-G-A-E-R-N---V-L-I-F-D</b>
	387–395	<b>K-S-G-N-V-Q-D- - - - L-L-L-L-D</b>
<i>E. coli</i> dnaK (37)	84–98	<b>R-D-V-S-I-M-P-F-K-I-I-A-A-D</b>
	151–164	<b>R-Q-A-T-K-D-A-G-R-I-A-G-L-E</b>
	447–460	<b>R-A-A-D-N-K-S-L-G-Q-F-N-L-D</b>
Murine hsp-90- $\alpha$ (33)	363–373	<b>K-L-Y-V-R-R- - - - V-F-I-M-D</b>
	513–524	<b>R-K-H-G-L-E-V- - - - I-T-M-I-E</b>
hsp-90- $\beta$ (33)	354–364	<b>K-L-Y-V-R-R- - - - V-F-I-M-D</b>

<sup>a</sup> Gaps are marked with hyphens and consensus sequences are in boldface.

<sup>b</sup> “Type A” and “Type B” sequences denote the putative triphosphate and adenine binding sequences, respectively (34, 35).

<sup>c</sup> The numbers in parentheses denote the appropriate references.

<sup>d</sup> In the “Type B” consensus sequence “ $\phi$ ” stands for hydrophobic residues.

to be associated with the purified, nontransformed form of glucocorticoid and progesterone receptors (45–47), although subsequently one of these studies was retracted (48) and two other studies have shown no protein kinase activity associated with either the highly purified, “transformed” (4 S) form of the glucocorticoid receptor or with the associated 90-kDa protein (which turned out to be hsp-90 in the subsequent studies) (49, 50). Kost *et al.* (51) were also unable to show azido-ATP labeling of the progesterone receptor-associated hsp-90.

These latter observations seemingly contradict our results showing the autophosphorylation and azido-ATP binding of hsp-90. There are, however, several important differences between these studies and the current study. First, Sanchez and Pratt (49) and Hapgood *et al.* (50) studied the phosphorylation of hsp-90 primarily in the presence of  $Mg^{2+}$  which, under our assay conditions, does not support its activity. In their experiments using  $Ca^{2+}$  as divalent cation, molybdate was also present, and we find that molybdate inhibits the hsp-90-associated kinase activity (data not shown). Kost *et al.* (51) used  $Mn^{2+}$  as divalent cation in their experiments, a cation which moderately supports the azido-ATP binding and autophosphorylation of hsp-90. In these studies the source of the hsp-90 was from the nontransformed form of the steroid receptor complex, whereas in our studies hsp-90 was purified directly from liver cytosol. Since only a small fraction of hsp-90 undergoes autophosphorylation, it is also possible that this portion of the protein represents a different pool of hsp-90 from the one which has been dissociated from the steroid receptors. Furthermore, since prephosphorylation might enhance the autophosphorylation of hsp-90, it is possible that the hsp-90 derived from the nontransformed steroid receptor does not meet this condition. The dissociation of hsp-90 from steroid receptors and its autophosphorylation may be linked events. If this is indeed the case, then the *in vitro* autophosphorylation sites may already be occupied in the “steroid receptor-derived” hsp-90.

There are some correlations between the *in vitro* and *in vivo* phosphorylation of hsp-90 (2–5). Although autophosphorylation of hsp-90 *in vitro* requires relatively high concentrations of  $Ca^{2+}$ , histones (most probably the lysine-rich histone H1 and/or H2A) and protamine change the activation pattern in favor of  $Mg^{2+}$ . This raises the possibility that the autophosphorylation of hsp-90 might be linked to its association/encounter with other proteins, *e.g.* histones. This possibility is interesting since a portion of hsp-90 is found in the nucleus (52) which may be the place where steroid receptors dissociate from hsp-90 (52, 53). These considerations have led us to the hypothesis that histones may play a role in the dissociation of hsp-90 from steroid receptors which in turn may be linked with the autophosphorylation of hsp-90. To test this hypothesis, further studies are needed.

If hsp-90 is indeed a kinase, does it possess phosphotransferase activity or does it exclusively phosphorylate itself as has been suggested for the *ras* proteins (54)? Our preliminary experiments have thus far revealed no significant phosphorylation of histones, protamine, casein, phosphatidylcholine, Kempide, and angiotensin by hsp-90 (data not shown) and indicate that, if hsp-90 is a protein kinase, it must have a very limited substrate specificity. Our experiment showing no significant increase in the radioactive label after acidic gel electrophoresis argues against the formation of an acyl-phosphate intermediate which is a requirement in some phosphate transfer reactions. On the other hand the relatively high  $k_M$  of the reaction (which is similar to that of 3-phosphoglycerokinase, glycerol kinase, hexokinase, creatine kinase, or nucleotide

kinases (55–59)) may suggest that hsp-90 phosphorylates substrates other than proteins.

In summary, our data indicate that hsp-90 possesses an autophosphorylating activity and a nucleotide binding site. This represents the first enzyme activity assigned to this abundant cellular polypeptide. Further studies of the autophosphorylation of hsp-90 may help us to understand the function of this protein in unstressed and stressed cells.

**Acknowledgments**—We would like to thank Dr. David O. Toft (Mayo Medical School, Rochester, MN), and Drs. Timothy Redmond and Michael J. Welsch (University of Michigan, Medical School, Ann Arbor, MI) for their kind gifts of anti-hsp-90 antibodies. P. C. is thankful to Dr. Kazunori Yamada for his help in the phosphoamino acid analysis and to Dr. Steve Shoelson for useful discussions.

## REFERENCES

- Lindquist, S. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 1151–1191
- Burdon, R. H. (1986) *Biochem. J.* **240**, 313–324
- Subject, J. R., and Shyy, T. (1986) *Am. J. Physiol.* **250**, C1–C17
- Lindquist, S., and Craig, E. A. (1988) *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631–677
- Hardesty, B., and Kramer, G. (1989) *Biochem. Cell Biol.* **67**, 749–750
- Walker, A. I., Hunt, T., Jackson, R. J., and Anderson, C. W. (1985) *EMBO J.* **4**, 139–145
- Dougherty, J. J., Rabideau, D. A., Iannotti, A. M., Sullivan, W. P., and Toft, D. O. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **927**, 74–80
- Rose, D. W., Wettenthal, R. E. H., Kudlicki, W., Kramer, G., and Hardesty, B. (1987) *Biochemistry* **26**, 6583–6587
- Oppermann, H., Levinson, W., and Bishop, J. M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 1067–1071
- Lipsich, L. A., Cutt, J. R., and Brugge, J. S. (1982) *Mol. Cell. Biol.* **2**, 875–880
- Adkins, B., Hunter, T., and Sefton, B. M. (1982) *J. Virol.* **43**, 448–455
- Ziemiecki, A., Catelli, M., Joab, I., and Moncharmont, B. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**, 1298–1307
- Koyasu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., Matsuzaki, F., Iida, K., Harada, F., Kasuga, M., Sakai, H., and Yahara, I. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 8054–8058
- Nishida, E., Koyasu, S., Sakai, H., and Yahara, I. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 16033–16036
- Sanchez, E. R., Redmond, T., Scherrer, L. C., Bresnick, E. H., Welsh, M. J., and Pratt, W. B. (1988) *Mol. Endocrinol.* **2**, 756–760
- Brugge, J., Yonemoto, W., and Darrow, D. (1983) *Mol. Cell. Biol.* **3**, 9–19
- Sullivan, W. P., Vroman, B. T., Bauer, V. J., Puri, R. K., Riehl, R. M., Pearson, G. R., and Toft, D. O. (1985) *Biochemistry* **24**, 4214–4222
- Lyall, R. M., Zilberstein, A., Gazit, A., Gilon, C., Levitzki, A., and Schlessinger, J. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 14503–14509
- Yonezawa, N., Nishida, E., Sakai, H., Koyasu, S., Matsuzaki, F., Iida, K., and Yahara, I. (1988) *Eur. J. Biochem.* **177**, 1–7
- Lees-Miller, S. P., and Anderson, C. W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 2431–2437
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
- Cooper, J. A., Sefton, B. M., and Hunter, T. (1983) *Methods Enzymol.* **99**, 387–402
- Shacter, E. (1984) *Anal. Biochem.* **138**, 416–420
- Twining, S. S. (1984) *Anal. Biochem.* **143**, 30–34
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Carlsson, L., and Lazarides, E. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 4664–4668
- Hathaway, G. M., and Traugh, J. A. (1982) *Curr. Top. Cell. Regul.* **21**, 101–127
- Hara, T., Takahashi, K., and Endo, H. (1981) *FEBS Lett.* **128**, 33–36
- Fujitaki, J. M., and Smith, R. A. (1984) *Methods Enzymol.* **107**, 23–36
- Resch, M. D. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 6978–6986
- Bond, J. S., and Butler, P. E. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 333–364
- Huang, K.-P., Chan, K.-F. J., Singh, T. J., Nakabayashi, H., and Huang, F. L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 12134–12140



33. Moore, S. K., Kozak, C., Robinson, E. A., Ullrich, S. J., and Appella, E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 5343–5351
34. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. (1982) *EMBO J.* **1**, 945–951
35. Chin, D. T., Goff, S. A., Webster, T., Smith, T., and Goldberg, A. L. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11718–11728
36. O'Malley, K., Hauron, A., Barchas, J. D., and Kedes, L. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3476–3483
37. Bardwell, J. C. A., and Craig, E. A. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 848–852
38. Dever, T. E., Glynnias, M. J., and Merrick, W. C. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 1814–1818
39. Szyszka, R., Kramer, G., and Hardesty, B. (1989) *Biochemistry* **28**, 1435–1438
40. Edelman, A. M., Blumenthal, D. K., and Krebs, E. G. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 567–613
41. Cegielska, A., and Georgopoulos, C. (1989) *Biochimie* **71**, 1071–1077
42. Zylicz, M., LeBowitz, J. H., McMacken, R., and Georgopoulos, C. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 6431–6435
43. Dalie, B. L., Skaleris, D. A., Koehle, K., Weissbach, H., and Brot, N. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 1284–1292
44. Cegielska, A., and Georgopoulos, C. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 21122–21130
45. Garcia, T., Tuohimaa, P., Mester, J., Buchou, T., Renoir, J., and Baulieu, E. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**, 960–965
46. Singh, V. B., and Moudgil, V. K. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**, 1067–1073
47. Miller-Diener, A., Schmidt, T. J., and Litwack, G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 4003–4007
48. Garcia, T., Buchou, T., Renoir, J., Mester, J., and Baulieu, E. (1986) *Biochemistry* **25**, 7937–7942
49. Sanchez, E. R., and Pratt, W. B. (1986) *Biochemistry* **25**, 1378–1382
50. Hapgood, J. P., Sabbatini, G. P., and von Holt, C. (1986) *Biochemistry* **25**, 7529–7534
51. Kost, S. L., Smith, D. F., Sullivan, W. P., Welch, W. J., and Toft, D. O. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 3829–3838
52. Gasc, J., Renoir, J., Faber, L. E., Delahaye, F., and Baulieu, E. (1990) *Exp. Cell Res.* **186**, 362–367
53. Baulieu, E. (1987) *J. Cell. Biochem.* **35**, 161–174
54. Shih, T. Y., Papageorge, A. G., Stokes, P. E., Weeks, M. O., and Scolnick, E. M. (1980) *Nature* **287**, 686–691
55. Scopes, R. K. (1973) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed) Vol. 8, pp. 335–352, Academic Press, Orlando, FL
56. Watts, D. C. (1973) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed) Vol. 8, pp. 384–432, Academic Press, Orlando, FL
57. Thorner, J. W., and Paulus, H. (1973) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed) Vol. 8, pp. 487–505, Academic Press, Orlando, FL
58. Colowick, S. P. (1973) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed) Vol. 9, pp. 1–48, Academic Press, Orlando, FL
59. Anderson, E. P. (1973) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed) Vol. 9, pp. 49–96, Academic Press, Orlando, FL

## ATP Induces a Conformational Change of the 90-kDa Heat Shock Protein (hsp90)\*

(Received for publication, August 7, 1992)

Péter Csermely†, Judit Kajtár§, Miklós Hollósi§, George Jalsovszky¶, Sándor Holly¶, C. Ronald Kahn||, Péter Gergely, Jr.‡, Csaba Söti‡, Katalin Mihály‡, and János Somogyi‡

From the ‡Institute of Biochemistry I, Semmelweis University, School of Medicine, H-1444 Budapest, Hungary, the §Department of Organic Chemistry, Eötvös University, H-1518 Budapest, Hungary, the ¶Central Research Institute of Chemistry, Hungarian Academy of Sciences, H-1525 Budapest, Hungary, and the ||Research Division, Joslin Diabetes Center, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215

The 90-kDa heat shock protein (hsp90) is a well conserved, abundant cytosolic protein believed to be a "chaperone" of most steroid receptors. We have recently demonstrated that hsp90 has an ATP-binding site and autophosphorylating activity (Csermely, P., and Kahn, C. R. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 4943–4950). Circular dichroism analysis of highly purified hsp90 from rat liver shows that ATP induces an increase of  $\beta$ -pleated sheet content of hsp90. Vanadate, molybdate, and heat treatment at 56 °C induce a similar change in the circular dichroism spectrum. Fourier transformed infrared spectroscopy reveals an ATP-induced increase in the interchain interactions of the 90-kDa heat shock protein due to an increase in its  $\beta$ -pleated sheet content. In further studies we found that ATP: 1) decreases the tryptophan fluorescence of hsp90 by  $11.6 \pm 1.9\%$ ; 2) increases the hydrophobic character of the protein as determined by its distribution between an aqueous phase and phenyl-Sepharose; and 3) renders hsp90 less susceptible to tryptic digestion. Our results suggest that hsp90 undergoes an "open  $\rightarrow$  closed" conformational change after the addition of ATP, analogous in many respects to the similar changes of the DnaK protein, the immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP/GRP78), and hsp70. The ATP-induced conformational change of hsp90 may be important in regulating its association with steroid receptors and other cellular proteins.

Exposure of cells to a wide variety of environmental perturbations stimulates the synthesis of a group of polypeptides known as the heat shock (stress) proteins (1–3). The heat shock proteins are usually classified on the basis of their approximate molecular masses and degrees of homology. One class is composed of proteins with molecular sizes between 105 and 80 kDa; members of the second and most highly conserved group have molecular sizes of approximately 70 kDa; the third class consists of heat shock proteins with molecular sizes around 60 kDa; and there is a fourth group of "small" heat shock proteins with molecular masses ranging

between 6 and 30 kDa (4). Most stress proteins are also synthesized constitutively in significant amounts under normal, nonstressed conditions. This raises the possibility that heat shock proteins play an important role in the physiology of normal cells.

Recent studies indicate that members of the 60- and 70-kDa heat shock protein "families" cooperate in facilitating the transport of proteins across membranes of the endoplasmic reticulum and mitochondria (5, 6). The 90-kDa heat shock protein (hsp90),<sup>1</sup> is an abundant cytosolic protein believed to act as a "chaperone" by binding to nascent steroid receptors and preventing their premature association with DNA (2–4, 7, 8). hsp90 also modulates the activity of pp60<sup>src</sup> and the initiation factor-2 kinase (9, 10) and binds to actin and tubulin, which raises the possibility of an *in vivo* interaction with the microfilamental and microtubular network (11, 12). Despite this information, the exact function of hsp90 is not completely understood.

In an earlier study we demonstrated that hsp90 possesses an ATP-binding site and the ability to phosphorylate itself on serine residue(s) (13) analogous in many respects to the similar structure and activity of the 70-kDa heat shock proteins (14–16). Recently, an ATP-induced conformational change of the DnaK protein (17, 18) and the 70-kDa heat shock protein (19) has been reported. These findings raised the possibility that hsp90 undergoes similar changes in its secondary and tertiary structure after the addition of ATP. In the present paper, we verified this hypothesis using circular dichroism and Fourier transform infrared spectroscopies as well as the analysis of tryptophan fluorescence, hydrophobic character, and limited proteolysis of hsp90.

### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals**—The chemicals used for polyacrylamide gel electrophoresis were from Bio-Rad. Butyl-Sepharose 4B, DEAE-Sepharose Fast Flow, phenyl-Sepharose 4B, and Sepharose S-200 were purchased from Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Uppsala, Sweden). Spectragel HA hydroxyapatite resin was from Spectrum Medical (Los Angeles, CA). Anti-hsp90 antibody (AC-88) was purchased from StressGen (Victoria, B. C., Canada). TPCK-trypsin was purchased from Worthington. ATP $\gamma$ S was from Boehringer Mannheim. 8-Azido-[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP (366 GBq/mmol) was from ICN Biomedicals Inc. (Irvine, CA). All other chemicals used were from Sigma.

**Isolation of hsp90**—The 90-kDa heat shock protein was isolated

\* This work was supported by Hungarian Academy of Sciences Grants OTKA-T5534 and OTKA-1089, Hungarian Ministry of Social Welfare Grant ETT-202/91, National Institutes of Health (NIH) Grant DK 33201, NIH Grant DK 36836 for the Joslin Diabetes and Endocrinology Research Center, and by the Marilyn M. Simpson Research Program in Diabetes. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: hsp90, 90-kDa heat shock protein; DnaK, the hsp70 homolog of *E. coli*; FT-IR, Fourier transform infrared; grp78, the immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP); hsp56/59, 56–59-kDa heat shock protein; hsp70, 70-kDa heat shock protein and its constitutive homolog, hsc70; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; TPCK, *N*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone; ATP $\gamma$ S, adenosine 5'-O-(thiotriphosphate).



from livers of 2–3-month-old male Sprague-Dawley rats using the method of Yonezawa *et al.* (20) as described earlier (13). The purity of this preparation was higher than 95% (usually higher than 98%) as judged by densitometry of Coomassie Blue-stained SDS slab gels (21). Protein concentrations were determined using the methods of Lowry *et al.* (22), Bradford (23), and Udenfriend *et al.* (24) with bovine serum albumin and globulin as standards. We got the highest value with the Bradford/serum globulin method/standard pair, whereas the protein concentration using the Udenfriend method with bovine serum albumin was five times lower. Finally, we calculated and used the mean of all protein determinations getting a factor of  $0.57 \pm 0.18$  with respect to the values of the Bradford/serum globulin method/standard pair.

**Covalent Labeling of hsp90 with 8-Azido-[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP**—Covalent labeling of hsp90 was performed as described earlier (13). 5  $\mu$ g of hsp90 was preincubated with 4  $\mu$ M (1  $\mu$ Ci) 8-azido-[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP in the dark in separate wells of a 96-well microtiter plate at 4 °C for 15 min in a buffer containing 50 mM Hepes pH 7.4 and 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . The reaction mixture was irradiated with a 100-watt long wavelength UV lamp (Black Ray, UVP Inc., San Gabriel, CA) for 5 min at 4 °C from a distance of 10 cm. Samples were transferred to Eppendorf microcentrifuge tubes containing 30  $\mu$ l of Laemmli buffer (21) supplemented with 10 mM EDTA and 20 mM dithiothreitol, boiled for 5 min, and analyzed by SDS-PAGE (21) and autoradiography. The radioactivity of the hsp90 bands was quantitated by densitometry of the autoradiograms.

**Circular Dichroism Measurements**—Circular dichroism (CD) spectra were recorded on a Jobin Yvon VI dichrograph. Measurements were made at room temperature in a 0.01-cm pathlength cylindrical quartz cell. The concentration of the samples was 0.3–0.5 mg of hsp90/ml in 50 mM Hepes pH 7.4 buffer. Base lines were obtained using protein-free buffer solution with the appropriate additions. The ligands were introduced from stock solution (200 $\times$  concentrated), and their equilibration was facilitated with gentle agitation for approximately 1 min. Longer incubation did not cause any further difference in the CD spectra. Mean residue ellipticities were calculated based on a mean residue molecular mass of 110 kDa. The CD spectra were analyzed by the method of Provencher (25, 26) as a linear combination of the CD spectra (from 195 to 240 nm) of 16 proteins whose secondary structures are known from x-ray crystallography. Secondary structure of hsp90 was also estimated by the predictive methods of Chou and Fasman (27) and Garnier *et al.* (28) using the amino acid sequence of murine hsp90 (29).

**Fourier Transform Infrared Spectroscopy**—Fourier transform infrared (FT-IR) spectra were recorded on a Nicolet 170SX spectrometer (MCT detector, Ge/KBr beam splitter) using a demountable cell with a spacing of  $\sim 50$   $\mu$ m. For each spectrum, 1024 interferograms were averaged and Fourier transformed to yield FT-IR spectra with a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . The spectrum of the buffered  $\text{D}_2\text{O}$  medium was digitally subtracted, and absorptions due to water vapor were removed in the same manner. In order to separate instrumentally unresolvable infrared band contours, Fourier self-deconvolution was applied to the spectra using 15  $\text{cm}^{-1}$  bandwidth and a resolution enhancement factor of 2.0.

**Fluorescence Measurements**—Fluorescence measurements were carried out in a Perkin-Elmer Cetus Instruments LS 50 spectrofluorometer at 37 °C. The tryptophan fluorescence of hsp90 was measured by using an excitation wavelength of 295 nm and an emission wavelength of 330 nm, with 5-nm slit widths. Samples were measured in 1-cm rectangular quartz cuvettes in 2 ml of 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, at a protein concentration of 0.1 mg/ml. Fluorescence values are expressed as percentage of total hsp90 fluorescence obtained after subtracting the background light intensity measured with the Tris buffer alone. Changes of tryptophan fluorescence have been corrected to the absorption of various ligands at 295 and 330 nm using the formula,

$$I = I_0 e^{-d(E_1 + E_2)/2} \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $I$  and  $I_0$  are light intensities after and before the addition of the appropriate ligands, respectively;  $d$  is 0.5 cm; and  $E_1$  and  $E_2$  are the absorbances of the ligands at 295 and 330 nm, respectively. The necessary correction of fluorescence data was never higher than 0.1% of the total fluorescence.

**Binding of hsp90 to Phenyl-Sepharose**—Binding of hsp90 to phenyl-Sepharose was determined according to Yamamoto *et al.* (30). 25  $\mu$ g of purified rat liver hsp90 in 60  $\mu$ l of binding buffer containing 50 mM Hepes pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.2 mM dithiothreitol, 10 mM

$\text{CaCl}_2$ ,  $\pm 2.5$  mM ATP; and various concentrations of ethylene glycol were added to a 30- $\mu$ l suspension of phenyl-Sepharose gel equilibrated with the same buffer. Samples were incubated at 10 °C for 12 min. The suspension was centrifuged at 6000 rpm for 1 min, and the supernatant was analyzed by SDS-PAGE (21). The amount of hsp90 was quantitated by densitometry of Coomassie Blue-stained gels on a Pharmacia Ultrosan XL laser densitometer using a standard curve of known amounts of hsp90.

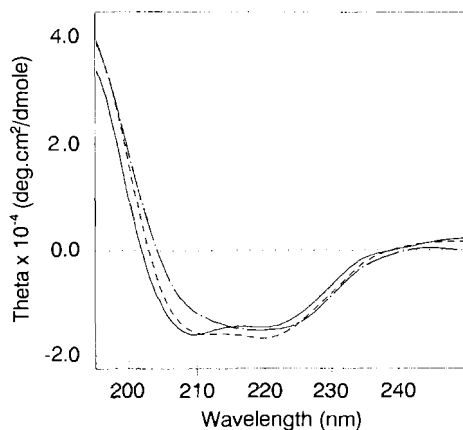
**Limited Proteolysis of hsp90**—Trypsin digestion pattern of hsp90 was analyzed after Lees-Miller and Anderson (31). 15  $\mu$ g of hsp90 was incubated with 0.1  $\mu$ g of TPCK-treated trypsin in the presence of 20 mM Hepes pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5% (v/v) glycerol, 1 mM dithiothreitol,  $\pm 2.5$  mM ATP at 37 °C for the times indicated. Digestion was stopped by the addition of 10  $\mu$ g of trypsin inhibitor, and the tryptic fragments were visualized by SDS-PAGE (21).

## RESULTS

**Effect of ATP on the Circular Dichroism of hsp90**—CD spectrum of hsp90 showed an ellipticity maximum below 195 nm and two negative bands at 210 and 220 nm (Fig. 1). In the 200–270-nm range, the CD spectrum of hsp90 in 50 mM Hepes pH 7.4 was not significantly different from that measured in solutions with a strongly decreased buffer concentration (data not shown). Comparison of CD spectra at various buffer concentrations revealed that due to the intensive absorbance of the Hepes buffer there is a  $\pm 20\%$  error in the magnitude and position of the positive band of the spectra below 195 nm.

While the addition of  $\text{MgCl}_2$  and ATP at final concentrations of 10 and 0.5 mM, respectively, caused only slight changes in the shape of the spectrum, the effect of Ca-ATP was significant, giving rise to one single negative band at 219 nm (Fig. 1). Thus ATP induced a positive contribution to the overall ellipticity of hsp90 in the region of 195–220 nm. Control experiments showed no significant change in the CD spectrum of hsp90 if  $\text{MgCl}_2$  or  $\text{CaCl}_2$  was added alone. Ca-ATP $\gamma$ S induced changes similar to those of Ca-ATP in the CD spectrum of hsp90 (data not shown); thus the change in CD spectrum does not require the autophosphorylation of hsp90.

The analysis of CD spectra of hsp90 gave an average composition of 36%  $\alpha$ -helix and 46%  $\beta$ -structure (Table I). The relative contribution of  $\beta$ -structure increased to 65% after ATP addition, whereas the  $\alpha$ -helical content was essentially unchanged. Comparison of our experimental data with those



**FIG. 1. Effect of ATP on the circular dichroism of hsp90.** Circular dichroism spectra of hsp90 were recorded in the absence (solid line) or presence of 0.5 mM ATP and 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (alternating dots and dashes) or 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (dashed line) as described under "Materials and Methods." Spectra are representatives of three separate experiments.

TABLE I  
Secondary structure of hsp90

Calculation of secondary structure from CD spectra and its prediction from the primary structure of murine hsp90 (29) was done as described under "Materials and Methods." The numbers in parentheses denote the corresponding references.

	Contribution to secondary structure	
	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Structure
	%	%
Experimental data		
hsp90	36	46
+ ATP	33	65
hsp70 (48)	40	40
Predicted values		
Chou-Fasman method (27)	37	26
Garnier method (28)	59	16
Chicken hsp90 (65)	58	11

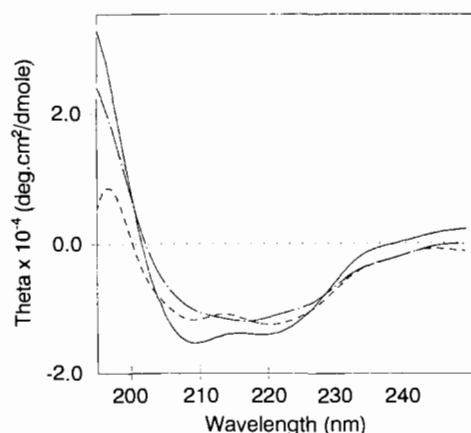


FIG. 2. Effect of heat treatment on the circular dichroism of hsp90. hsp90 was subjected to heat treatment by incubating in 50 mM Hepes buffer pH 7.4 at 56 °C for 15 min and cooling to room temperature within 3 min. Circular dichroism spectra of hsp90 were recorded before (solid line), immediately after (alternating dots and dashes), and 60 min after (dashed line) the heat treatment as described under "Materials and Methods." Spectra are representatives of three separate experiments.

of hsp70 and with the predicted secondary structure of hsp90 revealed a similar  $\alpha$ -helical content and a slightly higher amount of  $\beta$ -structures. The difference in the amount of  $\beta$ -structures may arise both from the uncertainties of the determinations/predictions and from a possible thermodynamical unstability of hsp90, a molecular chaperone putatively involved in the unfolding/refolding of other proteins.

**Effect of Temperature Change on the Circular Dichroism of hsp90**—Since hsp90 is a heat shock protein and it displays temperature-induced changes in its hydrophobicity and self-aggregation around 40–45 °C (30, 32), we examined whether the elevation of the temperature resulted in any change in the CD spectrum of the protein. To avoid the distortion of the cells due to temperature differences, hsp90 was heated at 56 °C for 15 min in separate Eppendorf tubes, and the samples were rapidly cooled to room temperature before analysis. Heat treatment of hsp90 induced changes in its CD spectrum similar to those observed after the addition of Ca-ATP (cf. Figs. 1 and 2). The effect was at least partially reversible since leaving the samples at room temperature for 60 min partially restored the original, double-lobed negative peak at 210 and 220 nm (Fig. 2).

**Effect of Vanadate and Molybdate on the Binding of Azido-ATP to hsp90 and on the CD Spectrum of the Protein—**

Molybdate and vanadate are known to stabilize the steroid receptor-hsp90 complex (33, 34). Since both ions are transition state analogs of phosphate (35, 36) and since hsp90 has an ATP-binding site (13), we wanted to examine whether molybdate and vanadate modulate the binding of ATP to hsp90. Indeed, both anions inhibited the affinity labeling of hsp90 by azido-ATP (Fig. 3). Molybdate had a half-maximal effect around 0.5 mM, whereas vanadate was more efficient, having an ED<sub>50</sub> around 50  $\mu$ M (Fig. 3).

After verifying that molybdate and vanadate are good inhibitors of ATP binding to hsp90, we analyzed whether these anions induced any change in the secondary structure of the protein by examining the CD spectra of hsp90 in the absence and presence of molybdate and vanadate. Vanadate induced a similar change in the CD spectrum of hsp90 similar to that induced by Ca-ATP or heat treatment (cf. Figs. 1, 2, and 4). The effect of molybdate at 10 mM final concentration was similar to that of 0.1 mM vanadate, whereas 0.5 mM molybdate did not induce any significant changes in the CD spectrum of

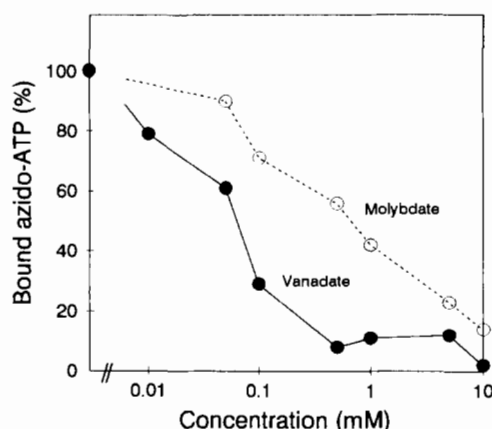


FIG. 3. Effect of vanadate and molybdate on azido-ATP binding to hsp90. 5  $\mu$ g of hsp90 was labeled with 4  $\mu$ M azido-[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP in the presence of 10 mM CaCl<sub>2</sub> and various concentrations of sodium molybdate (open circles) and sodium vanadate (filled circles) by illuminating with UV light for 5 min at 4 °C as described under "Materials and Methods." Samples were subjected to SDS-PAGE and autoradiography. The amount of bound azido-ATP was calculated by densitometric analysis of the hsp90 band in autoradiograms with or without vanadate or molybdate. Data are means of two separate experiments.

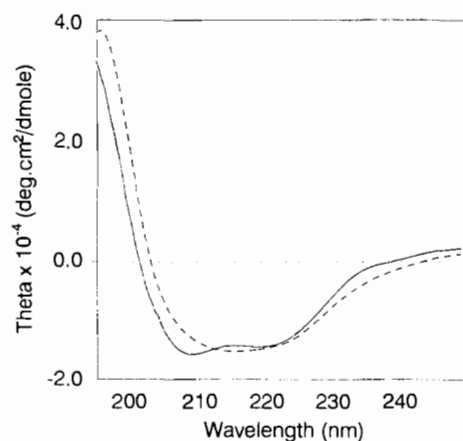
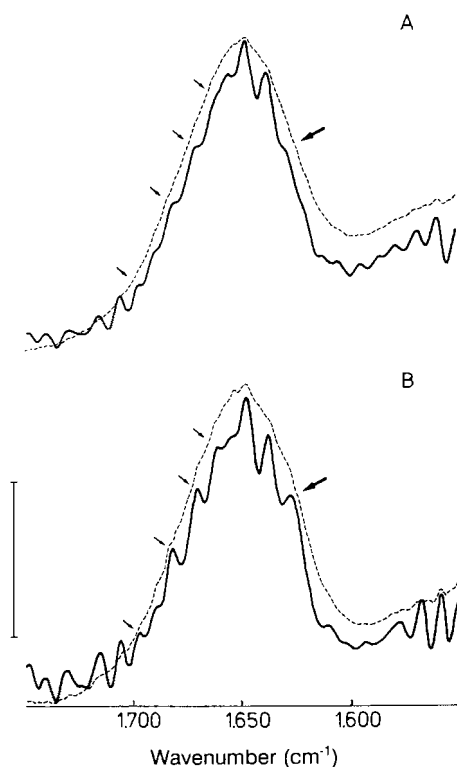


FIG. 4. Effect of vanadate on the circular dichroism of hsp90. Circular dichroism spectra of hsp90 were recorded in the absence (solid line) or presence of 0.1 mM sodium vanadate (dashed line) as described under "Materials and Methods." Spectra are representatives of three separate experiments.



hsp90 (data not shown). In the experiments with vanadate, attention was paid to avoid even a transient acidification of the samples that would cause the accumulation of the kinetically stable decavanadate species distorting the CD measurements due to its high absorbance (bright yellow color; Ref. 37).

**Effect of ATP on the Fourier Transform Infrared Spectrum of hsp90**—The high absorbance of water in the amide I region hides the subtle differences of FT-IR spectra induced by conformational changes in the protein backbone. Therefore, we analyzed the Fourier transform infrared spectrum of hsp90 in D<sub>2</sub>O. hsp90 displayed a similar autophosphorylation pattern in the presence of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Mg<sup>2+</sup> + histone H1 in D<sub>2</sub>O medium and in H<sub>2</sub>O indicating that deuteration is unlikely to cause significant changes in the ATP-related functioning of hsp90 (data not shown). The interpretation of spectral changes in the amide II band is difficult in D<sub>2</sub>O, since the extent of hydrogen to deuterium exchange varies with the residual amount of water in different samples inducing larger absorbance differences in this section of the spectrum than in the amide I region. Therefore, the analysis was restricted to the amide I band in these samples. In Fig. 5, the amide I band of the FT-IR spectrum of hsp90 is shown before and after the addition of Ca-ATP (dashed lines in panels A and B, respectively). The solid lines represent the same FT-IR spectra after Fourier deconvolution using a bandwidth of 15 cm<sup>-1</sup> and a resolution enhancement factor of 2.0. Addition of ATP induces a significant increase at 1625–1627 cm<sup>-1</sup> and



**FIG. 5. Effect of ATP on the Fourier transform infrared spectrum of hsp90.** Rat liver hsp90 was equilibrated with a Hepes-buffered solution of D<sub>2</sub>O by repeated cycles of dilution/concentration using a Centricon 30 concentrator. FT-IR spectra of hsp90 were recorded in the absence (panel A) and presence (panel B) of 0.5 mM ATP and 5 mM CaCl<sub>2</sub> as described under "Materials and Methods." Solid lines represent the same FT-IR spectra after Fourier deconvolution using 15 cm<sup>-1</sup> bandwidth and a resolution-enhancing factor of 2.0. Arrows indicate changes in the spectrum after addition of ATP. Vertical bar denotes an absorbance of 0.1. Spectra are representatives of three separate experiments.

several less pronounced changes at 1660, 1670, 1680, and 1695 cm<sup>-1</sup>. In control experiments, the addition of CaCl<sub>2</sub> alone did not induce any significant changes in the FT-IR spectrum of hsp90 (data not shown).

**Effect of ATP on the Tryptophan Fluorescence of hsp90**—Murine hsp90 contains 4 tryptophan and 23 tyrosine residues (29). At the 295/330 excitation/emission wavelength pair, however, the only significant contribution to the intrinsic fluorescence comes from the tryptophan residues (38). Since tryptophan fluorescence is a sensitive marker of the conformational changes of proteins (38), we examined whether ATP induces any change in this property of hsp90. Indeed, addition of ATP resulted in a large decrease in the intrinsic fluorescence of hsp90 similarly to that of the DnaK protein (Fig. 6, panel A, trace a; Ref. 18). The ATP-induced decrease in tryptophan fluorescence could be repeatedly observed after several cycles of dialysis and ATP readdition (data not shown). The change of tryptophan fluorescence was almost identical if we used the nonhydrolyzable ATP analog, ATPγS (Fig. 6, panel A, trace b). ATP induces a similar decrease in tryptophan fluorescence at a final ATP concentration of 2.5 mM in the absence or presence of CaCl<sub>2</sub> or MgCl<sub>2</sub> (Table II). At lower ATP concentrations, however, the change in tryptophan fluorescence depended on the accompanying divalent cation with an apparent *K<sub>d</sub>* of 1.1 or 0.2 mM ATP in the presence of MgCl<sub>2</sub> or CaCl<sub>2</sub>, respectively (Fig. 6, panel B).

**Effect of ATP on the Hydrophobicity of hsp90**—ATP induced a small but significant (*p* < 0.1) increase in the binding of hsp90 to phenyl-Sepharose (Fig. 7). The ATP-induced differences increased with increasing concentration of ethylene glycol, a known modulator of interactions between hsp90 and phenyl-Sepharose (30). In control experiments, ATP did not cause any significant change in binding of bovine serum albumin to phenyl-Sepharose (data not shown). In contrast to these results, ATP diminished the binding of hsp90 to DNA-cellulose and cellulose.<sup>2</sup>

**ATP-induced Changes in the Tryptic Digestion Pattern of hsp90**—Since ATP induces significant changes in the tryptic digestion pattern of grp78 (16) and DnaK (17), we examined if there was any change in the limited proteolysis of hsp90 after ATP addition. In the absence of ATP, trypsin (4 μg/ml) produced a rapid proteolysis of hsp90 to fragments of 68–20 kDa. In the presence of ATP, hsp90 was less susceptible to tryptic digestion than in its absence (Fig. 8). Besides an ATP-induced increase in the amount of uncleaved hsp90, at later time points of tryptic digestion there was also an increase in the amount of peptide fragments c and d in the presence of ATP compared with control samples (Fig. 8). These latter changes may reflect a local protection of ATP around its binding site, which is located in tryptic fragments c and d (cf. Refs. 13, 29, and 31).

## DISCUSSION

The 90-kDa heat shock protein (hsp90) is present in most, if not all, prokaryotic and eukaryotic cells and may constitute up to 1–2% of the total cytosolic protein (4). hsp90 is associated with steroid receptors, hsp70, hsp56/59, actin, tubulin, and other yet unidentified proteins with molecular masses of 188, 63, and 50 kDa (7, 8, 11, 12, 39–42) and forms complexes with a number of protein kinases such as casein kinase II, double-stranded DNA-activated protein kinase, heme-regulated initiation factor-2 kinase, protein kinase C, and various tyrosine kinases (4, 9, 10, 43–47). Conformational changes of the 90-kDa heat shock protein may significantly influence its

<sup>2</sup> T. Schnaider and P. Csermely, unpublished observations.

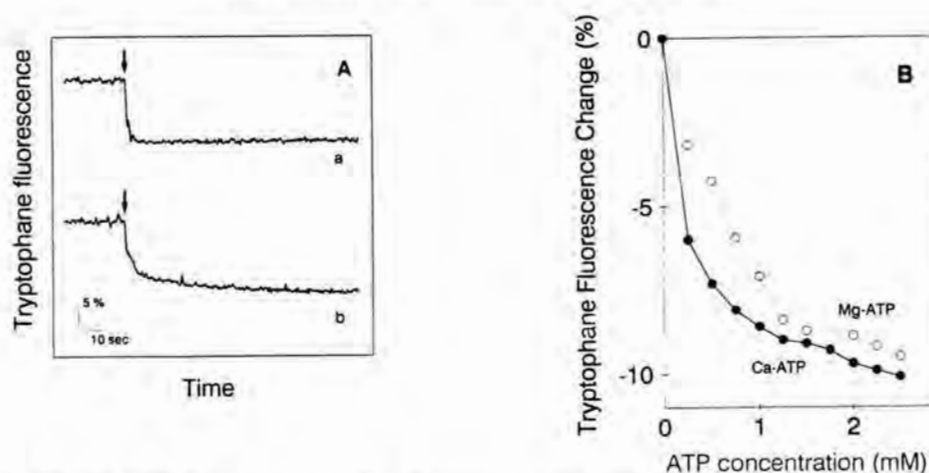


FIG. 6. Effect of ATP and ATP $\gamma$ S on the tryptophan fluorescence of hsp90. The intrinsic fluorescence of hsp90 was measured as described under "Materials and Methods." Panel A, fluorescence traces of hsp90 recorded in the presence of 5 mM CaCl<sub>2</sub>. At the arrow, ATP or ATP $\gamma$ S was added at a final concentration of 2.5 mM in curve a and b, respectively. Traces are representatives of five separate experiments. Panel B, hsp90 tryptophan fluorescence as a function of ATP concentration in the presence of 5 mM MgCl<sub>2</sub> (open circles) or CaCl<sub>2</sub> (filled circles). Data represent means of two experiments.

TABLE II

Changes of the tryptophan fluorescence of hsp90

Tryptophan fluorescence of hsp90 was measured as described under "Materials and Methods." The final concentrations of ATP or MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub> were 2.5 or 5 mM, respectively. Data are means  $\pm$  S.D. of five separate experiments.

Added compound	Fluorescence decrease at 295/330 nm %
ATP	11.6 $\pm$ 1.9
Mg-ATP	12.1 $\pm$ 1.3
Ca-ATP	12.8 $\pm$ 0.7

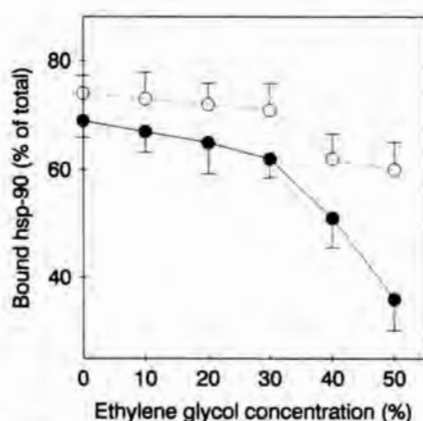


FIG. 7. Effect of ATP on binding of hsp90 to phenyl-Sepharose. Binding of hsp90 to phenyl-Sepharose was studied in the presence of ethylene glycol at concentrations indicated as described under "Materials and Methods." Open and filled circles represent data points in the presence or absence, respectively, of ATP at a final concentration of 2.5 mM. Data are means  $\pm$  S.D. of three separate experiments. Control values (0% ethylene glycol) represent means  $\pm$  S.D. of seven experiments.

interaction with the proteins mentioned above. In our earlier studies we demonstrated that hsp90 has an ATP-binding site and is able to phosphorylate itself (13). In the present paper we report that ATP is inducing significant changes in the secondary/tertiary structure of hsp90.

The CD spectrum of hsp90 shows a great similarity with the CD spectrum of the closely related hsp70 (19, 48). The ATP-induced overall spectral change reflects an enrichment

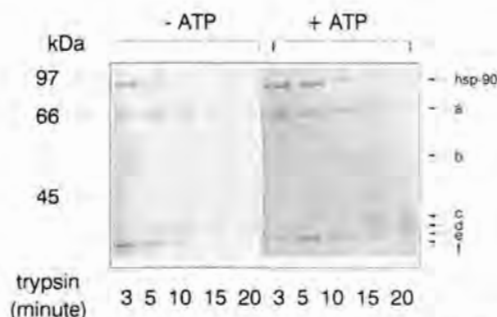


FIG. 8. Effect of ATP on the tryptic digestion pattern of hsp90. Limited proteolysis of rat liver hsp90 was performed in the absence or presence of ATP at a final concentration of 2.5 mM as described under "Materials and Methods." The tryptic digestion was stopped after the times indicated, and the samples were subjected to SDS-PAGE. The letters a-f denote tryptic fragments of hsp90 identified by Lees-Miller and Anderson (31). The Coomassie Blue-stained gel is a representative of five separate experiments.

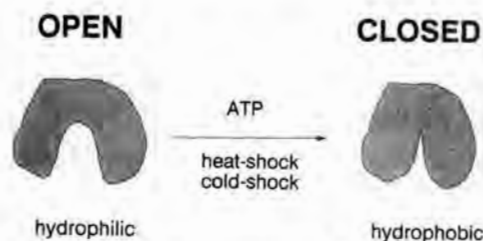


FIG. 9. ATP- and temperature-induced conformational changes of hsp90. The figure summarizes our present view about the shift of hsp90 from an open to a closed conformation after ATP addition or change in temperature. See details in text.

in  $\beta$ -structures (49) similar to the changes in the 1630–1620 and 1695–1660 cm<sup>-1</sup> regions of the FT-IR spectrum of hsp90 (50). Mg-ATP induces smaller changes in the CD spectrum of hsp90 than Ca-ATP. This difference may simply reflect that the 0.5 mM Mg-ATP used in these experiments was not enough to saturate hsp90, since tryptophan fluorescence data revealed that Mg-ATP has an approximately 5-fold higher apparent  $K_d$  than Ca-ATP. Unfortunately, the high UV absorbance of ATP did not permit the direct analysis of this assumption.



Heat treatment induces a conformational change of hsp90 similar to the effect of ATP. The CD spectrum of hsp90 displays almost identical changes with the CD spectrum of hsp70 after heat treatment (19). Palleros *et al.* (19) reported that the heat-induced conformational change of hsp70 parallels with its oligomerization. hsp90 is also known to form oligomers at higher temperatures (32). However, the oligomerization of hsp90 is strongly detergent-dependent (32), so it is not likely that oligomerization occurred in our detergent-free samples. This may explain why the temperature-induced changes in hsp90 conformation proved to be reversible in contrast to those reported for hsp70 (19). Interestingly, the temperature-induced conformational change of DnaK, the *Escherichia coli* hsp70 homologue, is also reversible and does not result in an oligomerization of the protein similar to hsp90 (18). Our results that the ATP-induced decrease in tryptophan fluorescence of hsp90 could be repeatedly observed after several cycles of dialysis and ATP readdition suggest that ATP also induces a reversible change in the conformation of hsp90. The reversal of the ATP-induced conformational change of hsp90 may also require the presence of other proteins.

The FT-IR spectrum of hsp90 shows a significant increase of the band at 1625–1627  $\text{cm}^{-1}$  after the addition of ATP. This region is characteristic of interchain interaction of  $\beta$ -pleated or extended peptide chains (50), which seem to increase in hsp90 after binding of ATP. Ethylene glycol affects the binding of hsp90 to phenyl-Sepharose much less in the presence than in the absence of ATP. Finally, ATP renders hsp90 less susceptible to tryptic digestion. These results may all reflect the fact that ATP induces a tighter folding, a change from open to closed conformation of hsp90. This conformational change is analogous with the "closure" of grp78 (BiP, the immunoglobulin heavy chain binding protein), hexokinase, and phosphoglycerokinase after addition of ATP (16, 51, 52). Interestingly, these proteins, together with the nucleotide-binding domain of hsp70 and actin, all have a bilobular, hinge-type three-dimensional structure, which is similar to the structure of hsp90 (11, 51–54). Hydrolysis of ATP induces an opposite, closed  $\rightarrow$  open conformational change of the *E. coli* hsp70 homolog, DnaK (18), which may be the reversal of the closure of hsp90 inducible by both ATP and the nonhydrolyzable ATP analog, ATP $\gamma$ S.

Fig. 9 summarizes the properties of the putative open and closed conformations of hsp90. Tryptic digestion and FT-IR data support the induction of a closed conformation by ATP. hsp90 is more hydrophobic in this conformation as revealed by its increased association with phenyl-Sepharose and its decreased binding to cellulose. CD data show that the closed conformation of hsp90 can be induced by heating the protein to 56 °C. The results of Yamamoto *et al.* (30) showing that hsp90 is indeed more hydrophobic at this extreme temperature fit well to the properties of the two hsp90 conformations detailed above.

Vanadate and molybdate also induce an enrichment of the secondary structure of hsp90 in  $\beta$ -strands. The effect is similar to the ATP-induced conformational change. Both anions inhibit the binding of azido-ATP to hsp90, which suggests a common mechanism of the observed changes in secondary structure. Molybdate and vanadate are potent stabilizers of the steroid receptor-hsp90 complex (33, 34). Their efficiency in stabilizing the untransformed steroid receptors parallels their half-maximal concentration in inhibiting the binding of azido-ATP to hsp90 and in inducing a conformational change of the 90-kDa heat shock protein, and in both cases vanadate is more potent than molybdate. Though the effects of molyb-

date on steroid receptors are attributed to its inhibitory action on various phosphatases, to a possible competition of molybdate for a nucleotide binding site on steroid receptors, and/or to complex formation between molybdate and SH groups of steroid receptors (33, 34, 55, 56), our findings raise the possibility that an interaction of molybdate and hsp90 may also play a role in the molybdate-induced stabilization of the nontransformed steroid receptor complex.

The effects of ATP on steroid receptors are more complex. On the one hand, ATP is known to increase the steroid binding capacity of the steroid receptor ("activation") (39, 40, 55, 57); on the other hand, ATP also induces the dissociation of the steroid receptor-hsp90-hsp70-hsp56/59 complex "transforming" the steroid receptor, thus enabling it to bind to DNA (39, 40, 55). The ATP-induced conformational change and autophosphorylation of hsp90 (13) may contribute to these effects of ATP on steroid receptors. A simple mechanism hypothesizing a role of hsp90 in the molybdate- and ATP-induced changes of steroid receptors, however, cannot be proposed yet, since molybdate and ATP have rather opposite effects on steroid receptors while they induce similar conformational changes of hsp90.

Proteins related to hsp70, such as grp78 (BiP), the immunoglobulin heavy chain binding protein, and DnaK, the hsp70 homolog of *E. coli*, and hsp70 itself require ATP for their function (15, 58–63). In our previous and present studies we demonstrated that hsp90 is similar to these proteins regarding its nucleotide-binding site, autophosphorylation, and ATP-induced conformational change (13–19, 64). This raises the possibility that interactions of hsp90 with ATP are important/necessary elements of the heretofore elusive function of hsp90.

**Acknowledgments**—We are thankful to Drs. Bonnie A. Wallace (Department of Crystallography, Birkbeck College, University of London), René Buchet (ETH, Zürich, Switzerland), and István Jóna (Central Research Laboratory, Medical University of Debrecen, Hungary) for help in evaluating the CD spectra, Fourier transform infrared spectra, and fluorometric data, respectively. We also thank Drs. Veronika Adam-Vizi and Zoltán Déri (Institute of Biochemistry II, Semmelweis University, School of Medicine, Budapest, Hungary) for the use of the Perkin-Elmer Cetus Instruments spectrofluorometer.

**Addendum**—After the submission of our manuscript, Bork *et al.* (66) gave further evidence for the bilobular, hinge-type structure of both sugar kinases and heat shock proteins, and Pratt and co-workers (67) demonstrated that molybdate and vanadate also stabilize the complex of hsp90 and pp60<sup>v-src</sup> similar to the stabilization of the hsp90-steroid receptor complex. This latter finding raises the possibility that hsp90 contains a binding site for molybdate and vanadate, which is in agreement with our findings, demonstrating a competition of these ions with ATP and their ability to induce a similar conformational change of hsp90 like ATP.

## REFERENCES

1. Lindquist, S. (1986) *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 1151–1191
2. Burdon, R. H. (1986) *Biochem. J.* **240**, 313–324
3. Subjeck, J. R., and Shyy, T. (1986) *Am. J. Physiol.* **250**, C1–C17
4. Lindquist, S., and Craig, E. A. (1988) *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631–677
5. Deshaies, R. J., Koch, B. D., Werner-Washburne, M., Craig, E. A., and Schekman, R. (1988) *Nature* **332**, 800–805
6. Chirico, W. J., Waters, M. G., and Blobel, G. (1988) *Nature* **332**, 805–810
7. Grover, A., Schweizer-Grover, G., Cadepond, F., Mariller, M. G., and Baulieu, E.-E. (1987) *Nature* **328**, 624–626
8. Denis, M., Poellinger, L., Wikström, A.-C., and Gustafsson, J.-A. (1988) *Nature* **332**, 686–688
9. Oppermann, H., Levinson, W., and Bishop, J. M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 1067–1071
10. Rose, D. W., Wettenhall, R. E. H., Kudlicki, W., Kramer, G., and Hardesty, B. (1987) *Biochemistry* **26**, 6583–6587
11. Koyasu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., Matsuzaki, F., Iida, K., Harada, F., Kasuga, M., Sakai, H., and Yahara, I. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 8054–8058
12. Sanchez, E. R., Redmond, T., Scherrer, L. C., Bresnick, E. H., Welsh, M. J., and Pratt, W. B. (1988) *Mol. Endocrinol.* **2**, 756–760
13. Csermely, P., and Kahn, C. R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4943–4950

14. Welch, W. J., and Feramisco, J. R. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1229–1236
15. Zylicz, M., LeBowitz, J. H., McMacken, R., and Georgopoulos, C. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 6431–6435
16. Kassenbrock, C. K., and Kelly, R. B. (1989) *EMBO J.* **8**, 1461–1467
17. Liberek, K., Showyra, D., Zylicz, M., Johnson, C., and Georgopoulos, C. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 14491–14496
18. Palleros, D. R., Reid, K. L., McCarty, J. S., Walker, G. C., and Fink, A. L. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 5279–5285
19. Palleros, D. R., Welch, W. J., and Fink, A. L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 5719–5723
20. Yonezawa, N., Nishida, E., Sakai, H., Koyashu, S., Matsuzaki, F., Iida, K., and Yahara, I. (1988) *Eur. J. Biochem.* **177**, 1–7
21. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
22. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275
23. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
24. Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimburger, W., and Weigle, M. (1972) *Science* **178**, 871–872
25. Provencher, S. W., and Glockner, J. (1981) *Biochemistry* **20**, 33–37
26. Provencher, S. W. (1982) *Comput. Physics Commun.* **27**, 229–242
27. Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1974) *Biochemistry* **13**, 222–245
28. Garnier, J., Osguthorpe, D. J., and Robinson, B. (1978) *J. Mol. Biol.* **120**, 97–120
29. Moore, S. K., Kozak, C., Robinson, E. A., Ullrich, S. J., and Appella, E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 5343–5351
30. Yamamoto, M., Takahashi, Y., Inano, K., Horigome, T., and Sugano, H. (1991) *J. Biochem. (Tokyo)* **110**, 141–145
31. Lees-Miller, S. P., and Anderson, C. W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 2431–2437
32. Lanks, K. W. (1989) *J. Cell. Physiol.* **140**, 601–607
33. Nishigori, H., and Toft, D. (1980) *Biochemistry* **19**, 77–83
34. Nielsen, C. J., Sando, J. J., Vogel, W. M., and Pratt, W. B. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 7568–7578
35. VanEtten, R. L., Waymack, P. P., and Rehkop, D. M. (1974) *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 6782–6785
36. Nechay, B. R., Nanninga, L. B., Nechay, P. S. E., Post, R. L., Grantham, J. J., Macara, I. G., Kubena, L. F., Phillips, T. D., and Nielsen, F. H. (1986) *Fed. Proc.* **45**, 123–132
37. Csermely, P., Martonosi, A., Levy, G. C., and Ejchart, A. J. (1985) *Biochem. J.* **230**, 807–815
38. Lakowitz, J. R. (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York
39. Renoir, J.-M., Radanyi, C., Faber, L. E., and Baulieu, E.-E. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10740–10745
40. Sanchez, E. R., Faber, L. E., Henzel, W. J., and Pratt, W. B. (1990) *Biochemistry* **29**, 5145–5152
41. Sanchez, E. R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 22067–22070
42. Perdew, G. H., and Whitelaw, M. L. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 6708–6713
43. Dougherty, J. J., Rabideau, D. A., Ianotti, A. M., Sullivan, W. P., and Toft, D. O. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **927**, 74–80
44. Walker, A. I., Hunt, T., Jackson, R. J., and Anderson, C. W. (1985) *EMBO J.* **4**, 139–145
45. Lipsich, L. A., Cutt, J. R., and Brugge, J. S. (1982) *Mol. Cell. Biol.* **2**, 875–880
46. Adkins, B., Hunter, T., and Sefton, B. M. (1982) *J. Virol.* **43**, 448–455
47. Ziemiecki, A., Catelli, M., Joab, I., and Moncharmont, B. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**, 1298–1307
48. Sadis, S., Raghavendra, K., and Hightower, L. E. (1990) *Biochemistry* **29**, 8199–8206
49. Woody, R. W. (1985) *The Peptides*, Vol. 7, Academic Press, Orlando, FL
50. Surewicz, W. K., and Mantsch, H. H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **952**, 115–130
51. Schwab, D. A., and Wilson, J. E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 2563–2567
52. Banks, R. D., Blake, C. C. F., Evans, P. R., Haser, R., Rice, D. W., Hardy, G. W., Merrett, M., and Phillips, W. (1979) *Nature* **279**, 773–777
53. Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C., and McKay, D. B. (1990) *Nature* **346**, 623–628
54. Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., and Holmes, K. C. (1990) *Nature* **347**, 37–44
55. Moudgil, V. K., and John, J. K. (1980) *Biochem. J.* **190**, 799–808
56. Meshinch, S., Matic, G., Hutchinson, K. A., and Pratt, W. B. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 11643–11649
57. Sando, J. J., La Forest, A. C., and Pratt, W. B. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 4772–4778
58. Dörner, A. J., Wasley, L. C., and Kaufman, R. J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 7429–7432
59. Alfano, C., and McMacken, R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 10699–10708
60. Alfano, C., and McMacken, R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 10709–10718
61. Hwang, D. S., Crooke, E., and Kornberg, A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 19244–19248
62. Beckmann, R. P., Mizzen, L. A., and Welch, W. J. (1990) *Science* **248**, 850–854
63. Lewis, M. J., and Pelham, H. R. B. (1985) *EMBO J.* **4**, 3137–3143
64. Leustek, T., Toledo, H., Brot, N., and Weissbach, H. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **289**, 256–261
65. Binart, N., Chambrud, B., Dumas, B., Rowlands, D. A., Bigogne, C., Levin, J. M., Garnier, J., Baulieu, E.-E., and Catelli, M.-G. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 140–147
66. Bork, P., Sander, C., and Valencia, A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7290–7294
67. Hutchinson, K. A., Stancato, L. F., Jove, R., and Pratt, W. B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 13952–13957



## Insulin Induces the Phosphorylation of DNA-Binding Nuclear Proteins Including Lamins in 3T3-F442A<sup>†</sup>

Peter Csermely<sup>‡</sup> and C. Ronald Kahn\*

Research Division, Joslin Diabetes Center, and Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215

Received April 1, 1992; Revised Manuscript Received July 30, 1992

**ABSTRACT:** Insulin binding to its plasma membrane receptor stimulates a cascade of protein kinases and phosphatases which ultimately affects multiple processes in the membrane, cytosol, and nucleus of the cell, including transcription of specific genes. To gain insight into the relationship between the kinase cascade and the mechanism of insulin-induced nuclear events, we have studied the effect of insulin on the phosphorylation of DNA-binding nuclear proteins in differentiated NIH-3T3-F442A adipocytes. Insulin induced the phosphorylation of seven DNA-binding proteins: pp34, pp40, pp48, pp62, pp64, pp66, and pp72. The half-maximal response was observed at 10–30 min and reached its maximum at 60 min. The insulin-induced phosphorylation of each of these proteins was dose-dependent with ED<sub>50</sub>s of 2–10 nM. The phosphorylation of pp62, pp64, and pp72 took place on serine residues. On the basis of immunoprecipitation and immunoblotting experiments with anti-lamin antibodies, we found that the insulin-induced DNA-binding phosphoproteins pp62, pp64, pp66, and possibly pp48 were related to lamins A and C. The ED<sub>50</sub> for insulin-stimulated lamin phosphorylation was ~10 nM, and phosphorylation was half-maximal at 30 min. The insulin-dependent phosphorylation of lamins and other DNA-binding proteins (pp34, pp40, and pp72) may play a mediatory role in the long-term effects of insulin.

Insulin regulates a vast variety of cellular functions including those involved in carbohydrate, lipid, and protein metabolism as well as cell growth and differentiation (Rosen, 1987; Kahn & White, 1988). Many of these effects result from activation of membrane transport systems and changes in the phosphorylation and activity state of cytoplasmic enzymes. In addition, insulin acts at the cell nucleus to regulate the expression of specific genes. These changes occur through modulation of gene transcription, mRNA translation, and mRNA stability. Although some evidence has been presented to show that insulin may act to increase nuclear protein and RNA transport (Schindler & Jiang, 1987; Purello et al., 1983), the signal transduction mechanism from its plasma membrane receptor to its potential nuclear sites of action remains unknown.

The binding of insulin to its membrane receptor activates the tyrosine kinase activity intrinsic to the receptor (Rosen, 1987; Kahn & White, 1988) and subsequently stimulates an elaborate cascade of protein kinases and phosphatases (Czech et al., 1988; Chan et al., 1988). Some of the participating enzymes, such as casein kinase II and protein phosphatase 1, have been identified in the nucleus as well as the cytoplasm of the cell (Pfaff & Anderer, 1988; Cohen, 1989). There is also a growing, but still very much incomplete, number of nuclear proteins which have been identified to change their phosphorylation status after the addition of insulin (Friedman & Ken, 1988; Feuerstein & Randazzo, 1991; Suzuki et al.,

1991).<sup>1,2</sup> The relationship of these phosphorylation events to insulin effects on gene expression is unclear. Recently, a number of DNA sequences have been identified as the sites required to confer insulin-induced changes in the transcription of the *fos*, phosphoenolpyruvate carboxykinase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and glucagon genes (Stumpo et al., 1988; O'Brien et al., 1990; Nasrin et al., 1990; Philippe, 1991). These insulin response elements presumably bind one or more proteins which alter the rate of gene transcription. Although specific insulin-regulated transcription factors have not yet been identified, there are a large number of transcription factors, such as *fos*, *jun*, CREB, NF- $\kappa$ B, serum response factor, and heat shock factor, which appear to change their transcriptional activity after being phosphorylated or dephosphorylated (Ofir et al., 1990; Boyle et al., 1991; Yamamoto et al., 1988; Lenardo & Baltimore, 1989; Prywes et al., 1988; Sorger & Pelham, 1988). Thus, it is reasonable to assume that insulin-induced changes in the level of phosphorylation of transcription factors and other nuclear proteins may play an important role in the transmission of the hormonal signal to the cell nucleus.

In the present report, we have examined insulin-induced phosphorylation and dephosphorylation of nuclear proteins in differentiated 3T3-F442A cells, a cell line which expresses a large number of insulin receptors and is insulin-responsive with respect to differentiation and gene expression (Reed et al., 1977). We have identified and characterized seven insulin-regulated nuclear phosphoproteins which bind to double-stranded DNA and may participate in the nuclear signal transduction of insulin action. At least two of these proteins are lamins A and C; the exact nature of the others remains to be determined.

<sup>†</sup> This work was supported by a research grant from the National Institutes of Health (DK 33201), by an NIH Grant for the Joslin Diabetes and Endocrinology Research Center (DK 36836), by a Pfizer Biochemical Research Award, and by the Marilyn M. Simpson Research Program in Diabetes. P.C. is a recipient of a Fogarty International Research Fellowship Award (1F05 TW04319-01 B1-5).

\* Address correspondence to this author at the Joslin Diabetes Center, One Joslin Place, Boston, MA 02215. Phone: (617) 732-2635. FAX: (617) 732-2593.

<sup>‡</sup> On leave from the Institute of Biochemistry I, Semmelweis University Medical School, Budapest, Hungary.

<sup>1</sup> Peter Csermely and C. Ronald Kahn, unpublished results.

<sup>2</sup> Peter Csermely, Mark O. Olson, Tamás Schnaider, and C. Ronald Kahn, unpublished results.



Table I: Distribution of Biological Markers in Fractionated 3T3-F442A Cells<sup>a</sup>

marker	cell fraction	nuclear pellet (%)	supernatant (%)
lactate dehydrogenase	cytosol	1	99
5'-nucleotidase	plasma membrane	2	98
NADH-cytochrome <i>c</i> reductase	endoplasmic reticulum	5	95
Gal-1-P-uridyl transferase	Golgi	8	92
cytochrome oxidase	mitochondria	9	91
DNA	nucleus	96	4

<sup>a</sup> The methods for each of the assays listed are as follows: lactate dehydrogenase (Cabaud & Wroblewski, 1958); 5'-nucleotidase (Newby et al., 1975); NADH-cytochrome *c* reductase (Beaufay et al., 1974); Gal-1-P-uridyl transferase (Bretz & Straubi, 1977); cytochrome oxidase (Cooperstein & Lazarow, 1951); DNA (Labarca & Paigen, 1980).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Chemicals.** Cell culture media and the NF- $\kappa$ B-specific oligo-DNA affinity resin were obtained from Gibco (Grand Island, NY). Pork insulin was purchased from Elanco Products Co. (Indianapolis, IN). The chemicals used for polyacrylamide gel electrophoresis were from Bio-Rad (Richmond, CA). Poly-(I)-poly(C)-agarose was a product of Pharmacia (Uppsala, Sweden). TPCK-trypsin was obtained from Worthington Biochemical Co. (Freehold, NJ). Various batches of dsDNA-cellulose were purchased from Pharmacia, Worthington Biochemical Co., U.S. Biochemical Co. (Cleveland, OH), and Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Protien A-acrylamide beads, constant-boiling 6 N HCl, and Triton X-100 were obtained from Pierce (Rockford, IL). [<sup>32</sup>P]Orthophosphate (carrier-free) was from New England Nuclear (Wilmington, DE). Trans<sup>35</sup>S-label and methionine/cysteine-free MEM were from ICN Biomedicals (Irvine, CA). Rabbit anti-lamin serum against lamins A, B, and C was kindly provided by Dr. Larry Gerace (Research Institute of Scripps Clinic, La Jolla, CA); LS-1 human autoantibody and IE<sub>4</sub> mouse monoclonal antibody against lamins A and C were a gift of Dr. Frank McKeon (Harvard Medical School, Boston, MA) (McKeon et al., 1983; Loewinger & McKeon, 1988). The anti-fos, anti-jun, and anti-NF-1 antibodies were a kind gift from Dr. Bruce J. Spiegelman (Dana Farber Cancer Research Institute, Boston, MA). Rabbit  $\gamma$ -globulin was a product of Jackson Immunolaboratories (West Grove, PA). The S6 kinase substrate peptide was obtained from Peninsula Laboratories (Belmont, CA). Nitrocellulose filters (0.45  $\mu$ m) were purchased from Schleicher & Schuell (Keene, NH). All the other chemicals used were from Sigma Chemical Co.

**Cell Culture.** NIH-3T3-F442A cells were grown in DMEM medium with 10% calf serum in 5% humidified CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were differentiated in 10% CO<sub>2</sub> in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum for 10–12 days. The insulin concentration of the calf and fetal calf sera was 8 and 10 microunits/mL (~0.4 ng/mL), respectively, as measured by conventional radioimmunoassay. The differentiation was enhanced by the addition of 5  $\mu$ g/mL insulin for the first 6–8 days. By the end of this period, 90–95% of the cells acquired the characteristic adipocyte morphology, accumulating a large number of lipid droplets.

**In Vivo <sup>32</sup>P Labeling.** Cells were serum-starved for 18 h, then the cell culture medium was changed to phosphate-free DMEM, and 0.3 mCi/mL [<sup>32</sup>P]phosphate was added for 2 h. After the addition of insulin or other stimulants specified in the individual experiments, the medium was removed, and the cells were scraped to an isolation buffer containing 20

mM Hepes, 1 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 2 mM PMSF, 0.1 mg/mL aprotinin, 1 mM sodium vanadate, 1 mM sodium molybdate, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 5 mM sodium pyrophosphate, and 0.25 M sucrose, pH 7.4. The cells were disrupted by the method of Lee et al. (1988), passing them 4–5 times through a 1-mL tuberculin syringe with a Micro-Fine-IV needle. Cell nuclei were isolated according to the method of Blobel and Potter (1966). Briefly, samples were centrifuged at 3000g for 15 min at 4 °C, the supernatants were discarded, pellets were resuspended in 1 mL of isolation buffer, and 2 mL of isolation buffer supplemented with 1.6 M sucrose was layered under them. Nuclei were pelleted by centrifugation at 100000g for 35 min at 4 °C. Nuclei were resuspended in 0.5 mL of isolation buffer, and their protein concentration was determined according to Bradford (1976). The nuclear preparation was 90–95% pure as judged by marker DNA/enzyme analysis (Table I) and electron microscopy (data not shown).

**Purification of dsDNA-Binding Proteins.** DNA-cellulose chromatography was performed as described by Alberts and Herrick (1971). Proteins were extracted from aliquots of intact <sup>32</sup>P-labeled cell nuclei containing 0.5 mg of protein each by addition of NaCl and Triton X-100 at final concentrations of 0.6 M and 0.5%, respectively. Samples were rotated overnight and centrifuged in a microfuge, and the supernatants were removed and diluted 10 times with a buffer containing 10 mM Hepes, pH 7.4, 0.1% Triton X-100, and 10% glycerol. In some experiments, samples were precleared with the subsequent addition of 20 mg of cellulose and poly-(I)-poly(C)-agarose. Approximately 20 mg of dsDNA-cellulose was added, and samples were rotated for 2 h at 4 °C. After being washed 2 times with 1 mL of the same Hepes/Triton/glycerol buffer, 30  $\mu$ L of Laemmli sample buffer (Laemmli, 1970) was added to each sample with 100 mM DTT, and the samples were analyzed with SDS-PAGE and consequent autoradiography. When we tested various batches of dsDNA-cellulose from Pharmacia, Worthington Biochemicals, U.S. Biochemicals, and Sigma, we found the Sigma dsDNA-cellulose gave the lowest background and best handling properties. Thus, we performed our experiments using the product of this supplier. In some experiments, dsDNA-binding proteins were eluted with 0.6 M NaCl.

The results were quantified by a Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA) 300A computing densitometer. In most experiments, we scanned multiple autoradiograms after various times of storage at -70 °C (usually with an intensifying screen) to ensure that the exposure was in the linear range. The background values were subtracted, and in those few cases where the <sup>32</sup>P labeling of the samples was not uniform, values have been normalized to one of the constitutively phosphorylated dsDNA-binding proteins which did not show any change after the addition of insulin.

**Phosphoamino Acid Analysis.** Phosphoamino acid analysis was carried out by the method of Cooper et al. (1983). Phosphoprotein bands were excised from the acrylamide gel, soaked in 20% methanol, and digested with the addition of 2  $\times$  100  $\mu$ g of TPCK-trypsin in 50 mM ammonium carbonate for 24 h at 37 °C. The tryptic digest was lyophilized and hydrolyzed in constant-boiling 6 N HCl at 110 °C for 70 min. The hydrolysates were washed with 2  $\times$  1 mL of distilled water and subjected to electrophoresis on TLC plates at pH 3.5. Plates were dried, stained with ninhydrin, and analyzed by autoradiography.

**Immunoprecipitations.** Proteins were extracted from aliquots of intact <sup>32</sup>P-labeled cell nuclei by addition of 40 units



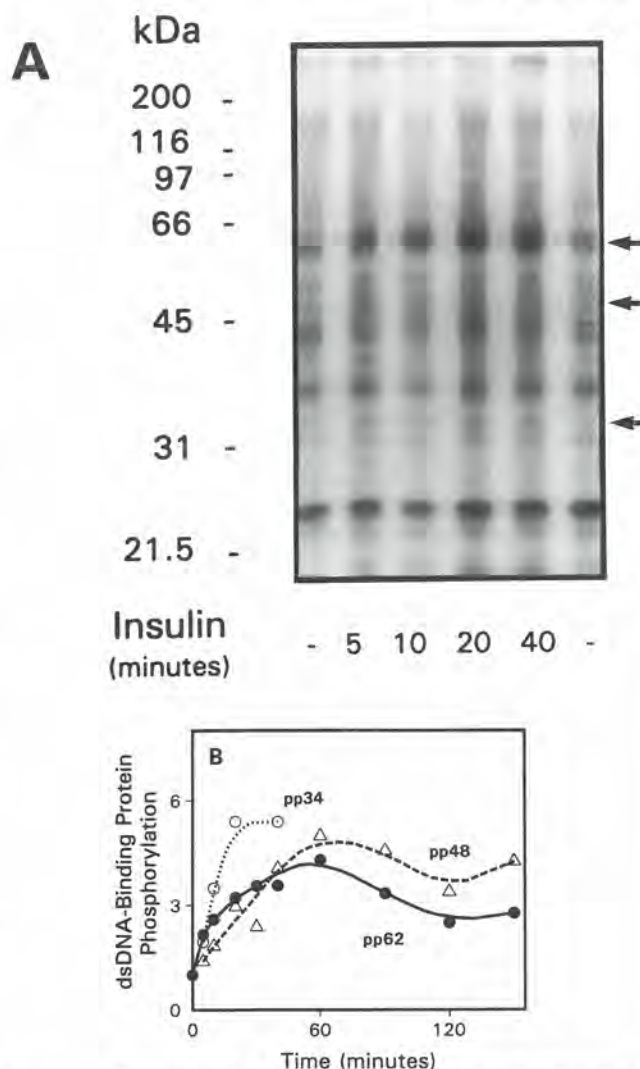
of DNase I (Sigma) NaCl and Triton X-100 at final concentrations of 0.6 M and 0.5% (v/v), respectively. The extracts were precleared by the simultaneous addition of 0.1 mg of rabbit  $\gamma$ -globulin and 50  $\mu$ L of protein A-beads. Samples were rotated overnight at 4 °C and centrifuged in a microfuge, and the protein concentration of the supernatants was determined according to Bradford (1976). To aliquots of protein extracts containing 0.5 mg of protein each was added 5  $\mu$ g of anti-lamin serum, and the samples were incubated overnight at 4 °C. The immunocomplexes were coupled to 30  $\mu$ L of protein A-beads by rotating them for 2 h at 4 °C. Immunoprecipitates were washed successively with 1 mL each of buffers containing 50 mM Hepes, pH 7.4, supplemented with 0.1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Triton X-100, and 0.1% (v/v) Triton X-100, respectively. The final pellets were eluted with Laemmli buffer (Laemmli, 1970) containing 100 mM DTT, samples were boiled for 3 min and centrifuged in a microfuge, and the supernatants were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

**Immunoblots.** dsDNA-binding nuclear [ $^{32}$ P]phosphoproteins were purified and separated with SDS-PAGE as described above. The proteins were transferred to nitrocellulose filters according to the method of Towbin (Towbin et al., 1979), in a transfer buffer containing 25 mM Tris, 0.192 M glycine, and 20% (v/v) methanol. Filters were soaked in a 20 mM Tris, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.5% (v/v) Tween 20, and 0.1% bovine serum albumin blocking buffer for 1 h at room temperature. After overnight incubation with a 1:200 dilution of rabbit anti-lamin serum or IE<sub>4</sub> mouse monoclonal anti-lamin antibody at 4 °C, the immunocomplexes were visualized by means of peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies and subsequent treatment with 4-chloro-1-naphthol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Radioactive bands were detected by autoradiography.

## RESULTS

**Insulin-Induced Phosphorylation of Double-Stranded DNA-Binding Proteins.** Insulin treatment of  $^{32}$ P-labeled differentiated 3T3-F442A cells induces the phosphorylation of several nuclear proteins capable of binding to double-stranded DNA (dsDNA) (Figure 1A). The highest level of phosphorylation was observed as a triplet migrated between 62 and 66 kDa (pp62, pp64, and pp66). Additional insulin-induced bands were seen at 48 and 34 kDa (pp48 and pp34, respectively). The stimulation of the proteins at 62–66 kDa was observed in all of the more than 20 experiments performed, while pp48 and pp34 were at the threshold of visibility in some of the experiments and thus could not be quantitated in all experiments. The pattern of  $^{32}$ P-labeled phosphoproteins was similar if single-stranded or double-stranded DNA–cellulose was used for purification. The presence of divalent cations, such as Mg<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup>, did not cause any significant change in the amount of insulin-induced dsDNA-binding phosphoproteins. The majority of the binding was specific to the DNA; only about 10–20% of the triplet around 62–66 kDa bound to cellulose, the matrix of the DNA–cellulose affinity medium (data not shown). The changes in the intensity of  $^{32}$ P-labeled protein bands appeared to reflect changes in their phosphorylation status rather than a shift in their affinity toward double- or single-stranded DNA, since there was no visible change in the amount of proteins following insulin treatment as judged by scanning of the corresponding Coomassie Blue stained gels or autoradiograms of  $^{35}$ S-labeled dsDNA-binding nuclear extracts (data not shown).

Differentiation of 3T3-F442A cells to adipocytes resulted in some quantitative changes in the pattern of insulin-induced



**FIGURE 1:** Time dependence of insulin-induced phosphorylation of dsDNA-binding nuclear proteins. **Panel A:** 3T3-442A cells were differentiated, serum-starved, and labeled with [ $^{32}$ P]phosphate as described under Experimental Procedures. Cells were treated with 1  $\mu$ M insulin for the times indicated.  $^{32}$ P-labeled nuclei were isolated from each sample, and 0.5 mg of nuclear proteins was extracted with 0.6 M NaCl and 0.5% Triton X-100 (see Experimental Procedures for details). Protein extracts were diluted 10 times with a buffer containing 100 mM Hepes, pH 7.4, 0.1% Triton X-100, and 10% glycerol. Approximately 20 mg of dsDNA–cellulose was added, and samples were rotated for 2 h at 4 °C. After extensive washing, samples were analyzed with SDS-PAGE and consequent autoradiography. **Panel B:** The results of the experiment shown in panel A and three other experiments were quantified by densitometry analysis as described under Experimental Procedures. Open circles, open triangles, and filled circles correspond to bands of pp34, pp48, and pp62, respectively. Data are means of two separate experiments. The changes in the phosphorylation of pp64 and pp66 were very similar with the time course of pp62 phosphorylation (data not shown). The phosphoprotein band corresponding to pp34 was too faint to quantify in the two experiments examining longer incubation with insulin.

dsDNA-binding phosphoproteins. For the 34-, 48-, 62-, 64-, and 66-kDa bands, there was only a small stimulation in insulin-treated nondifferentiated 3T3-F442A cells, and the magnitude of these insulin-induced phosphorylations increased by 2–4-fold as the cells progressively differentiated during the 8 days of insulin treatment. It is important to note that in all our studies, the insulin concentration in the culture medium was reduced from the 5  $\mu$ g/mL level required for differentiation to the normal level in serum-supplemented



media (<1 ng/mL) for at least 2 days prior to the actual experiment. Failure to remove the high concentration of insulin resulted in a loss of the insulin-induced change in the  $^{32}\text{P}$ -labeled dsDNA-binding proteins (data not shown). This is probably the result of down-regulation of insulin receptors and/or postreceptor desensitization due to continuous exposure of adipocytes to high levels of insulin (Reed et al., 1977). Serum starvation for 12 h also enhanced the insulin-induced changes; however, increasing the duration of the starvation in the range to 24 h caused little if any difference in the pattern of dsDNA-binding phosphoproteins.

Quantitation of the results from Figure 1A and other similar experiments by scanning densitometry revealed a time-dependent phosphorylation of dsDNA-binding proteins after the addition of insulin (Figure 1B). The half-maximal response was around 10 min for pp34, whereas pp48 and pp62 reached half-maximal phosphorylation at 30 min. The phosphorylations of all three of the major phosphoproteins was maximal by 60 min, after which it remained fairly stable.

**Insulin Dose Dependence.** The insulin-induced changes in the phosphorylation of dsDNA-binding proteins were concentration-dependent (Figure 2A). The insulin-induced phosphorylation of pp62 and pp64 displayed a half-maximal activation at 10 and 2 nM (60 and 12 ng/mL), respectively (Figure 2B). These values are close to the half-maximal binding of insulin to its receptor in 3T3-L1 adipocytes (5 nM or 30 ng/mL; Reed et al., 1977). The low level of pp48-associated radioactivity did not allow exact quantification of the dose response in these experiments. In this experiment, pp34 was not visible. However, there was a clear increase and then decrease in the phosphorylation of a dsDNA-binding protein around 97 kDa. In separate experiments, we obtained evidence that this protein is nucleolin (C23), one of the major constituents of the nucleolar RNA-processing machinery, and that its phosphorylation was highly correlated with the state of cell differentiation (P. Cserrmely et al., unpublished results).

**Insulin-Induced Phosphorylation of Lamins.** Lamins are abundant nuclear phosphoproteins migrating in the range of 60–74 kDa in SDS gels (Krohne & Benavente, 1986). The observation that insulin induces the phosphorylation of lamins A and C in BHK-21 fibroblasts (Friedman & Ken, 1988) and other data indicating that lamins may be able to bind to DNA (Yuan et al., 1991; Hakes & Berezney, 1991) raised the possibility that some of the insulin-induced dsDNA-binding phosphoproteins were lamins. As a first step to address this question, we examined if insulin induces the phosphorylation of lamins in differentiated 3T3-F442A adipocytes using anti-lamin antibodies for immunoprecipitation.

As shown in Figure 3A, insulin induces a dose- and time-dependent phosphorylation of lamins in 3T3-F442A cells. These migrated as a closely spaced triplet at 62–66 kDa. A faint phosphoprotein band was also observed at 45–60 kDa in these immunoprecipitates which may correspond to proteolytic fragments of lamins A and C (Tökés & Clawson, 1989). Half-maximal stimulation of lamin phosphorylation was observed at 10 nM insulin concentration and reached its maximum around 100 nM insulin (Figure 3B). The time course of lamin phosphorylation was rather slow, reaching half-maximal after 20 min and maximal after 1 h of stimulation.

**Relationship between the dsDNA-Binding Phosphoproteins and Lamins.** In hopes to better define the DNA-binding proteins in the nuclear extract by diminishing the nonspecific binding to the affinity resin and to determine the specificity of the lamin-DNA interaction, we performed a series of experiments in which we precleared the high-salt  $^{32}\text{P}$ -nuclear

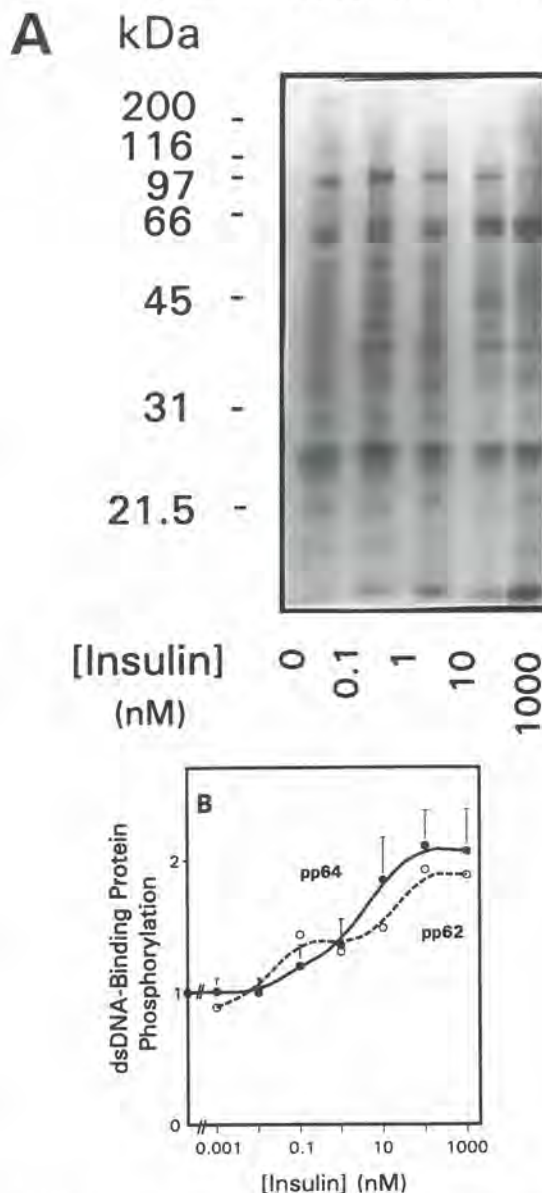
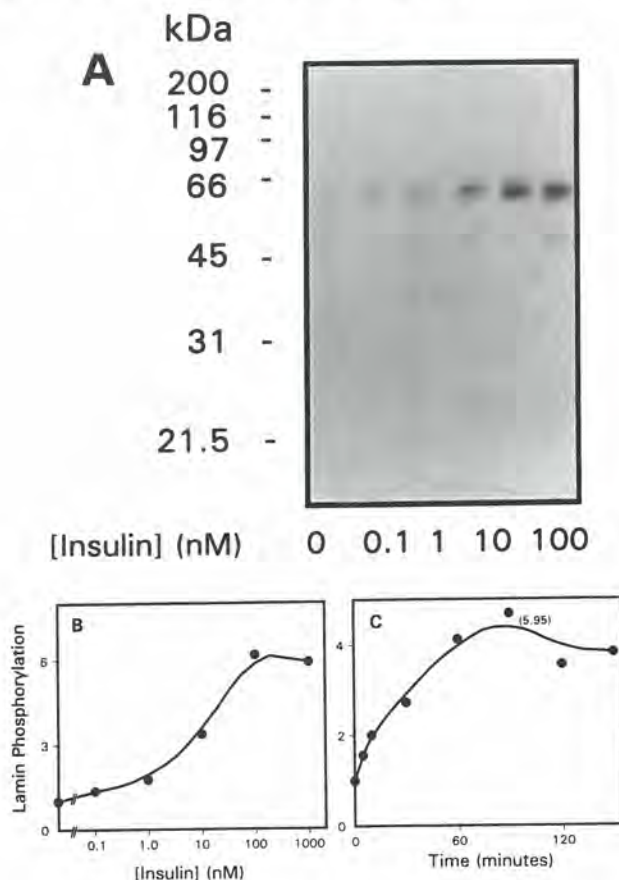


FIGURE 2: Dose response of insulin-induced phosphorylation of dsDNA-binding proteins. Panel A: Differentiated,  $^{32}\text{P}$ -labeled 3T3-442A cells were treated with insulin for 15 min at the final concentrations indicated. Nuclear proteins have been extracted and bound to dsDNA-cellulose as described under Experimental Procedures. Samples have been analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Panel B: Bands from the autoradiograms of panel A and three other experiments corresponding to pp62 (open circles) and pp64 (filled circles) were quantified by densitometry as detailed under Experimental Procedures. Data represent means  $\pm$  SDs of at least three separate experiments. To convert nanomolar to nanograms per milliliter, multiply by 6.

extracts with both free cellulose and the nonspecific polynucleotide poly(I)-poly(C)-agarose prior to adsorption to dsDNA-cellulose. After these preclearing steps, the insulin-induced pp34, pp48, and the triplet around 62–66 kDa remain clearly visible.

The immunoblots of these DNA-binding proteins with mouse anti-lamin A and C antibodies show the presence of at least four lamin isoforms around 62–66 kDa and some minor bands migrating at 48 kDa (Figure 4, lanes c and d). When we analyzed the blots with the rabbit anti-lamin antiserum which recognizes lamin B besides lamins A and C, two additional bands in the 62–66-kDa region were observed which probably correspond to isoforms of lamin B (data not shown). Comparing the pattern of dsDNA-binding phos-

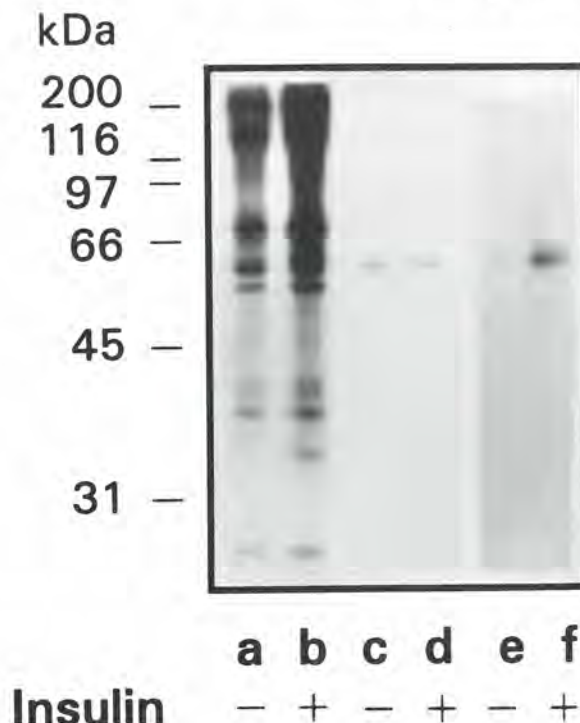




**FIGURE 3:** Insulin-induced phosphorylation of lamins. 3T3-F442A cells were differentiated to adipocytes and labeled with [ $^{32}$ P]phosphate as described under Experimental Procedures. Cells were treated with insulin for 15 min at the final concentrations indicated (panels A and B), or the insulin concentration was fixed at 1  $\mu$ M and the time of incubation was varied (Panel C). Nuclear proteins were extracted and immunoprecipitated with rabbit anti-lamin antiserum. The immunoprecipitates were adsorbed to protein A-beads, washed extensively, and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Panel A: Autoradiogram of a dose response experiment. The autoradiogram is representative of three separate experiments. Panel B: Concentration dependence of insulin-induced lamin phosphorylation. The radioactivity associated with the lamin bands was quantified by densitometric analysis. Data are means of two experiments. Panel C: Time dependence of insulin-induced lamin phosphorylation. Data are means of the densitometric analysis of two separate experiments. The off-scale value corresponding to 90-min insulin treatment is given in parentheses.

phosphoproteins with anti-lamin immunoblots (Figure 4, lanes a,b and c,d), we concluded that the triplet of pp62, pp64, and pp66, as well as pp48, is at least partly recognized by antibodies against lamins A and C. This (partial) identity was also confirmed when we dissolved the dsDNA-binding proteins from dsDNA-cellulose by high-salt treatment and successively immunoprecipitated the proteins with anti-lamin antibodies (Figure 4, lanes a,b and e,f). In addition, the gel background was significantly reduced and two new insulin-induced phosphoproteins at 40 and 72 kDa could be observed (Figure 4, lanes a and b).

In our attempts to identify the remaining insulin-induced dsDNA-binding nuclear phosphoproteins, we performed immunoprecipitation after an elution from dsDNA-cellulose with 0.4 M NaCl using antibodies against several candidate proteins. Specifically, we could not show any significant immunoprecipitation with anti-fos, anti-jun, or anti-NF- $\kappa$ B antibodies of the insulin-induced, dsDNA-binding nuclear phosphoproteins (data not shown). Also there was no significant difference in the  $^{32}$ P-labeled proteins bound to an



**FIGURE 4:** Comparison of insulin-induced dsDNA-binding phosphoproteins and lamins. Differentiated, serum-starved,  $^{32}$ P-labeled 3T3-F442A cells were incubated in the presence (lanes b, d, and f) or absence (lanes a, c, and e) of 1  $\mu$ M insulin for 15 min. Nuclear proteins were extracted with high-salt/Triton X-100 treatment as detailed under Experimental Procedures. Nuclear extracts were precleared with the successive addition of cellulose and poly(I)-poly(C)-agarose. The extracts were adsorbed to dsDNA-cellulose and washed extensively. Samples were subjected to SDS-PAGE;  $^{32}$ P-labeled proteins were blotted to nitrocellulose filters and analyzed by autoradiography (lanes a and b). On the same blots, lamins were visualized with IE $_4$  anti-lamin antibody as detailed under Experimental Procedures (lanes c and d). Separate samples were dissolved from the dsDNA-cellulose column by high-salt treatment, immunoprecipitated with IE $_4$  anti-lamin antibody, and then analyzed with SDS-PAGE and autoradiography (lanes e and f). The autoradiogram and immunoblot are representatives of three separate experiments.

NK $\kappa$ B-affinity oligo-DNA column from control and insulin-treated 3T3-F442A cells (data not shown).

**Phosphoamino Acid Analysis of dsDNA-Binding Phosphoproteins.** Phosphoamino acid analysis of various bands from the SDS-PAGE gel of Figure 4A is shown in Figure 5. The insulin-induced phosphorylation of pp72, pp64, and pp62 was almost exclusively on serine residues. In the case of pp72, there was a small amount of labeled phosphothreonine; however, this was also present in the control samples which had not been treated with insulin (data not shown). Unfortunately, the amount of radioactivity associated with pp34, pp40, and pp48 was too small to analyze their phosphoamino acid composition.

## DISCUSSION

After insulin binds to its receptor on the cell surface, there is an elaborate cascade of signal transduction steps induced in the plasma membrane and cytosol. As a result of intensive research, many of the initial events which are linked to the acute metabolic effects of insulin have been characterized (Rosen, 1987; Kahn & White, 1988). On the other hand, some of the growth effects of insulin, as well as some of the metabolic effects, require that the insulin signal must reach the cell nucleus. Although there are reports showing the association of insulin and/or insulin receptors with the cell



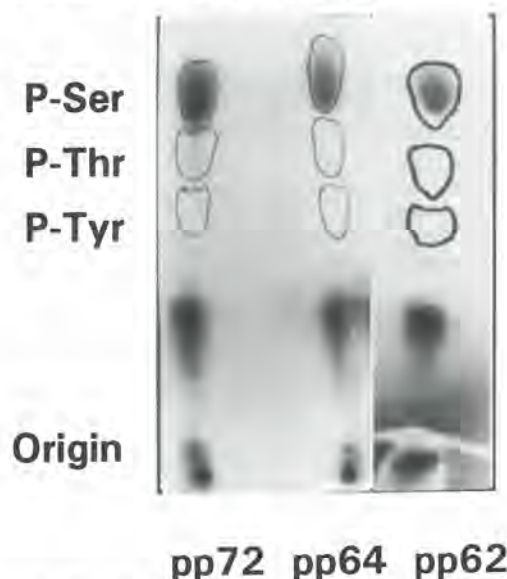


FIGURE 5: Phosphoamino acid analysis. Bands corresponding to pp72, pp64, and pp62 were cut from the gel the autoradiogram of which is shown in Figure 4, lane b. The phosphoamino acid composition of the proteins was analyzed as described under Experimental Procedures. Data are representatives of two separate phosphoamino acid determinations.

nuclei (Goldfine & Smith, 1976; Goldfine et al., 1977; Smith & Jarett, 1987) and an insulin-induced increase in nuclear RNA and protein transport (Schindler & Jiang, 1987; Purello et al., 1983), the mechanisms coupling insulin receptor binding to insulin action at the nuclear level are largely unknown.

In the present study, we report that insulin induces the phosphorylation of seven dsDNA-binding nuclear proteins. The insulin-induced phosphorylation of five nuclear proteins, pp34, pp48, pp62, pp64, and pp66, can be detected directly by their ability to bind to double-stranded DNA-cellulose. Preclearing of the high-salt nuclear extracts with cellulose and the nonspecific nucleotide resin poly(I)-poly(C)-agarose allows detection of two additional insulin-induced phosphoproteins, pp40 and pp72, which bind to the DNA affinity column. The reason why pp40 and pp72 are able to bind to the dsDNA-cellulose only after the preclearing steps is unknown, but could relate to enhancement of the dissociation of protein complexes in the nuclear extract by these additional steps of purification, or simply to enhanced sensitivity afforded by this methodologic modification.

From immunoblotting experiments, we gained evidence that three of the seven insulin-induced dsDNA-binding phosphoproteins (a triplet at 62–66 kDa) comigrate with the isoforms of lamins A and C. The time course and insulin concentration dependence of pp62, pp64, and pp66 phosphorylation and lamin phosphorylation are almost identical (compare Figures 1B and 3B and 2B and 3C). When the dsDNA-binding phosphoproteins are dissolved with high-salt treatment, anti-lamin antibodies are able to recognize a doublet around 64 kDa. These experiments further support the conclusion that pp62, pp64, and pp66 are at least partially identical with the lamins of differentiated 3T3-F442A cells.

Lamins are a large family of nuclear skeletal proteins. Recently, several isoforms of the three major lamins, A, B, and C, have been identified (Krohne & Benavente, 1986; Lehner et al., 1986). At present, no detailed characterization of mouse adipocyte lamins has been made; thus, it is difficult to assess exactly which lamins correspond to the three insulin-induced dsDNA-binding phosphoproteins. When the immunoblotting experiments with the rabbit antibodies (which

recognize lamins A, B, and C) are compared with the experiments using mouse antibodies (which recognize only lamins A and C), one additional band is observed. This band in the 66-kDa region probably represents lamin B and was not identified in the  $^{32}\text{P}$ -labeled nuclear extracts with immunoprecipitation using the two antibodies (data not shown). These data suggest that insulin does not induce the phosphorylation of lamin B in 3T3-F442A cells and the lamin species which become phosphorylated correspond to isoforms of lamin C or isoforms of lamins A and C. This conclusion is in agreement with the results of Friedman and Ken (1988), who found that insulin induces the phosphorylation of lamins A and C but not lamin B in quiescent baby hamster kidney fibroblasts (BHK-21 cells). The insulin dose response of lamin phosphorylation is very similar in the two cells, but the maximal phosphorylation of lamins is achieved at 15 min in BHK-21 cells while differentiated 3T3-F442A cells display a slower response, peaking at 60 min. Our conclusion that the insulin-induced dsDNA-binding phosphoproteins pp62, pp64, and pp66 are at least partially identical with isoforms of lamin C and lamin A is in agreement with the recent findings that lamins A and C, but not B, are able to bind to DNA (Yuan et al., 1991; Hakes & Berezney, 1991).

There is also a group of minor phosphoproteins around 48 kDa which is recognized by anti-lamin antibodies in immunoblots and immunoprecipitation experiments. These lamin-related dsDNA-binding phosphoproteins are migrating close to the reported molecular weight of the 46-kDa nucleoside triphosphatase which is thought to participate in nucleocytoplasmic transport of RNA and which is generated via the self-digestion of lamins A and C (Yuan et al., 1991). This finding raises the possibility that the insulin-induced phosphorylation of the 46/48-kDa lamin fragment may participate in the induction of RNA efflux from the nuclei after insulin treatment, as suggested by Purello et al. (1983).

Since the lamins are phosphorylated on serine residues, it is unlikely that they are direct substrates of the insulin receptor or another insulin-induced tyrosine kinase. Recently, several kinase such as protein kinase C, the S6 kinase, and cdc2 kinase have been shown to participate in the phosphorylation of various lamins (Hornbeck et al., 1988; Fields et al., 1988; Ward & Kirschner, 1990; Peter et al., 1990). In other experiments, we have found that phorbol ester (TPA) treatment induces the phosphorylation of the same set of lamins as insulin and that insulin increases the nuclear S6 kinase activity in differentiated 3T3-F442A cells, suggesting that protein kinase C and nuclear S6 kinase are good candidates for this role (data not shown). The exact identification of the protein kinases which are participating in the insulin-induced phosphorylation of lamins A and C will require further research.

The identity of the other insulin-induced dsDNA-binding phosphoproteins, pp34, pp40, and pp72, is not known. Recently, insulin has been reported to induce phosphorylation of the 40-kDa numatrin (B23) (Feuerstein & Randazzo, 1991). Numatrin is known to be able to bind to both ssDNA and dsDNA (Feuerstein et al., 1990), and this further enhances the possibility that pp40 may be identical with this protein.

There are several transcription factors such as fos, jun, NF $\kappa$ B, nuclear factor 1 (NF-1), and serum response factor which are known to be regulated by phosphorylation and which would migrate close to one of the insulin-induced dsDNA-binding proteins (Ofir et al., 1990; Boyle et al., 1991; Yamamoto et al., 1988; Lenardo & Baltimore, 1989; Prywes



et al., 1988; Sorger & Pelham, 1988). In this study, however, we failed to detect any insulin-induced phosphorylation of  $^{32}\text{P}$ -labeled fos, jun, or NF- $\kappa$ B immunoprecipitates or in NF- $\kappa$ B-affinity oligo-DNA-purified  $^{32}\text{P}$ -labeled nuclear extracts. Experiments with the serum response factor antibodies were in progress at the submission of this paper.

In summary, insulin induces the phosphorylation of lamin C (and A) isoforms and several other DNA-binding proteins in 3T3-F442A cells. Further studies are to determine if the insulin-induced lamin phosphorylation participates in the  $G_0 \rightarrow G_1$  reorganization of nuclear structure, in analogy with cdc2 kinase-induced lamin disassembly in mitosis (Ward & Kirschner, 1990; Peter et al., 1990; Ottaviano & Gerace, 1985; Heald & McKeon, 1990), and to identify the remaining members of this insulin-induced, nuclear protein group. Whether these might represent new transcription factors or other nuclear signaling proteins remains to be determined.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Larry Gerace (Research Institute of Scripps Clinic, La Jolla, CA) and Dr. Frank McKeon (Harvard Medical School, Boston, MA) for their kind gifts of anti-lamin antibodies. We express our gratitude to Drs. Bruce M. Spiegelman and Robert J. Distel (Dana Farber Cancer Research Institute, Boston, MA) for the anti-jun, anti-fos, and anti-NF- $\kappa$ B antibodies and for the 3T3-F442A cell line. P.C. is thankful to Tamás Schnaider (Semmelweis University, School of Medicine, Budapest, Hungary) for his excellent technical help and to Dr. Steve Shoelson for useful discussions.

## REFERENCES

- Alberts, B., & Herrick, G. (1971) *Methods Enzymol.* 20, 198–217.
- Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M., & Berthet, J. (1974) *J. Cell Biol.* 61, 188–200.
- Blobel, G., & Potter, V. R. (1966) *Science* 154, 1662–1665.
- Boyle, W. J., Smeal, T., Defize, L. H. K., Angel, P., Woodgett, J. R., Karin, M., & Hunter, T. (1991) *Cell* 64, 573–584.
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bretz, R., & Straubli, W. (1977) *Eur. J. Biochem.* 77, 181–192.
- Cabaud, P. G., & Wroblewski, F. (1958) *Am. J. Clin. Pathol.* 30, 234–244.
- Chan, C. P., McNall, S. J., Krebs, E. G., & Fischer, E. H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6257–6261.
- Cohen, P. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58, 453–508.
- Cooper, J. A., Sefton, B. M., & Hunter, T. (1983) *Methods Enzymol.* 99, 387–402.
- Cooperstein, S. J., & Lazarow, A. (1951) *J. Biol. Chem.* 189, 665–670.
- Czech, M. P., Klarlund, J. K., Yagaloff, K. A., Bradford, A. P., & Lewis, R. E. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11017–11020.
- Feuerstein, N., & Randazzo, P. A. (1991) *Exp. Cell Res.* 194, 289–296.
- Feuerstein, N., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Mond, J., Hay, I., Kinchington, P. R., & Ruyechan, W. T. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1087, 127–136.
- Fields, A. P., Pettit, G. R., & May, W. S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 8253–8260.
- Friedman, D. L., & Ken, R. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 1103–1106.
- Goldfine, I. D., & Smith, G. J. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1427–1431.
- Goldfine, I. D., Vigneri, R., Cohen, D., Pliam, N. B., & Kahn, C. R. (1977) *Nature* 269, 698–700.
- Hakes, D. J., & Berezney, R. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 11131–11140.
- Heald, R., & McKeon, F. (1990) *Cell* 61, 579–589.
- Hornbeck, P., Huang, K.-P., & Paul, W. E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2279–2283.
- Kahn, C. R., & White, M. F. (1988) *J. Clin. Invest.* 82, 1151–1156.
- Krohne, G., & Benavente, R. (1986) *Exp. Cell Res.* 162, 1–10.
- Labarca, C., & Paigen, K. (1980) *Anal. Biochem.* 102, 344–352.
- Laemmli, U. K. (1990) *Nature* 227, 680–685.
- Lee, K. A. W., Bindereif, A., & Green, M. R. (1988) *Gene Anal. Tech.* 5, 22–31.
- Lehner, C. F., Kurer, V., Eppenberger, H. M., & Nigg, E. A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 13293–13301.
- Lenardo, M. J., & Baltimore, D. (1989) *Cell* 58, 227–229.
- Loewinger, L., & McKeon, F. D. (1988) *EMBO J.* 7, 2301–2309.
- McKeon, F. D., Tuffanelli, D. L., Fukuyama, K., & Kirschner, M. W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 969–977.
- Nasrin, N., Ercolani, L., Denaro, M., Kong, X. F., Kang, I., & Alexander, M. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5273–5277.
- Newby, A. C., Luzio, J. P., & Hales, C. N. (1975) *Biochem. J.* 146, 625–633.
- O'Brien, R. M., Lucas, P. C., Forest, C. D., Magnuson, M. A., & Granner, D. K. (1990) *Science* 249, 533–537.
- Ofir, R., Dwarki, V. J., Rashid, D., & Verma, I. M. (1990) *Nature* 348, 80–82.
- Ottaviano, Y., & Gerace, L. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 624–632.
- Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J. C., & Nigg, E. A. (1990) *Cell* 61, 591–602.
- Pfaff, M., & Anderer, F. A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 969, 100–10915.
- Philippe, J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7224–7227.
- Prywes, R., Dutta, A., Cromlish, J. A., & Roeder, R. G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 7206–7210.
- Purello, F., Burnham, D. B., & Goldfine, I. D. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 1189–1193.
- Reed, B. C., Kaufmann, S. H., Mackall, J. C., Student, A. K., & Lane, M. D. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 4876–4880.
- Rosen, O. M. (1987) *Science* 237, 1452–1458.
- Schindler, M., & Jiang, L. (1987) *J. Cell Biol.* 104, 849–853.
- Smith, R. M., & Jarett, L. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 459–463.
- Sorger, P. K., & Pelham, H. R. B. (1988) *Cell* 54, 855–864.
- Stumpo, D. J., Stewart, T. N., Gilman, M. Z., & Blackshear, P. J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 1611–1614.
- Suzuki, N., Kobayashi, M., Sakata, K., Suzuki, T., & Hosoya, T. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1092, 367–375.
- Tökés, Z., & Clawson, G. A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 15059–15065.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350–4354.
- Ward, G. E., & Kirschner, M. W. (1990) *Cell* 61, 561–577.
- Yamamoto, K. K., Gonzalez, G. A., Biggs, W. H., III, & Montminy, M. R. (1988) *Nature* 334, 494–498.
- Yuan, J., Simos, G., Blobel, G., & Georgatos, S. D. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 9211–9215.

Registry No. Insulin, 9004-10-8; serine, 56-45-1; insulin receptor protein kinase, 88201-45-0.



# Insulin Induces the Phosphorylation of Nucleolin

A POSSIBLE MECHANISM OF INSULIN-INDUCED RNA EFFLUX FROM NUCLEI\*

(Received for publication, July 6, 1992, and in revised form, December 3, 1993)

Peter Csermely<sup>‡</sup>, Tamás Schnaider<sup>§</sup>, Bentley Cheatham<sup>¶</sup>, Mark O. J. Olson<sup>||\*\*</sup>, and  
C. Ronald Kahn<sup>‡‡</sup>

From the Research Division, Joslin Diabetes Center, and Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, and  
Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02215 and the <sup>||</sup>Department of Biochemistry, the University of Mississippi  
Medical Center, Jackson, Mississippi 39216

Insulin induces the serine phosphorylation of the nucleolar protein nucleolin at subnanomolar concentrations in differentiated 3T3-442A cells. The stimulation is biphasic with phosphorylation reaching a maximum at 10 pM insulin and then declining to only 40% of basal levels at insulin concentrations of 1  $\mu$ M. These changes are rapid, reaching half-maximal after 4 min and maximal after 15 min of incubation. The cell-permeable casein kinase II inhibitor 5,6-dichlorobenzimidazole-riboside prevents the insulin-stimulated phosphorylation of nucleolin suggesting that casein kinase II may mediate this effect of the hormone. Insulin-like growth factor 1 mimics the action of insulin on dephosphorylation of nucleolin at nanomolar concentrations suggesting that the latter effect may be mediated by insulin-like growth factor 1 receptors. Insulin treatment of 3T3-442A cells also results in a stimulation of RNA efflux from isolated, intact cell nuclei. The dose dependence of insulin-induced nucleolin phosphorylation and insulin-stimulated RNA efflux from intact cell nuclei are almost identical. Insulin induces an increase in the RNA efflux at subnanomolar concentrations in 3T3-442A adipocytes, while high (micromolar) concentrations of insulin inhibited the efflux of RNA. These data indicate that insulin regulates the phosphorylation/dephosphorylation of nucleolin, possibly via stimulation of casein kinase II, and this may play a role in regulation of the RNA efflux from nuclei.

Binding of insulin to its receptors in the plasma membrane induces a wide variety of cellular responses including short term changes in cellular metabolism and long term growth

\* This work was supported by Research Grant DK 33201 from the National Institutes of Health, by NIH Grant DK 36836 to the Joslin Diabetes and Endocrinology Research Center, by a Pfizer Biomedical Research Award, and by the Marilyn M. Simpson Research Program in Diabetes. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>‡</sup> Recipient of Fogarty International Research Fellowship Award 1F05 TW04319-01 B1-5. On leave from the Institute of Biochemistry I, Semmelweis University, Medical School, Budapest, Hungary.

<sup>§</sup> On leave from the Institute of Biochemistry I., Semmelweis University, Medical School, Budapest, Hungary.

<sup>¶</sup> Recipient of a Juvenile Diabetes Foundation Postdoctoral Fellowship.

<sup>\*\*</sup> Supported by National Institutes of Health Grant GM28349.

<sup>‡‡</sup> To whom correspondence should be addressed: Joslin Diabetes Center, One Joslin Place, Boston, MA 02215. Tel.: 617-732-2635; Fax: 617-732-259.

effects involving enhanced nuclear activity (1, 2). In spite of our rapidly increasing knowledge about the effects of insulin on the plasma membrane and cytosolic enzymes, the various mechanisms mediating insulin's nuclear function are less clear. Insulin alters the transcription rate of a number of genes (reviewed in Ref. 3) and has been shown to increase transport of proteins and RNA from nucleus to cytosol (4, 5). Some of the insulin-induced protein kinases and phosphatases, such as casein kinase II and protein phosphatase 1, have been localized in the nucleus (6, 7), although a role of insulin in regulation of these nuclear enzymes is lacking. There is also a growing, but still very much incomplete, number of nuclear proteins, such as lamins and numatrin (B23) (8, 9)<sup>1</sup> which have been shown to change their phosphorylation status after the addition of insulin.

In our recent studies we have identified and partially characterized several nuclear proteins which are able to bind to DNA and whose phosphorylation changes upon insulin stimulation. Four of the proteins were immunologically related to lamins while the identity of the others is not known yet.<sup>1</sup> One of the DNA-binding phosphoproteins, migrating at 94 kDa, was dephosphorylated after the addition of high (micromolar) concentrations of insulin. Nucleolin (C23) is an abundant nucleolar phosphoprotein which is thought to be involved in the synthesis, processing, and transport of preribosomal RNA (10-13). Nucleolin is able to bind to DNA and migrates from 92-110 kDa on SDS gels (11, 13, 14). This raised the possibility that the 94-kDa DNA-binding phosphoprotein observed in the previous experiments was related to nucleolin, and therefore, that insulin may induce changes in the phosphorylation of this protein. In the present report we have evaluated the effects of insulin on the phosphorylation of nucleolin and its relationship to insulin-induced changes in ribosomal RNA transport.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals**—Cell culture media were obtained from GIBCO. Pork insulin was purchased from Elanco Products Co. (Indianapolis, IN). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)<sup>2</sup> was from Eli Lilly Co. The chemicals used for polyacrylamide gel electrophoresis were from Bio-Rad. RNase was from Boehringer Mannheim. L-1-Tosyl-amido-2-phenylethyl chloromethyl ketone-trypsin was obtained from Worthington Biochemical Co. (Freehold, NJ). Protein-A acrylamide beads, constant boiling 6 N HCl, and Triton X-100 were obtained from Pierce Chemical Co. [<sup>32</sup>P]PO<sub>4</sub> (carrier free) and [<sup>3</sup>H]uridine were from Du Pont-New England Nuclear. Rabbit anti-nucleolin

<sup>1</sup> P. Csermely and C. R. Kahn, manuscript in preparation.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: IGF-1, insulin-like growth factor 1; DRB, 5,6-dichlorobenzimidazole-riboside; dsDNA, double-stranded DNA; DTT, dithiothreitol; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.



serum was produced as described by Olson *et al.* (15). Rabbit  $\gamma$ -globulin was a product of Jackson Immunolaboratories (West Grove, PA). Nitrocellulose filters (0.45  $\mu$ m) were purchased from Schleicher & Schuell. All the other chemicals used were from Sigma.

**Culture and Differentiation of 3T3-442A Cells**—NIH-3T3-442A cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% calf serum in 5% humidified CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were differentiated in 10% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum for 12 days or so otherwise indicated. The differentiation was accelerated by the addition of 5  $\mu$ g/ml insulin for the first 8 days. By the end of this period, 90–95% of the cells acquired a characteristic adipocyte morphology accumulating a large number of lipid droplets. Insulin was removed from the culture media during the last 4 days of culture in an effort to enhance any insulin-induced nuclear signals.

**<sup>32</sup>P Labeling of 3T3-442A Cells**—Cells were serum starved for 18 h, then the cell culture medium was changed to phosphate-free Dulbecco's modified Eagle's medium, and cells were incubated with 0.3 mCi/ml [<sup>32</sup>P]phosphate for 2 h. After the addition of insulin or other stimulants at concentrations specified in the individual experiments, the medium was removed, and the cells were scraped to an isolation buffer containing 20 mM HEPES, 1 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mg/ml aprotinin, 50  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM sodium vanadate, 1 mM sodium molybdate, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 5 mM sodium pyrophosphate, 0.25 M sucrose, pH 7.4. In agreement with previous findings (16), preliminary experiments showed that the addition of leupeptin to the isolation buffer was necessary to prevent the excessive proteolysis of nucleolin.

Cells were disrupted by the method of Lee *et al.* (17) passing them four to five times through a 1-ml tuberculin-syringe with a micro-fine-IV needle. Cell nuclei were isolated by the method of Blobel and Potter (18). Samples were centrifuged at 3,000  $\times$  g for 15 min at 4 °C, and the supernatants were transferred to Eppendorf tubes. Fat was wiped from the walls of the centrifuge tubes with cotton-tipped applicators, pellets were resuspended in 1 ml of isolation buffer, and 2 ml of isolation buffer supplemented with 1.6 M sucrose was layered under them. After a centrifugation at 100,000  $\times$  g for 35 min at 4 °C nuclei were resuspended in 0.5 ml of isolation buffer. The nuclear preparation was 90–95% pure, and the nuclei were more than 95% intact as judged by marker enzyme analysis and electronmicrography (data not shown).

**Immunoprecipitations**—Proteins were extracted from aliquots of both intact <sup>32</sup>P-labeled cell nuclei and the postnuclear supernatant by addition of 400 units of DNase I, 500 units of RNase, 0.6 M NaCl, and 0.5% (v/v) Triton X-100. The extracts were precleared by the simultaneous addition of 0.1 mg of rabbit  $\gamma$ -globulin and 50  $\mu$ l of protein A-beads. Samples were rotated overnight at 4 °C, centrifuged in a microfuge, and the protein concentration of the supernatants was determined according to Bradford (19). Anti-nucleolin serum (5  $\mu$ g) was added to aliquots of protein extracts containing 0.5 mg of protein, and the samples were incubated overnight at 4 °C. The immunocomplexes were adsorbed to 30  $\mu$ l of protein A-beads by slow mixing for 2 h at 4 °C. Immunoprecipitates were washed successively with 1 ml each of buffers containing 50 mM HEPES, pH 7.4, supplemented with 0.1% (w/v) SDS, 1% (v/v) Triton X-100, and 0.1% (v/v) Triton X-100, respectively. The final pellets were eluted with Laemmli buffer (20) containing 100 mM DTT. Samples were boiled for 3 min, centrifuged in a microfuge, and the supernatants were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The results were quantified by a Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA) 300A computing densitometer. The level of significance, *p*, was determined using the Student's *t* test.

**Purification of Double-stranded DNA-binding Proteins**—DNA-cellulose chromatography was performed as described by Alberts and Herrick (21). Briefly, the protein concentration of <sup>32</sup>P-labeled cell nuclei was determined according to Bradford (19). Nuclear proteins were then extracted from aliquots of nuclei containing 0.5 mg of protein each by addition of 0.6 M NaCl and 0.5% Triton X-100. Samples were rotated for 2 h at 4 °C, centrifuged in a microfuge, and the supernatants were removed and diluted 10 times with a buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% Triton X-100, and 10% glycerol. Approximately 20 mg of double-stranded DNA-cellulose (dsDNA-cellulose) was added, and samples were rotated for 4 h at 4 °C. After washing two times with 1 ml of the same HEPES/Triton/glycerol buffer, 30  $\mu$ l of Laemmli sample buffer with 100 mM DTT (19) was added to each sample, and the samples were analyzed with SDS-PAGE and autoradiography.

**Phosphoamino Acid Analysis**—Phosphoamino acid analysis was carried out by the method of Cooper *et al.* (22). The 94-kDa nucleolin phosphoprotein band was excised from the polyacrylamide gel, soaked in 20% methanol, digested with the addition of 2  $\times$  100  $\mu$ g of TPCK-trypsin in 50 mM ammonium carbonate for 24 h at 37 °C. The tryptic digest was lyophilized and hydrolyzed in constant boiling 6 N HCl at 110 °C for 70 min. The hydrolysates were washed with 2  $\times$  1 ml of distilled water and subjected to electrophoresis on thin layer chromatography plates at pH 3.5. Plates were dried, stained with ninhydrin, and analyzed by autoradiography.

**Measurement of RNA Efflux from Isolated Nuclei**—Release of RNA was measured according to the method of Agutter *et al.* (23). After differentiation, serum-starved 3T3-442A cells were incubated with 10 mCi/ml [<sup>3</sup>H]uridine for 30 min. In the last 15 min of incubation, insulin was added to the dishes at various final concentrations. Cell nuclei were isolated as described above with the only difference that ATP was not included in the isolation buffer. After ultracentrifugation nuclei were suspended in 0.5 ml of RNA buffer containing 50 mM HEPES, pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM spermidine, 2 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.3 mM MnCl<sub>2</sub>, 300  $\mu$ g/ml yeast RNA, and 0.25 M sucrose. The protein concentration of the samples was determined according to Bradford (19).

The release of RNA was measured from aliquots of nuclei containing 0.5 mg of protein each in a final volume of 0.25 ml of RNA buffer supplemented with 2.5 mM ATP. Nuclei were incubated for 15 min at 37 °C. Preliminary experiments showed that the efflux of RNA was linear up to 30 min of incubation. The efflux was terminated by pelleting the nuclei in a microfuge. To the supernatants, 0.25 ml of 50% trichloroacetic acid was added, the precipitate was centrifuged, and the [<sup>3</sup>H]uridine in RNA was measured by liquid scintillation counting. The level of significance, *p*, was determined using the Student's *t* test.

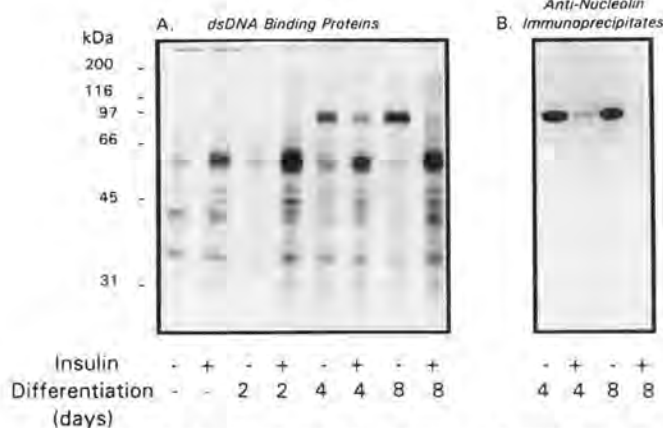
**Immunoblots**—Non-radioactive nuclei were isolated, nucleolin was immunoprecipitated from aliquots of the nuclear fraction, and the postnuclear supernatant and the immunocomplexes were purified and separated with SDS-PAGE as described above. The proteins were transferred to nitrocellulose filters according to the method of Towbin (24) in a transfer buffer containing 25 mM Tris, 0.192 M glycine, and 20% (v/v) methanol. Filters were soaked in a 20 mM Tris, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.5% (v/v) Tween 20, 0.1% bovine serum albumin blocking buffer for 1 h at room temperature. After overnight incubation with a 1:200 dilution of rabbit anti-nucleolin serum at 4 °C, the immunocomplexes were visualized by means of peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies and subsequent treatment with 4-chloro-1-naphthol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## RESULTS

**Concentration Dependence of Insulin-induced Phosphorylation and Dephosphorylation of Nucleolin**—Insulin induces the phosphorylation of several nuclear proteins in 3T3-442A cells which are able to bind to double-stranded DNA-cellulose (dsDNA-cellulose).<sup>1,2</sup> In the experiment shown in Fig. 1, there is a marked insulin-induced phosphorylation of one 48-kDa and four 62–66-kDa proteins. There is a faint phosphorylation of a band at 34 and 40 kDa. The phosphorylation of these proteins shows little variation with the differentiation of 3T3-442A cells to adipocytes. Examination of the Coomassie Blue-stained gel reveals no identifiable abundant proteins of these molecular weights nor a significant change in the amount of protein migrating in these areas after insulin addition which suggests that the phenomenon observed is not simply due to a change in the affinity of some abundant protein toward dsDNA (data not shown). In separate experiments we obtained evidence that a significant component of the insulin-induced dsDNA-binding phosphoproteins around 62–66 kDa are isoforms of lamin C<sup>1</sup>. The phosphoprotein band at 40 kDa may correspond to numatrin (B23) which has been recently identified as an insulin-induced DNA-binding phosphoprotein (9, 25).

In nuclei of non-stimulated cells which have been allowed to differentiate for 4–8 days, there is a phosphoprotein of about 94 kDa which binds to dsDNA (Fig. 1A). Incubation of cells with insulin (1  $\mu$ M) for 15 min induced a dephosphoryl-





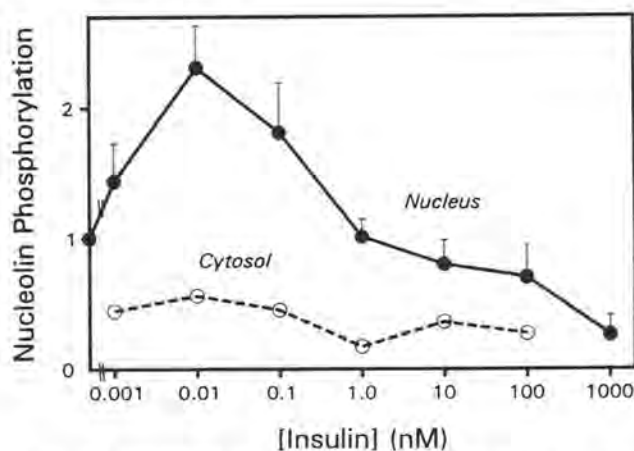
**FIG. 1. Insulin-induced phosphorylation of double-stranded DNA-binding nuclear proteins.** 3T3-442A cells were differentiated as described under "Materials and Methods." The differentiation of cells was enhanced by the addition of 5  $\mu$ g/ml insulin for times indicated. After removal of insulin and serum starvation and labeling with [ $^{32}$ P]phosphate for 2 h, cells corresponding to even lanes (marked +) were treated with 1  $\mu$ M insulin for 15 min.  $^{32}$ P-labeled nuclei were isolated from each sample, and 0.5 mg of nuclear proteins were extracted with 0.6 M NaCl and 0.5% Triton X-100 (see "Materials and Methods" for details). Protein extracts were diluted 10 times with a buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% Triton X-100, and 10% glycerol. Approximately 20 mg of dsDNA-cellulose was added, and samples were rotated for 2 h at 4  $^{\circ}$ C. After extensive washing samples were analyzed with SDS-PAGE and consequent autoradiography. In the experiment shown in panel B, proteins were eluted from dsDNA-cellulose with 0.6 M NaCl and immunoprecipitated with anti-nucleolin antibodies as described under "Materials and Methods." Panel A, dsDNA-binding nuclear phosphoproteins; Panel B, dsDNA-binding nuclear phosphoproteins immunoprecipitated with anti-nucleolin antibodies.

ation of this protein. This phenomenon was strongly dependent on the status of differentiation of 3T3-442A cells, the 94-kDa protein being more prominent and the insulin effect more evident in cells only after several days of differentiation. Nucleolin (C23) is an abundant nuclear phosphoprotein which is able to bind to DNA and migrates approximately 92–110 kDa on SDS gels (11, 13, 14). When the dsDNA-binding phosphoproteins from the 4- and 8-day differentiated samples of Fig. 1A were eluted with 0.6 M NaCl, immunoprecipitated with anti-nucleolin antibodies and subjected to SDS-PAGE, most of the 94-kDa phosphoprotein band was recovered in the immunoprecipitates indicating that this band primarily represents phosphorylated nucleolin (Fig. 1B).

Detailed experiments showed that the concentration dependence of insulin-induced changes in nucleolin phosphorylation were biphasic (Fig. 2). At subnanomolar concentrations insulin induced a more than 2-fold increase in the phosphorylation of the 94-kDa immunoprecipitable nucleolin, while at high (micromolar) concentrations of insulin, a 70% decrease in the phosphorylation was observed (Fig. 2). Both the increase and decrease in the phosphorylation of nucleolin at  $10^{-11}$  M and  $10^{-6}$  M insulin concentrations, respectively, are significantly different from the control level at  $p < 0.001$  as determined by Student's *t* test.

The amount of phosphorylated nucleolin in the postnuclear supernatant (open circles in Fig. 2) was relatively minor compared to that in nucleus and did not show significant changes after insulin addition. This low amount of phosphorylation was due to the low amount of non-nuclear nucleolin as judged by immunoblotting of non-nuclear protein extracts with anti-nucleolin antibodies (data not shown).

Nucleolin is very sensitive to proteolysis most of which can



**FIG. 2. Concentration dependence of insulin-induced nucleolin phosphorylation.** 3T3-442A cells were differentiated, serum starved, and labeled with [ $^{32}$ P]phosphate as described under "Materials and Methods." Cells were treated with insulin at final concentrations indicated for 15 min. Proteins were extracted from both isolated cell nuclei and the postnuclear supernatant by addition of 400 units of DNase I, 500 units of RNase, 0.1 mg of rabbit  $\gamma$ -globulin, 50  $\mu$ l of protein A-beads, NaCl, and Triton X-100 at final concentrations of 0.6 M and 0.5% (v/v), respectively. To aliquots of protein extracts containing 0.5 mg of protein each, 5  $\mu$ g of anti-nucleolin serum was added, and the samples were incubated overnight at 4  $^{\circ}$ C. The immunocomplexes were adsorbed to 30  $\mu$ l of protein A-beads by rotating them for 2 h at 4  $^{\circ}$ C. Immunoprecipitates were washed and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The 94-kDa nucleolin bands were quantified by densitometry. In case of nuclear nucleolin data are mean  $\pm$  S.D. of four separate experiments (filled circles); data representing the nucleolin band of the postnuclear supernatant (open circles) are representative of two separate experiments. In the other two experiments, the cytosolic nucleolin band was too faint to allow quantification.

be prevented by the protease inhibitor leupeptin (16, 27, 28). If the isolation and extraction of nuclei were performed in the absence of leupeptin, only a minor portion of the 94-kDa phosphoprotein band could be detected. Even in the presence of leupeptin, we regularly observed an 80-, a 72-, and a 34-kDa phosphoprotein band in the immunoprecipitates which were minor, however, compared to the 94 kDa band. Since these phosphoproteins showed changes similar to those of the 94-kDa phosphoprotein after insulin addition they most likely represent proteolytic fragments of nucleolin (data not shown).

**Time Course of Insulin-induced Nucleolin Phosphorylation**—The time course of insulin-induced nucleolin phosphorylation using 0.01 nM insulin is shown in Fig. 3. The phosphorylation was rapid with half-maximal stimulation observed at 4 min and a maximum after 15 min of incubation with insulin. The insulin-induced nucleolin phosphorylation remained steady until 30 min, then declined after 60 min of incubation (Fig. 3).

**Phosphoamino Acid Analysis of Nucleolin**—Insulin induced the phosphorylation of nucleolin on serine residues (Fig. 4). When the 94 kDa band was cut from the gel and hydrolyzed, phosphoserine was the only detectable phosphoaminoacid in nucleolin immunoprecipitates from 3T3-442A cells (Fig. 4). This was true of both insulin-stimulated and control cells.

**Effect of Insulin-like Growth Factor I and a Casein Kinase II Inhibitor on Insulin-induced Nucleolin Phosphorylation**—Since 3T3-442A cells have IGF-1 receptors, and insulin is well-known to cross-react with these receptors at high, micromolar concentrations (28), we analyzed the effect of IGF-1 on the phosphorylation of nucleolin. In contrast to insulin, IGF-1 failed to stimulate the phosphorylation of nucleolin. However, IGF-1 did induce the dephosphorylation of nucleolin at



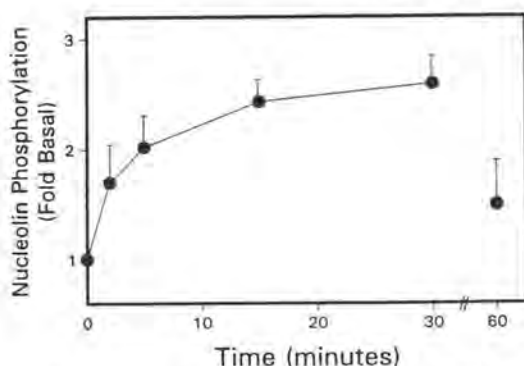


FIG. 3. Time course of insulin-induced nucleolin phosphorylation. 3T3-442A cells were differentiated, serum starved, and labeled with [ $^{32}$ P]phosphate as described under "Materials and Methods." Cells were treated with 0.01 nM insulin for times indicated. Cellular proteins were extracted and immunoprecipitated with anti-nucleolin antibodies as described in the legend of Fig. 2. The 94-kDa nucleolin bands were separated by SDS-PAGE, and the autoradiograms were subjected to densitometric analysis. Data are mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments.

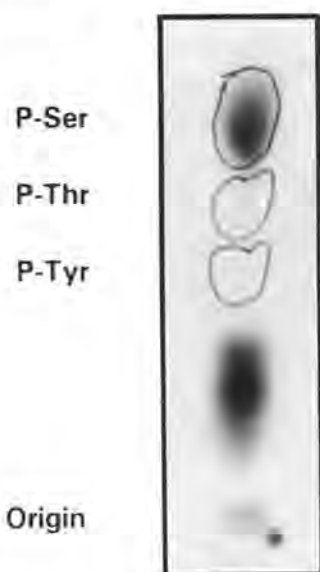


FIG. 4. Phosphoamino acid analysis. 3T3-442A cells were differentiated, serum starved, labeled with [ $^{32}$ P]phosphate, and treated with 0.01 nM insulin for 15 min. The insulin-induced 94-kDa nucleolin phosphoprotein band was cut from the SDS gel, and its phosphoamino acid composition was analyzed as described under "Materials and Methods." Data are representatives of two separate phosphoamino acid determinations.

nanomolar concentrations (Table I), at the same range where it stimulates glucose uptake in the closely related 3T3-L1 adipocytes (28). The extent of IGF-1-induced nucleolin dephosphorylation was similar to the amount of insulin-induced dephosphorylation at micromolar insulin concentrations. In addition, incubation of cells with insulin and IGF-1 at concentrations of insulin (0.01 nM) which stimulate nucleolin phosphorylation and concentrations of IGF-1 (1 nM) which cause dephosphorylation results in an overall decrease in nucleolin phosphorylation. This effect is also observed when higher concentrations of both hormones are present.

As indicated above, IGF-1 and high concentrations of insulin induce the dephosphorylation of nucleolin. Since insulin is known to induce the activities of protein phosphatases 1 and 2A (7, 29, 30) we were interested in determining which protein phosphatase may be responsible for the dephospho-

TABLE I

Effect of insulin-like growth factor I and a specific, cell-permeable inhibitor of casein kinase II on the insulin-induced nucleolin phosphorylation

3T3-442A cells were differentiated, serum starved, and labeled with [ $^{32}$ P]phosphate as described under "Materials and Methods." Cells were treated with various agents indicated in the table for 15 min. Cellular proteins were extracted and immunoprecipitated with anti-nucleolin antibodies as described in the legend of Fig. 2. The 94-kDa nucleolin bands were separated by SDS-PAGE and the autoradiograms were subjected to densitometric analysis. Data are mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments.

Treatment	Phosphorylation of nucleolin -fold of control
Control	1.0 $\pm$ 0.1
+ Insulin	
0.01 nM	2.4 $\pm$ 0.2
1 $\mu$ M	0.4 $\pm$ 0.2
+ IGF-1	
0.1 nM	0.9 $\pm$ 0.1
1 nM	0.6 $\pm$ 0.2
10 nM	0.4 $\pm$ 0.2
+ Insulin/IGF-1	
0.01 nM, 1 nM	0.6 $\pm$ 0.1
1 nM, 10 nM	0.7 $\pm$ 0.1
+ DRB (5 mM)	0.8 $\pm$ 0.1
+ DRB/insulin (5 mM, 0.01 nM)	1.1 $\pm$ 0.2

rylation of nucleolin. However, we failed in our attempts to prevent the insulin-induced dephosphorylation of nucleolin by okadaic acid, a known inhibitor of these phosphatases (31). Trifluoperazine, an inhibitor of protein phosphatase 2B (31) was also without any effect (data not shown).

Nucleolin is a good *in vitro* and *in vivo* substrate of casein kinase II (32, 33). Since insulin is known to induce this kinase in 3T3-L1 cells (30), a cell line closely related to 3T3-442A cells, we examined if a cell-permeable, specific inhibitor of casein kinase II, 5,6-dichlorobenzimidazole-riboside (DRB, 35) might be able to inhibit the insulin-induced phosphorylation of nucleolin. Treatment of 3T3-442A cells with DRB caused only a slight decrease in the phosphorylation of nucleolin in control cells (the level of significance,  $p < 0.05$ ). More importantly, however, DRB efficiently prevented the insulin-induced increase of nucleolin phosphorylation ( $p < 0.005$ , Table I).

**Insulin-induced RNA Efflux from Intact Nuclei**—Since nucleolin is suspected to be involved in the transport of RNA through the nuclear membrane (12, 13) and insulin has been shown to induce the release of RNA from rat hepatocytes nuclei (5, 36), we investigated the possibility that insulin induced similar changes in RNA efflux from the nuclei of differentiated 3T3-442A cells. As is shown in Fig. 5, insulin induced a substantial increase in the efflux of RNA at sub-nanomolar concentrations (the level of significance,  $p < 0.005$  at  $10^{-11}$  M insulin concentration). The RNA efflux returned to the control levels with insulin in the nanomolar range and slightly declined at micromolar insulin concentrations (although this was not statistically significant). The RNA efflux is ATP dependent since only a minor fraction of the radioactive RNA observed in the trichloroacetic acid precipitates of the incubation medium is observed without ATP. The RNA released was not preferentially enriched in polyadenylated RNA and exhibited a very low level of binding to poly(U)-Sephacryl (data not shown).

## DISCUSSION

Nucleolin (C23) is a 92-110-kDa nucleolar protein thought to be involved in the regulation of polymerase I transcription, binding, packaging, and transport of ribosomal RNA (11-13).



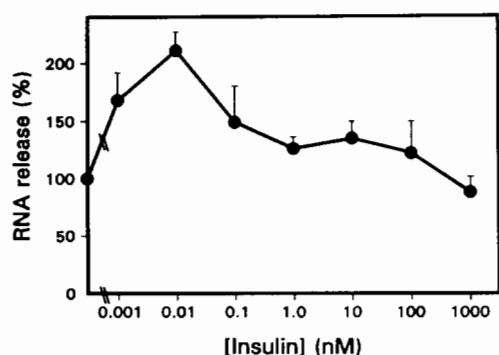


FIG. 5. Concentration dependence of insulin-induced nuclear RNA efflux. 3T3-442A cells were differentiated, serum starved, and labeled with [ $^3$ H]uridine as described under "Materials and Methods." Cells were incubated with insulin at final concentrations indicated for 15 min. RNA efflux was measured from isolated cell nuclei in 0.5 ml of RNA buffer containing 50 mM HEPES, pH 7.4, 25 mM KCl, 5 mM spermidine, 2 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.3 mM MnCl<sub>2</sub>, 2.5 mM ATP, 300  $\mu$ g/ml yeast RNA, and 0.25 M sucrose for 15 min at 37 °C. Nuclei were pelleted by rapid centrifugation, [ $^3$ H]uridine-labeled RNA was precipitated with trichloroacetic acid from the supernatant, and its radioactivity was measured by liquid scintillation counting. Basal RNA efflux was  $12 \pm 3\%$  of total nuclear radioactivity. Data are mean  $\pm$  S.D. of three separate experiments.

A number of studies indicate that the phosphorylation and dephosphorylation of nucleolin may play a role in the regulation of these processes (12, 16, 26). In the present study we report that insulin, which induces the activation of a cascade of protein kinases and phosphatases (6, 7), elevates the serine phosphorylation of nucleolin at subnanomolar concentrations, while it effectively promotes the dephosphorylation of nucleolin at the micromolar concentration range. The dose-response of the phosphorylation and dephosphorylation of nucleolin is almost identical with the insulin-induced effects on the RNA efflux from isolated nuclei suggesting that insulin-induced phosphorylation and dephosphorylation of nucleolin may be a regulator of (ribosomal) RNA transport through the nuclear membrane.

Insulin promotes the phosphorylation of a 94-kDa nuclear protein in differentiated 3T3-442A cells which is recognized by anti-nucleolin antibodies, binds to dsDNA, and in the absence of leupeptin has proteolytic products of similar mobility on SDS gels as purified nucleolin. These observations strongly suggest that the insulin-induced 94-kDa phosphoprotein is identical with nucleolin (C23). During the preparation of this article, Suzuki *et al.* (37) reported that insulin, epidermal growth factor, and dexamethasone synergistically induce the phosphorylation of nucleolin in rat hepatocytes. However, in these experiments, insulin was always present at high concentrations (100 nM) and in the presence of epidermal growth factor and/or dexamethasone. In addition, these changes in nucleolin phosphorylation were observed only following long term (8 h) incubations. In the present study we have shown that insulin alone has dramatic short term effects.

The dose-response of insulin-induced nucleolin phosphorylation and dephosphorylation is rather unusual. Half-maximal phosphorylation of nucleolin is achieved at concentrations of insulin below 0.01 nM. The dissociation constant of insulin binding to its receptors in the plasma membrane is 4 nM in the closely related differentiated 3T3-L1 cells, and insulin induces half-maximal uptake of deoxyglucose at similar concentrations (28, 38). The mechanism of this marked amplification of insulin action on the phosphorylation of this nuclear

protein is not known; however, insulin also induces many of its other nuclear effects, including stimulation of RNA efflux and nucleoside triphosphatase activity and alterations of specific genes such as PEPCK, in the picomolar concentration range (5, 39, 40).

Micromolar concentrations of insulin induce the dephosphorylation of nucleolin. Since IGF-1 has a similar effect at nanomolar concentrations, insulin may be acting via IGF-1 receptors at these high concentrations. When cells are treated with both hormones at concentrations of insulin which stimulate nucleolin phosphorylation and low nanomolar concentrations of IGF-1, there is a net decrease in nucleolin phosphorylation. While insulin and IGF-1 appear to have distinct differences with respect to phosphorylation of nucleolin, both hormones have similar effects on the phosphorylation and dephosphorylation of pp160/insulin receptor substrate-1, a primary cytosolic substrate of these receptors in 3T3-L1 adipocytes (41, 51).

Insulin induces the activation of a cascade of protein kinases including casein kinase II (6, 34). Casein kinase II preferentially phosphorylates nucleolin both *in vitro* and *in vivo* on serine residues (32, 33). Our observation that the cell-permeable casein kinase II inhibitor, 5,6-dichlorobenzimidazole-riboside (DRB, 35) prevents the insulin-induced serine-phosphorylation of nucleolin suggests that this effect may be mediated by casein kinase II. Recently, the phosphorylation of nucleolin by cdc2 kinase was also reported (42, 43). However, cdc2 kinase phosphorylates nucleolin on threonine residues, and nucleolin does not seem to be a preferential substrate of cdc2 kinase in whole nuclear extracts of NIH 3T3 fibroblasts overexpressing the insulin receptor (44). Furthermore, the cdc2 kinase is not involved in the insulin-induced phosphorylation of another closely related nucleolar protein, numatrin (9). These observations suggest that the effect of cdc2 kinase may be restricted to mitosis, and during interphase the phosphorylation of nucleolin is mediated by casein kinase II.

Casein kinase II may be also involved in basal phosphorylation of nucleolin (32, 33). This possibility is not refuted by the observation that the casein kinase II inhibitor, DRB caused only a slight decrease in phosphorylation of nucleolin in non-stimulated 3T3-442A cells (Table I), since the 15 min of DRB incubation was much shorter than the 2 h of  $^{32}$ P labeling. Casein kinase II is induced during differentiation of 3T3-L1 cells (45). This induction may explain the increase of phosphorylation of nucleolin during differentiation of the closely related 3T3-442A cells (see Fig. 1). This assumption is further supported by the fact that the level and activity of casein kinase II are the limiting factors in the phosphorylation of nucleolin (46) and casein kinase II activity changes parallel with phosphorylation of nucleolin in growth of human cell cultures and HeLa cells (47).

The mechanism of IGF-1 and high concentrations of insulin to induce the dephosphorylation of nucleolin are less clear. We did not observe any significant recovery of the phosphonucleolin in the presence of okadaic acid or trifluoroperoxide, inhibitors of protein phosphatases 1, 2A, and 2B, respectively. These results do not necessarily mean that the IGF-1- and insulin-induced dephosphorylation of nucleolin is mediated via different protein phosphatases since the high fat content of adipocytes may significantly diminish the effective concentration of these lipophilic inhibitors (29) and the *in vitro* dephosphorylation of nucleolin is rather difficult with any of protein phosphatases 1, 2A, 2B, or 2C (48). We might observe a decrease in the nucleolin-associated  $^{32}$ P label if high concentrations of insulin and IGF-1 induced the proteolytic cleavage



of a small, phosphorylated fragment of the protein from its COOH or NH<sub>2</sub> termini. This explanation seems rather unlikely, however, since nucleolin is phosphorylated on multiple sites both *in vitro* and *in vivo* (32, 33, 49).

The dose-response curves of insulin-induced nucleolin phosphorylation and nuclear RNA efflux are almost identical (*cf.* Figs. 2 and 5). This suggests that insulin may regulate the nuclear RNA efflux via changing the phosphorylation status of nucleolin which is thought to participate in packaging and transport of ribosomal RNA (11–13). The RNA released is not polyadenylated and does not bind to poly(U)-Sepharose, suggesting that it contains a significant amount of ribosomal RNA. Picomolar concentrations of insulin have been shown to induce the release of messenger RNA from the nucleus, an effect which appears to be mediated by the dephosphorylation and activation of the nuclear envelope nucleoside triphosphatase-mRNA carrier complex (5, 39, 50). Thus, it is possible that insulin induces the release of mRNA and rRNA via different mechanisms, the former by dephosphorylation of the mRNA carrier and the latter by phosphorylation of the "rRNA carrier" nucleolin. Alternatively, the similarity in the nucleolin phosphorylation and RNA efflux curves simply reflect a correlation between nucleolin phosphorylation and the rate of ribosome assembly, including preribosomal RNA transcription. It is likely that the RNA exiting the nucleus is in the form of ribosome subunits. Thus, it is possible that insulin-regulated nucleolin phosphorylation is involved with the earlier stages of ribosome assembly rather than the later, transport stages.

In summary, the data of this study provide direct evidence for effects of insulin at the cell nucleus which occur through a propagated cascade of phosphorylation and dephosphorylation. Further studies may reveal a strict subnuclear compartmentalization of insulin-induced nuclear protein kinases and phosphatases and may provide insight as to the role of these phosphorylation events in the effects of insulin on cell growth, differentiation, and gene expression.

**Acknowledgments**—We thank Drs. Bruce M. Spiegelman and Robert J. Distel (Dana Farber Cancer Research Institute, Boston MA) for the 3T3-442A cell line. P. C. is thankful to Drs. Anna Faragó and János Somogyi (Semmelweis University, School of Medicine, Budapest, Hungary) for helpful discussions.

#### REFERENCES

- Rosen, O. M. (1987) *Science* **237**, 1452–1458
- Kahn, C. R., and White, M. F. (1988) *J. Clin. Invest.* **82**, 1151–1156
- O'Brien, R. M., and Granner, D. K. (1991) *Biochem. J.* **278**, 609–619
- Schindler, M., and Jiang, L. (1987) *J. Cell Biol.* **104**, 849–853
- Purrello, F., Burnham, D. B., and Goldfine, I. D. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 1189–1193
- Czech, M. P., Klarlund, J. K., Yagaloff, K. A., Bradford, A. P., and Lewis, R. E. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 11017–11020
- Chan, C. P., McNall, S. J., Krebs, E. G., and Fischer, E. H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6257–6261
- Friedman, D. L., and Ken, R. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 1103–1106
- Feuerstein, N., and Randazzo, P. A. (1991) *Exp. Cell Res.* **194**, 289–296
- Olson, M. O. J., Orrick, L. R., Jones, C., and Busch, H. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 2823–2827
- Herrera, A. H., and Olson, M. O. J. (1986) *Biochemistry* **25**, 6258–6264
- Jordan, G. (1987) *Nature* **329**, 489–490
- Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M., and Nigg, E. A. (1989) *Cell* **56**, 379–390
- Olson, M. O. J., Rivers, Z. M., Thompson, B. A., Kao, W.-K., and Case, S. T. (1983) *Biochemistry* **22**, 3345–3351
- Olson, M. J. O., Guetzkow, K., and Busch, H. (1981) *Exp. Cell Res.* **135**, 259–265
- Bouche, G., Caizergues-Ferrer, M., Bugler, B., and Amalric, F. (1984) *Nucl. Acids Res.* **12**, 3025–3035
- Lee, K. A. W., Bindereif, A., and Green, M. R. (1988) *Gene Anal. Technol.* **5**, 22–31
- Blobel, G., and Potter, V. R. (1966) *Science* **154**, 1662–1664
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
- Alberts, B., and Herrick, G. (1971) *Meth. Enzymol.* **20**, 198–217
- Cooper, J. A., Sefton, B. M., and Hunter, T. (1983) *Meth. Enzymol.* **99**, 387–402
- Agutter, P. S., McCaldin, B., and McArdle, H. J. (1979) *J. Biochem.* **182**, 811–819
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354
- Feuerstein, N., Mond, J. J., Kinchington, P. R., Hickey, R., Karjalainen-Lindsberg, M.-L., Hay, I., and Ruyechan, W. T. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1087**, 127–136
- Bourbon, H., Bugler, B., Caizergues-Ferrer, M., and Amalric, F. (1983) *FEBS Letters* **155**, 218–222
- Chen, C.-M., Chiang, S.-Y., and Yeh, N.-H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 7754–7758
- Kohanski, R. A., Frost, S. C., and Lane, M. D. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 12272–12281
- Haystead, T. A. J., Weiel, J. E., Litchfield, D. W., Tsukitani, Y., Fischer, E. H., and Krebs, E. G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 16571–16580
- Klarlund, J. K., Jaspers, S. R., Khalaf, N., Bradford, A. P., Miller, T. B., and Czech, M. P. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4052–4055
- Cohen, P. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 453–508
- Caizergues-Ferrer, M., Belenguer, P., Lapeyre, B., Amalric, F., Wallace, M. O., and Olson, M. O. J. (1987) *Biochemistry* **26**, 7876–7883
- Schneider, H. R., and Issinger, O.-G. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 1390–1397
- Sommercorn, J., Mulligan, J. A., Lozeman, F. J., and Krebs, E. G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 8834–8838
- Zandomeni, R., and Weinmann, R. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 14804–14811
- Schumm, D. E., and Webb, T. E. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **210**, 275–279
- Suzuki, N., Kobayashi, M., Sakata, K., Suzuki, T., and Hosoya, T. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1092**, 367–375
- Rosen, O. M., Smith, C. J., Hirsch, A., Lai, E., and Rubin, C. S. (1979) *Recent Progr. Hormone Res.* **35**, 477–499
- Purrello, F., Vigneri, R., Clawson, G. A., and Goldfine, I. D. (1982) *Science* **216**, 1005–1007
- Andreone, T. L., Beale, E. G., Bar, R. S., and Granner, D. K. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 35–38
- Madoff, D. H., Martensen, T. M., and Lane, M. D. (1988) *Biochem. J.* **252**, 7–15
- Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J. C., and Nigg, E. A. (1990) *Cell* **60**, 791–801
- Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Labbé, J. C., Dorée, M., and Amalric, F. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 3607–3618
- Feuerstein, N. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16200–16206
- Sommercorn, J., and Krebs, E. G. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 3839–3843
- Belenguer, P., Baldin, V., Mathieu, C., Prats, H., Bensaid, M., Bouche, G., and Amalric, F. (1989) *Nucl. Acid Res.* **17**, 6625–6636
- Schneider, H. R., and Issinger, O.-G. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1014**, 98–100
- Schneider, H. R., Mieskes, G., and Issinger, O.-G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**, 449–455
- Marmack, M. D., Olson, M. O. J., Busch, H. (1979) *Biochemistry* **18**, 3381–3386
- Schröder, H. C., Wenger, R., Ugarkovic, D., Friese, K., Bachmann, M., and Müller, W. E. G. (1990) *Biochemistry* **29**, 2368–2378
- Sun, X. J., Rothenberg, P., Kahn, C. R., Backer, J. M., Araki, E., Wilden, P. A., Cahill, D. A., Goldstein, B. J., and White, M. F. (1991) *Nature* **352**, 73–77