

# **Az urokortin jelátviteli útjainak és biológiai hatásának vizsgálata humán daganatos sejtvonalakban**

Doktori (PhD) értekezés

**Balogh Bálint**

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Dr. Gallyas Ferenc

Programvezető: Dr. Sétáló György

**Témavezető: Dr. Sétáló György**

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium



Pécs, 2023

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....</b>	<b>4</b>
<b>1 BEVEZETÉS.....</b>	<b>7</b>
1.1 <i>A CRF-család.....</i>	8
1.2 <i>Urokortinok.....</i>	9
1.3 <i>CRF receptorok.....</i>	11
1.4 <i>CRF receptorok által közvetített jelátvitel .....</i>	13
1.4.1 <i>Heterotrimer G-proteinek és a cAMP-PKA jelátviteli út .....</i>	13
1.4.2 <i>Mitogén-aktivált protein kináz- ERK1/2 jelátvitel .....</i>	13
1.5 <i>Daganatos sejtvonalak.....</i>	16
<b>2 CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>17</b>
<b>3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....</b>	<b>18</b>
3.1 <i>Sejttenyészet .....</i>	18
3.2 <i>MCF7 sejtek.....</i>	18
3.3 <i>HeLa sejtek.....</i>	19
3.4 <i>Reagensek .....</i>	19
3.5 <i>Western blot analízis.....</i>	20
3.6 <i>Western blot adatelemzés.....</i>	22
3.7 <i>Konfokális mikroszkópia.....</i>	22
3.8 <i>Konfokális mikroszkópia adatelemzés .....</i>	23
3.9 <i>CellTiter-Glo 2.0 ATP-esszé .....</i>	24

3.10	<i>ATP-esszé adatelemzés</i> .....	24
3.11	<i>MTT sejtproliferációs és életképességi vizsgálat</i> .....	25
3.12	<i>MTT-esszé adatelemzés</i> .....	25
<b>4</b>	<b>EREDMÉNYEK</b> .....	<b>26</b>
4.1	<i>CRF receptorok expressziójának vizsgálata MCF7 sejtekben</i> .....	26
4.2	<i>CRF receptorok lokalizációjának vizsgálata MCF7 sejtekben</i> .....	26
4.3	<i>Humán urokortin által indukált ERK1/2 aktiváló foszforiláció időkinetikája MCF7 sejtekben</i> .....	27
4.4	<i>HU-indukált ERK1/2 aktiváló foszforiláció dóziszfüggésének vizsgálata MCF7 sejtekben</i> .....	29
4.5	<i>MEK inhibitor U0126 hatásának vizsgálata HU-kezelt MCF7 sejtekben</i> .....	31
4.6	<i>PKA gátló H89 hatásának vizsgálata HU-kezelt MCF7 sejtekben</i> .....	33
4.7	<i>CRF receptor 1 és 2 gátlás hatása MCF7 sejtekben</i> .....	34
4.8	<i>Az aktivált ERK1/2 fehérje sejten belüli lokalizációjának vizsgálata MCF7 sejtekben</i> .....	37
4.9	<i>ATP-szint mérés HU kezelt MCF7 sejtekben</i> .....	39
4.10	<i>HU kezelés MCF7 sejtek proliferációjára gyakorolt hatásának vizsgálata MTT-esszével</i> .....	40
4.11	<i>HU-stimulált retinoblasztóma (Rb) fehérje foszforiláció MCF7 sejtekben</i> .....	42
4.12	<i>HU kezelés stimulálja az E2F-1 fehérje expresszióját MCF7 sejtekben</i> .....	44
4.13	<i>HU kezelés stimulálja a PKB/Akt fehérje foszforilációját MCF7 sejtekben</i> .....	46

4.14	<i>CRFR expresszió vizsgálata HeLa sejtekben</i> .....	47
4.15	<i>CRFR1 és CRFR2 lokalizáció HeLa sejtekben immunfluoreszcenciával</i> .....	48
4.16	<i>HU-stimulált ERK1/2 foszforiláció időkinetikája HeLa sejtekben</i> .....	49
4.17	<i>HU-indukált ERK1/2 foszforiláció koncentráció függésének vizsgálata HeLa sejtekben</i> .....	51
4.18	<i>MEK gátlása HU-kezelt HeLa sejtekben</i> .....	52
4.19	<i>A pERK1/2 intracelluláris lokalizációja HU-kezelt HeLa sejtekben</i> .....	53
4.20	<i>CRF receptorok szelektív gátlása HeLa sejtekben</i> .....	55
4.21	<i>HU-stimulált E2F-1 fehérje expresszió HeLa sejtekben</i> .....	58
4.22	<i>PKB/Akt fehérje foszforilációjának vizsgálata HU-kezelt HeLa sejtekben</i> .....	59
4.23	<i>HU kezelés csökkenti a p53 fehérje szintet HeLa sejtekben</i> .....	60
4.24	<i>Sejtprolifерáció mérése MTT-esszével HeLa sejtekben</i> .....	61
<b>5</b>	<b>MEGBESZÉLÉS</b> .....	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK ÉS KONGRESSZUSI ELŐADÁSOK JEGYZÉKE</b> .....	<b>89</b>
<b>10</b>	<b>MELLÉKLETEK</b> .....	<b>92</b>



## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AGS	humán gyomor adenokarcinóma sejtvonala
Ant	Antalarmin, CRFR1 inhibitor
A2b	Astressin2b, CRFR2 inhibitor
ATP	Adenozin trifoszfát
ATCC	Amerikai Típusú Sejtkultúra Gyűjtemény
AtT-20	egér agyalapi mirigydagánatokból származó sejtek
B16	egér melanóma sejtek
cAMP	ciklikus adenozin monofoszfát
CHO	kínai hörcsög petefészek sejtek
COS-7	majom vese fibroblaszt-szerű sejtvonala
CRE	cAMP rezponzív elem
CREB	CRE-kötő fehérje
CRF/CRH	Kortikotropin-fel szabadító faktor/hormon
CRF-BP	CRF-kötő fehérje
CRFR1 és 2	Kortikotropin-fel szabadító faktor receptor1 és 2
Cy3	fluorofór cianin festék
DMEM	Dulbecco-féle módosított Eagle médium
DMSO	dimetil-szulfoxid
E2F-1	S-fázis géneket indukáló transzkripció faktor
EGTA	etilén-glikol-tetraecetsav
ERK1/2	Extracelluláris szignál-regulált kináz1/2
G-protein	Guanin-nukleotid kötő fehérje
GPCR	G-fehérjéhez kapcsolt receptor

Gs	G-fehérje izoforma, mely stimulálja effektorát
Gq	G-fehérje izoforma, mely stimulálja effektorát
H89	PKA inhibitor
HeLa	Henrietta Lacks, humán méhnyakrák adenokarcinóma sejtek
HEK293	humán embrionális vese sejt vonal
HL-1	szívizom sejtek
HRP	torma-peroxidáz
HU	Humán Urokortin1
HU10	10 nM végkoncentrációjú HU
LNCaP	humán prosztata adenokarcinóma sejtek
LY294002	LY-294,002 hidroklorid, PI3K inhibitor
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz
MEK (1/2)	Mitogén-aktivált protein kináz /Extracelluláris szignál-regulált kináz(1/2)
MCF7	humán emlőrák eredetű sejt vonal
mRNS	messenger RNS
NA	numerikus apertúra
PBS	foszfát pufferelt sóoldat
PC12	patkány feokromocitóma sejt vonal
pERK1/2	foszforilált ERK1 és 2
PFA	paraformaldehid
PI3K	Foszfatidilinozitol 3-Kináz
PLC	Foszfolipáz C
PKA	Protein Kináz A
PKB/Akt	Protein Kináz B, vagy Akt fehérje
PKC	Protein Kináz C

PMSF	Fenil-metil-szulfonil-fluorid
pRb	foszforilált retinoblasztóma fehérje
PVDF	Polivinilidén-difluorid
p53	53 kDa molekulatömegű tumorszuppresszor fehérje
Raf-1	fehérje kináz
Rat-1	patkány fibroblaszt sejtek
RM-1	egér prosztatatarák sejtvonala
Rp-CAMPS	cAMP-függő proteinkináz inhibitora
RNS	ribonukleinsav
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
Src	tirozin specifikus protein kináz
TBS	Tris-pufferelt sóoldat
THP-1	akut monocytás leukémiából származó humán monocita sejtek
UCN	Urokortin
U0126	MEK inhibitor
Y79	humán retinoblasztóma sejtvonala

# 1 BEVEZETÉS

A sejtek környezetükkel folytonos kölcsönhatásban élnek, aminek fontos szerepe van homeosztázisuk fenntartásában. Számos extracelluláris inger éri őket, köztük mechanikai, hő, elektromos és kémiai természetűek. Ezek a külső szignálok befolyásolják az egyes sejtek közötti kommunikációt, és a többsejtű szervezet összehangolt működését. A sejtek között zajló jelátviteli folyamatok jelentős hányada kémiai anyagok közvetítésével történik (pl. növekedési faktorok, citokinek, hormonok, neurotranszmitterek), amit így kémiai jelátvitelnek, vagy szignáltranszdukciónak nevezünk. Ennek során a jeltermelő sejt jelátviteli anyagot (ligand) képez, ami valamilyen módon eléri a célsejtet és kötődik annak a ligandra specifikus receptorához. A sejtek közötti, vagy intercelluláris jelátvitelt követően a ligand receptorhoz kötődésének következtében megkezdődik a sejten belüli, vagy intracelluláris jelátvitel. A jel gyakran a sejtmagba is bejut, ami következtében ott génexpressziós változás is történhet. A kiváltott jelek eredőjeként a sejt biológiai választ ad az őt ért hatásokra.

A jeltermelő- és a célsejt egymáshoz mért térbeli viszonya alapján a kémiai jelátvitelnek több típusát különböztetjük meg. Parakrin jelátvitel során a jeltermelő- és a célsejt fizikai közelségben vannak (pl. ugyanabban a szövetben), a ligand így diffúzióval is elérheti a célsejtet. Autokrin jelátvitel során a jeltermelő- és a célsejt ugyanaz, a sejt által termelt ligand a sejtől történt kibocsátását követően a saját, sejtfelszíni receptorához kötődik. Az endokrin jelátvitel során a belső elválasztású mirigy által termelt hormon, mint ligand a véráram útján jut el a célsejthez. Mivel a ligand így nagy térfogatú folyadékterben oszlik el, végkoncentrációja rendkívül alacsony, ezért hatását nagyon érzékeny receptorok közvetítésével tudja csak kifejteni.

Elhelyezkedésük alapján a receptoroknak is több típusát különböztethetjük meg. Azok a ligandok, melyek méretük és/vagy töltésük miatt nem képesek átjutni a sejthártyán, sejtfelszíni receptorokhoz kötődnek. (Szeberényi 2004).

### **1.1 A CRF-család**

A CRF ligand családba a kortikotropin-fel szabadító faktor (angolból: CRF), az urokortinok (UCN), az urotensin I és a sauvagine tartoznak (Vuppalahadham et al., 2020). A CRF egy 41 aminosavból álló peptid, mely serkenti az agyalapi mirigy elülső részének kortikotropin szekrécióját, ami pedig a mellékvesében serkenti a glükokortikoidok bioszintézisét (Spiess et al., 1981). A CRF ligand család tagjai rendkívül változatos funkciókkal bírnak, így szerepet játszanak a hipotalamusz-agyalapi mirigy-mellékvese tengely szabályozásában, a szervezet stresszre adott válaszában, valamint az immunválasz kialakításában. Továbbá pozitív hatással vannak a kardiovaszkuláris rendszerre és modulálják a gasztrointesztinális funkciókat, vagy a gyulladásos folyamatokat emlősökben (Lewis et al., 2001; Reubi et al., 2003; Chen et al., 1993). Ezenkívül még fontos közvetítő szerepet játszanak az immunrendszer, a központi idegrendszer és az endokrin rendszer közötti kommunikációban. A CRF család neuropeptidjei és ezek kötőhelyei megtalálhatók a központi idegrendszerben, valamint perifériás szövetekben is úgy, mint a szívben, bőrben és a vázizmokban (Takahashi, 2001; Potter et al., 1994). Ez a széleskörű expresszió is tükrözi, hogy a CRF és rokon peptidjei milyen változatos szerepet játszhatnak a stresszre adott válasz endokrin, viselkedési és autonóm aspektusainak vonatkozásában, valamint olyan patofiziológiai állapotokban, mint a depresszió, a szorongás és az anorexia. (Chen et al., 1993). Az ezen rendszerek által közvetített adaptív stresszválaszok alapvető fontosságúak az egyén túlélése szempontjából. A stresszorok rövid távon anyagcsere változásokat okoznak, így biztosítva az élő rendszer alkalmazkodását a

megváltozott környezeti feltételekhez. Azonban a stressznek való tartós kitettség meg is zavarhatja a homeosztázist és akár betegségek kialakulásához is vezethet. Ezt az úgynevezett „harcolj vagy menekülj” (angolból: „fight or flight”) típusú választ a CRF-adrenokortikotróp-glükokortikoid tengely aktiválásán keresztül típusosan a CRFR1 receptor közvetíti. Ezzel szemben a CRFR2 a stresszel szembeni „megbirkózási” válaszok lebonyolításában játszik inkább szerepet (Hsu & Hsueh, 2001). A CRF család neuropeptidjei kortikotropin-felszabadító hormon/faktor receptor (CRHR/CRFR)- kötő ligandok. A CRF és az urokortinok aktivitását egy szekretált fehérje, a CRF-kötő fehérje (CRF-BP, azaz CRF-binding protein) is szabályozza, melyet eredetileg emberi májból és patkány agyból izoláltak. Fő funkciója, hogy a CRF családba tartozó számos peptid CRF receptorokhoz való hozzáférhetőségét regulálja (Boorse & Denver, 2006; Dedic et al., 2017).

## **1.2 Urokortinok**

1995-ben *Vaughan* és munkacsoportja újfajta CRFR ligandokról számoltak be. Ezt a ligandot urokortinnak nevezik, mely nagyfokú szekvencia azonosságot mutat a CRF család többi tagjával, például az urotensinnel (*Vaughan et al.*, 1995). Az urokortin egy 40 aminosavból álló peptid, génjében két exon van, melyek közül a második kódolja a teljes prekursor fehérjét (*Dautzenberg & Hauger*, 2002). Három fő típusa ismert; az urokortin1 (UCN1), UCN2 (vagy angolul stresscopin-related peptide) és az UCN3 (vagy stresscopin) (*Dedic et al.*, 2017), melyek saját, önálló kódoló szekvenciái más-más kromoszómákon helyezkednek el, de hasonló génszerkezettel bírnak (*Hauger et al.*, 2003; *Hsu & Hsueh*, 2001). Az UCN1 promóter régiójában számos transzkripciósfaktor kötőhelyet azonosítottak, mint például a TATA-box és a cAMP-reszponzív elem (CRE) enhancer régiókat (*Fekete & Zorrilla*, 2007). Az urokortin gének expressziója prekursor fehérjéket eredményez, melyek N-terminális vége szignál

peptidet tartalmaz. Ez végül, az érési folyamat során, proteolitikus hasítás áldozatául esik. Az így elkészült fehérjék C-terminális vége amidált, hosszuk 38-43 aminosav között változik (Rademaker & Richards, 2017). Ahogy a CRF családba tartozó neuropeptidek, úgy az urokortinok is rendkívül változatos expressziós mintázatot mutatnak a központi idegrendszerben, de számos perifériás szövetben is szintetizálódnak (Dedic et al., 2017; Kuperman & Chen, 2008). A 40 aminosav hosszú UCN1 túlnyomórészt az agyi Edinger Westphal magok sejtjeiben expresszálódik, ugyanakkor perifériás szövetekben is megtalálható, mint pl. a gyomor-bél rendszer, a szívizom, a herék, a csecsemőmirigy, a bőr és a lépben. A központi idegrendszerben az UCN2 a hipotalamuszban, az agytörzsben és a gerincvelőben expresszálódik. Ezenkívül a periférián a vérésejtben, a szívben és a mellékvesében fejeződik még ki a peptid. Az UCN3 a hipotalamuszban és az amygdalában termelődik, míg a környéki szövetek közül a gyomor-bél rendszer és a hasnyálmirigy sejtjei termelik (Bale & Vale, 2004; Boorse & Denver, 2006; Dedic et al., 2017). Az urokortinok, mint ligandok CRF receptorokhoz kötődnek, de eltérő affinitással. Az UCN1 *in vitro* mindkét típusú CRF receptorhoz közel azonos affinitással képes kötődni, azonban a CRFR1-hez 10-szer erősebben, mint maga a CRF (Pal et al., 2010; Vaughan et al., 1995; Perrin et al., 1995). Az UCN2 és UCN3 a CRFR2 felé mutatnak kötődési preferenciát, nagyjából hasonló affinitással, mint a CRF, bár az UCN2 magasabb koncentrációban a CRFR1 aktiválására is képes (Vaughan et al., 1995; Grammatopoulos, 2012; Takahashi, 2001; Pal et al., 2010; Hasdemir et al., 2017; Dautzenberg & Hauger, 2002). A fenti adatok kapcsán azonban fontos azt is figyelembe venni, hogy az *in vitro* mért kötési affinitás nem tekinthető feltétlen az *in vivo* hatékonyság közvetlen mutatójának, ahogy azt *Hasdemir* és munkatársai egyik munkájukban közzé is tették (Hasdemir et al., 2012).

### 1.3 CRF receptorok

A CRF családba tartozó peptidek, vagyis a CRF, az urokortinok, az urotensin és a sauvagine, B1-típusú G-protein kapcsolt receptorokat (GPCR) használnak jel továbbításra, melyeket a receptor egyetlen peptidláncának hét transzmembrán  $\alpha$ -hélice horgonyoz ki a sejtmembránba (Chang et al., 1993; Grammatopoulos, 2012; Nordström et al., 2009; Takahashi, 2001). A CRF receptorok két fő típusát különböztetjük meg. Ezeket két különböző gén kódolja, és a receptor fehérjéket CRFR1, valamint CRFR2 rövidítéssel jelöljük. A GPCR család tagjait 15 gén kódolja emberben, ligandjaik polipeptid természetű hormonok, melyek típusosan parakrin vagy autokrin módon fejtik ki a hatásukat. Ahogy nevük is tükrözi, heterotrimer G-fehérjéket használnak a jel továbbításra (Grammatopoulos, 2012). A CRFR transzkriptumán a fehérjekódoló, – úgynevezett „open reading frame” (nyitott leolvasási keret) – egység számos exon és intron, azaz fehérje kódoló és nem kódoló szekvenciát tartalmaz, ami lehetőséget teremt mRNS splice variánsok nagyszámú létrejöttére (Markovic & Grammatopoulos, 2009). Szerkezetileg a két receptor (CRFR1 és 2) aminosav sorrendje nagyjából 70%-ban azonos, az N-terminális extracelluláris doménjükben azonban nagyobb szekvencia eltérést mutatnak. Ez összhangban van többek között a receptor izoformák eltérő farmakológiai tulajdonságaival és szelektivitásukkal különböző agonistákkal szemben. Ezek a tulajdonságok pedig fontos szerepet játszanak a receptorok által közvetített fiziológias hatások szabályozásában (Grammatopoulos, 2012; Rademaker & Richards, 2017). A CRFR1-nek számos izoformája van ( $\alpha$ -h) (Rademaker & Richards, 2017), közülük azonban többről kimutatták, hogy nem funkcionálisak. A CRFR2 három ( $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$ ) izoformában expresszálódik (Catalano et al., 2003). A CRFR2 $\alpha$  és CRFR2 $\beta$  jelen van humán és rágcsáló szövetekben is, míg a CRFR2 $\gamma$ -t eddig csak emberi agy eredetű mintákban sikerült detektálni (Takahashi, 2001; Bale & Vale, 2004). A CRF receptorok eltérő affinitással kötik a CRF ligand család tagjait, amint azt már az előző alfejezetben részletesen kifejtettem (1.2). Mindkét receptor jelen van a központi



idegrendszerben, a CRFR1 azonban dominánsabb, ennek megfelelően elterjedt az agykéregben, a kisagyban, a hippokampuszban, az amygdalában és az agyalapi mirigyben is (Bale & Vale, 2004). A CRFR2 ezzel szemben túlnyomórészt a laterális septumra és a hipotalamusz területeire korlátozódik (Lovenberg et al., 1995), előbbi jobbjára a CRFR2 $\alpha$  izoformájaként. A CRFR2 $\beta$  a perifériás szövetek szélesebb körében expresszálódik úgy, mint a szív, bőr, tüdő, gyomor-bél rendszer, érrendszer és a vázizom területén (Bale & Vale, 2004; Potter et al., 1994). A CRF receptorok expresszióját a saját kísérleteinkhez is használt MCF7 sejtekben már korábban is detektálták az mRNS szintjén. Ekkor a CRFR1 mRNS-e jóval nagyobb mennyiségben volt jelen ezekben a sejtekben, mint a CRFR2-é (Androulidaki et al., 2009; Graziani et al., 2007). Néhány évvel ezelőtt aztán CRFR2 immun-jelet is sikerült kimutatni MCF7 sejtekben poliklonális antitest használatával (Koureta et al., 2020). A 2000-es évek elején izoláltak egy harmadik típusú receptort is, ami nagyfokú homológiát mutat az 1-es típusú CRF receptorral. Ez az izoforma a CRFR3 nevet kapta, ennek tényleges expresszióját azonban csak a harcra agyalapi mirigyében sikerült kimutatni (Dautzenberg & Hauger, 2002). Utóbbi receptorról elmondható, hogy szignifikánsan erősebb affinitással köti a CRF-et, mint pl. a sauvagine-t (Arai et al., 2001).

A CRF receptorok rendellenes működése súlyos következményekkel járhat, ami hozzájárul többek között a szorongásos állapot kialakulásához, depresszióhoz, de okozhat étkezési zavarokat is, valamint a szív- és gyulladáscsökkentő betegségek patofiziológiájában is szerepet játszhat (Dautzenberg & Hauger, 2002). Emellett a CRF receptorok jelenlétét számos humán daganat típusban is megfigyelték, úgy mint melanóma, kissejtes tüdőrák és neuroblastoma esetében (Reubi et al., 2003).

## ***1.4 CRF receptorok által közvetített jelátvitel***

### **1.4.1 Heterotrimer G-proteinek és a cAMP-PKA jelátviteli út**

A legtöbb sejtípus esetében a ligand CRF receptorhoz való kötődése hatására stimuláló G-fehérje ( $G_s$ ) aktiválódik. A G-fehérje ekkor a receptorról leválva stimulálja effektorát, az adenilát-cikláz. Azonban a receptor és az effektor közötti jel továbbításban más típusú G-fehérjék is részt vehetnek, ami nagymértékben függ a sejtípustól (Boorse & Denver, 2006). Ilyen például a  $G_q$  közvetített foszfolipáz C (PLC) és az inozitol-foszfátok képződésének stimulációja a here Leydig sejtjeiben, vagy a placentában (Grammatopoulos et al., 2000). Egyes tanulmányok szerint az agykéregben és transzfektált LLCRK-1 sejtekben mind  $G_s$ , mind  $G_q$  fehérjék kapcsolódhatnak az aktivált receptorhoz, és ezáltal stimulálják a cAMP és a PLC útvonalakat is (Dautzenberg & Hauger, 2002). A CRFR1 aktív,  $G_s$ -kötő állapotba kerül UCN1 vagy CRF kapcsolódás hatására, majd a heterotrimer G-protein  $\alpha$  alegysége serkenti effektorát az adenilát-cikláz, ami ekkor ATP-ből cAMP-t hoz létre (Hoare et al., 2004). A cAMP aktiválja a proteinkináz A-t (PKA), ami számos célfehérjét foszforilál, mint pl. a CREB transzkripciósfaktort. Hasonló mechanizmussal kerül inaktívból aktív állapotba a CRFR2 receptor is, majd itt is a  $G_s$  aktiválja az adenilát-cikláz, ez pedig indukálja a cAMP-függő jel továbbítást a PKA úton keresztül (R. Hauger et al., 2008).

### **1.4.2 Mitogén-aktivált protein kináz- ERK1/2 jelátvitel**

A mitogén-aktivált protein kinázok (MAPK) családjába tartozó extracelluláris szignál-regulált kinázok (ERK) sejt felszíni receptorok és a sejtmag közötti jel közvetítésben vesznek részt (Cano & Mahadevan, 1995). Az ERK fehérjének két legismertebb izoformája az ERK1 és ERK2, melyek foszforilálódva aktiválódnak. Az ERK1 44 kDa molekula tömegű, míg az ERK2

egy 42 kDa tömegű szerin/treonin specifikus proteinkináz (Szeberényi & Erhardt, 1994). Aktiváló foszforilációjukban közreműködhet a MEK1/2 (mitogén-aktivált protein kináz/extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2), továbbá a cAMP-függő PKA is. A PKA és MEK1/2 által közvetített jelátviteli utaknak fontos szerepük van, pl. a memória kialakulásának idegrendszeri folyamatában is (Roberson et al., 1999; Sananbenesi et al., 2003). AZ ERK1/2 cAMP/PKA-függő aktivációját számos sejtes rendszerben megfigyelték, így például a hippokampusz neuronjaiban (Elliott-Hunt et al., 2002), azonban vannak olyan esetek is, melyekben a PKA gátolja az ERK1/2 aktivációját (Graziani et al., 2002, 2007). Urokortin kezelés hatására CREB és MAPK aktiváló foszforiláció következik be a CRF receptorokat túlzott mértékben, tehát „overexpresszáló” sejtekben. PKA inhibitor H89 kezelés gátolja a sauvagine-indukált CREB foszforilációt, ezzel szemben a MAPK aktivációt gátló hatás ekkor nem érvényesül. Ebből arra lehet következtetni, hogy itt a MAPK foszforiláció egy PKA-tól független folyamat (Dautzenberg & Hauger, 2002; Rossant et al., 1999). Ezzel ellentétben *Sananbenesi* és munkacsoportja szerint az ERK1/2 MAPK foszforiláció PKA függő módon zajlik. Ezt megerősíti, hogy a PKA inhibitor Rp-cAMPS jelenlétében nem foszforilálódik az enzim (Sananbenesi et al., 2003). CRFR1-et overexpresszáló CHO és HEK293 sejtekben UCN1 és sauvagine kezelés hatására is CREB és ERK1/2 MAPK foszforiláció indukálódik. Transzfektált CHO sejtekben a CREB foszforiláció a PKA inhibitor H89 kezeléssel gátolható, az ERK1/2 foszforiláció viszont nem. Utóbbi arra utal, hogy ebben a sejttypusban a CRFR1 által közvetített MAPK jelátvitel nem a PKA úton keresztül zajlik (R. Hauger et al., 2008). A béta-adrenerg receptort expresszáló HEK293 sejtekben a PKA fontos szerepet játszik a receptor foszforilációjában, melynek következtében a receptor a G-fehérjéhez kapcsolódik és ezen keresztül aktiválja a ERK fehérjét (Daaka et al., 1997). A szakirodalom alapján a CRF család neuropeptidjei által indukált ERK1/2 foszforiláció mechanizmusa nagymértékben sejttypus függő folyamat.

Az ERK1/2 urokortin és CRF által indukált aktivációját már számos sejttípusban leírták, így pl. patkány szívizomsejtekben, vagy agykérgi (kortikális) neuronokban (Pedersen et al., 2002). További irodalmi adatok alapján ismert, hogy urokortin kezelés hatására ERK1/2 aktiváló foszforiláció következik be különböző sejttípusokban, így például humán myometrium sejtekben, CRFR1 receptort expresszáló HEK293 sejtekben és 293-tR1  $\alpha$  sejtekben is (Papadopoulou et al., 2004). A CRF családba tartozó sauvagine kezelés hatására idő-és dózisfüggő ERK1/2 és CREB foszforiláció következik be a CRFR2( $\alpha$ ) receptorokat expresszáló CHO sejtekben, azonban ez az ERK1/2 aktiváció MEK1/2 inhibitor PD98059 jelenlétében gátolható (R. Hauger et al., 2008; Rossant et al., 1999). Ezen túl az előbb említett sejtek előkezelése PI3K inhibitor LY294002-vel csökkenti a sauvagine által stimulált ERK1/2 foszforilációt (R. Hauger et al., 2008), ami arra utal, hogy a MAPK kaszkád CRFR2( $\alpha$ ) közvetített aktivációja MEK és PI3K függő. Az ERK1/2 foszforiláció UCN1 kezeléssel is indukálható CRFR2( $\beta$ ) receptorral transzfektált CHO és HEK293 sejtekben. Hasonlóan a CRFR2( $\alpha$ ) MAPK által mediált aktivációjához, a CRFR2( $\beta$ ) közvetített ERK1/2 indukció is MEK1/2 és PI3K függő folyamat (Brar, Chen, et al., 2004).

COS-7 sejtekben és Rat-1 fibroblasztokban a MAP kinázok aktiváló foszforilációja heterotrimer G-fehérjék  $\beta$  és  $\gamma$  alegységeinek Ras fehérjével történő interakcióján keresztül történik (Rossant et al., 1999). Szintén heterotrimer G-fehérjék  $\beta$  és  $\gamma$  alegységeinek közvetítésével történik a MAPK kaszkád aktivációja HEK293 sejtekben, mely útvonal a Ras mellett magában foglalja a nem receptor tirozin protein kináz c-Src fehérjét is (Daaka et al., 1997). A CRF receptorokon keresztüli MAP kináz foszforilációban fontos szerepet játszhat még a PI3-kináz enzim is, hiszen a PI3K inhibitor Ly294002 előkezelés csökkenti a sauvagine által indukált ERK1/2 foszforilációt, jelezve a kapcsolatot ezen jelátviteli utak között (Rossant et al., 1999).

## ***1.5 Daganatos sejtvonalak***

Ahogy azt már korábban említettük, a CRF család neuropeptidjei fontos szabályozói számos biológiai folyamatnak úgy, mint a stresszválasz és az immunválasz kialakítása, a gyulladásos folyamatok koordinálása, és a táplálkozás folyamatának központi regulációja. A felsorolt tényezők mindegyikének szélsőséges eltérései (pl. krónikus stressz és/vagy gyulladás, illetve túlsúly) a daganatok kialakulásának ismert előmozdítói. A szakirodalom alapján ismert, hogy a CRF család tagjai és receptoraik számos daganat típusban kifejeződnek, de normális szövetekben is megtalálhatóak. Hatással vannak a sejtek osztódási képességére-, túlélésére, az áttétképzésre, vagy az apoptózisra (Yi SQ et al., 2021). Ha ezeknek a rendszereknek a finoman hangolt irányítása elveszik, az daganatok kialakulásához vezethet. Ezen lehetséges hatások tekintetében vizsgáltuk az urokortin által indukált biológiai választ, és annak jelátviteli mechanizmusát humán daganatos sejtvonalakban (MCF7 és HeLa sejtekben). (A sejtvonalak részletes ismertetését lásd az „Anyagok és módszerek” fejezetben.)

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám során az alábbi célok elérését tűztem ki:

- Az urokortin biológiai hatásainak sejt- és molekuláris szintű tanulmányozása emberi, daganatos (MCF7 és HeLa) sejtvonalakban.
- A humán urokortin1 (HU) jelátviteli hálózatainak további feltérképezése a használt sejtvonalakban.
- A CRF receptor izoformák expressziójának és lokalizációjának vizsgálata a tanulmányozott humán sejtvonalakban, továbbá a receptorok közvetítő szerepének meghatározása a humán urokortin jelátvitelében.
- Az urokortin ismert, sejtosztódás szabályozásában betöltött lehetséges szerepének vizsgálata a használt sejtvonalakban.
- Annak meghatározása, hogy mely jelátviteli utak vesznek részt a humán urokortin jelátvitelében, különös tekintettel az ERK fehérjére. (A szakirodalom alapján ugyanis ismert, hogy urokortin kezelés hatására számos sejttypusban ERK foszforiláció indukálódik, ami viszont a sejtosztódás egyik fő szabályozója.)
- A heterotrimer G-fehérje-kötő CRF receptorok által indukált jelátviteli utak és a Ras/ERK jelátviteli út lehetséges összeköttetéseinek feltárása.
- A humán urokortin kezelés által indukált biológiai válasz (sejtproliferáció esetleges szabályozása) molekuláris mechanizmusának feltárása a sejtciklus szabályozásában kulcsszerepet játszó fehérjék (pl. p53, Rb és E2F-1) vizsgálatával.

## **3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### ***3.1 Sejtenyészet***

Kísérleteinkhez ATCC (American Type Culture Collection) eredetű humán MCF7 emlőkarcinóma és HeLa adenokarcinóma sejteket használtunk, melyeket Prof. Dr. Szeberényi József biztosított számunkra (Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar). A sejteket 10% hővel inaktivált főtális borjúsérumot tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle's médiumban (DMEM, Sigma-Aldrich), standard tenyésztési körülmények között (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 80% páratartalom) műanyag Petri-csészén, vagy Thermanox (Nalgene Nunc International, Rochester, NY, USA) fedőlemezekben tenyésztettük. A tenyésztő médiumot heti két alkalommal cseréltük. Kezeléshez kiültetés előtt a sejteket médiummal lemostuk a tenyésztő lemez aljáról, majd a sejtszámolást követően azonos mennyiségű sejtet helyeztünk ki új lemezekre. A kezelések megkezdése előtt a sejtek szinkronizálása és általános jelcsillapítás céljából 24 órás séruméheztetést végeztünk 0,5%-os hővel inaktivált lósérumot tartalmazó DMEM médiumban.

### ***3.2 MCF7 sejtek***

Az MCF7 sejteket eredetileg 1970-ben, egy invazív, dukális (tejcsatorna sejtekből kiinduló) emlő karcinóma pleurális folyadékából klónozták (Soule et al., 1973) egy 69 éves fehér nő betegből. Az MCF7 a Michigan Cancer Foundation-7 rövidítése, utalva arra a detroiti intézetre, ahol Dr. Soule és munkatársai létrehozták a sejt vonalat. Ezek az adenokarcinóma sejtek a világ legjobban tanulmányozott letapadó humán tumor sejt vonalainak közé tartoznak. Az MCF7 sejtek történetében már korán beszámoltak a klonális variációkról, melyek széleskörű

aneuploidiát mutatnak, a vizsgált típustól függően jelentős kromoszómaszám eltéréssel (Şerban Comsa et al., 2015). A sejtvonal igen gyakran használt modell rendszer a biológiai kutatásokban.

### **3.3 *HeLa sejtek***

A HeLa daganatos sejtvonal volt az első, amit kutatók folyamatosan fenn tudtak tartani laboratóriumi körülmények között. A méhnyak eredetű minta egy fiatal, afroamerikai nőbetegtől származik, akinél cervix karcinómát diagnosztizáltak. Ez a tumor azonban nagymértékben eltért az ilyen típusú daganatok általánosnak tekintett epidermoid eredetétől, és úgy írták le, mint egy ritka adenokarcinóma. Sokkal agresszívabb volt, mint az akkoriban lassú növekedésüként aposztrófált méhnyakrák, amit a betegek nagy része még legalább 5 évig túlélt. Henrietta Lacks, akitől a minta származik és nevének első 2 betűjéből ered a HeLa elnevezés, 9 hónappal a diagnózis után elhalálozott. A HeLa sejtek viszont még ma is, több mint 70 évvel az izolálásuk után életben vannak, és gyakran képezik modell rendszerét molekuláris biológiai kutatásoknak (John R. Masters, 2002).

### **3.4 *Reagensok***

A használt vegyszerek nagy részét a Sigma-Aldrich (a Merck csoport tagja, Budapest, Magyarország) cégtől vásároltuk, hacsak az nincs másképp jelölve. A humán urokortint a gyártó utasításai szerint 10%-os ecetsavban oldottuk fel. A MEK gátló U0126, a PKA inhibitor H89 (Cell Signaling Technology) és a CRFR1-specifikus antagonistá Antalarmin DMSO-ban, míg a CRFR2-specifikus Astressin2b inhibitor desztillált vízben lett feloldva. A kezelések megkezdése előtt azt is teszteltük, hogy az alkalmazott szerek vivőanyagának a bevitt koncentrációkban nincs hatása a kísérletek vizsgált paramétereire.



### 3.5 *Western blot analízis*

A kiszámolt sejteket (kb.  $10^6$  db) 10 nM végkoncentrációjú humán urokortinnal (HU10) kezeltük a blotok ábráin is feltüntetett ideig, míg kontrollként kezeletlenül hagyott sejttenyészeteket használtunk. Inhibítorral történő kezelés esetében 30 perccel az urokortin adása előtt a gátlószert a tenyésztő médiumba pipettáztuk. Az alkalmazott inhibítoros kezelések végső koncentrációja a következő volt: 10  $\mu$ M H89, 20  $\mu$ M U0126, 100 nM Antalarmin és 100 nM Astressin2b. A kezelések leállítása és a sejtek feloldása lízis pufferbe (50 mM Tris-base, pH7,4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EGTA, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 5  $\mu$ M  $\text{ZnCl}_2$ , 100 mM NaF, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF, and 1% Triton X-100) kaparással történt, majd az így nyert mintákat lefagyasztottuk. A minták további feldolgozásához azokat jégen felolvasztottuk, majd további 20 perces inkubálással teljesen feloldottuk (lizáltuk) a bennük lévő, még ép sejteket. Az oldhatatlan sejtörmelék eltávolítása céljából a sejtízátumokat 4 °C-on, 13500-as percenkénti fordulatszámmal 20 percig centrifugáltuk (LaboGene, Scanspeed mini mikrocentrifuga szögrotorral), majd a fehérjét tartalmazó felülúszót steril Eppendorf-csőbe pipettáztuk át. Egykomponensű BioRad Protein Assay oldatnak a mintákhoz adását követően 595 nm-en mért fény abszorbancia értékek (Dynamica Halo RB-10 osztott fénysugaras UV/VIS spektrofotométer) alapján határoztuk meg a lizátumok fehérje koncentrációit, majd nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) méret szerint elválasztottuk egymástól a mintákban található fehérjéket. Ehhez az elválasztás előtt 6x-os koncentrációjú SDS pufferrel (30% glicerol, 6% SDS, 200 mM Tris-HCl, 0,03% brómfenolkék festék, 3% merkaptóetanol) egészítettük ki a fehérjemintákat, majd 5 perces forralással denaturáltuk őket. A 10%-os koncentrációjú poliakrilamid gélek zsebeibe mintánkénti 30  $\mu$ g fehérjekivonatot pipettáztunk és 25 mA/gél áramerősséggel elektroforézist hajtottunk végre. Ezt követően a gélben lévő mintákat Trans-Blot Turbo Transfer System (Biorad) segítségével PVDF membránra (Hybond-P, GE Healthcare, United Kingdom)

transzferáltuk (25V, 1A, 30 perc). A használt antitestek későbbi, aspecifikus kötődésének minimalizása érdekében TBS-Tween-ben oldott, 5% koncentrációjú zsírmentes tejben, vagy 3% koncentrációjú marha szérum albuminban blokkoltuk a membrán felszínét, majd indirekt immunológiai módszerrel mutattuk ki a specifikus fehérjéket. Az elsődleges antitestek szintén a blokkoló oldatban voltak hígítva 1:1000 arányban (anti-CRFR1, Fine Biotech, PRC; anti-CRFR2, Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary; foszfo-ERK1/2, ERK1/2, pAkt, pRb, E2F-1, Akt és béta-aktin, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA, valamint p53, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). A membránokat az elsődleges antitest jelenlétében egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk. A következő lépésben 2x5, majd 3x10 perces TBS-T-s (10 mM Tris-base (pH8), 150 mM NaCl, 0,2% Tween-20) mosással távolítottuk el a membránokról a nem specifikusan kötődött antitesteket. Ezután 5% zsírmentes tejben, 1:5000 arányban oldott, poliklonális, anti-nyúl, vagy anti-egér, tormagyökér-peroxidáz (HRP) enzimmel kapcsolt másodlagos antitestekkel (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) inkubáltuk a membránokat 4°C-on, 1 órán át. A másodlagos antitesttel való inkubációt követően 2x5 és 3x10 perces TBS-T-s mosással eltávolítottuk a nem specifikusan kötődött antitesteket. A specifikus immun-jelet G-box gél dokumentációs rendszer (Syngene, Cambridge, UK) használatával, HRP katalizált kemilumineszcens reakcióval (Immobilon Western, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) rögzítettük. Ezt követően forrásig hevített „stripping” pufferrel (0,2 M glicin-HCl, 0,05 M Tween 20, pH 2,5) mosva a membránt leoldottuk az elsődleges és másodlagos antitesteket, és ugyanezen a membránon 1:1000 arányban zsírmentes tejben oldott, poliklonális, anti-ERK, -Akt vagy -béta-aktin antitesttel a fent leírtakhoz hasonló módon ellenőriztük a gél zsebeibe betöltött, majd membránra átvitt teljes fehérje mennyiségeket.

### **3.6 Western blot adatelemzés**

A Western blot vizsgálatok során kapott jelet ImageJ szoftverrel (National Institutes of Health, USA) denzitometráltuk. Az adatok normalizálása minden esetben a megfelelő kontroll csoportra vonatkoztatva történt. Az ábrákon feltüntetett értékek a megadott számú ismétlések átlagai és a szórások, melyeket egymástól függetlenül, legalább háromszor végeztünk el. Az adatok közötti szignifikáns különbségeket egyutas (csak egy izoformával rendelkező fehérjék esetében) vagy kétutas (két izoformát mutató fehérjékre) ANOVA teszteléssel állapítottuk meg, a megfelelő korrekciókat alkalmazva, amiket az ábrák szöveges leírásában fel is tüntettünk. A P-érték <0,05-öt tekintettük szignifikánsnak. A releváns intenzitásbeli különbségeket az oszlopdiagrammokon jelöltük, továbbá az ennek megfelelő P-értékek az ábrák szövegében is megtalálhatók. Az ábrákon bemutatott blotok hasonló eredményeket adó sorozatokat szemléltetnek.

### **3.7 Konfokális mikroszkópia**

A sejttenyészeteket 10 nM végkoncentrációjú humán urokortinnal kezeltük az ábrákon jelzett ideig, vagy kezeletlenül hagytuk őket kontroll csoportként. Immunfluoreszcens vizsgálatainkhoz 24-lyukú tenyésztőedénybe, alkohollal zsírtalanított fedőlemezekre, Bürker-kamrában történő sejt számolást követően  $5 \times 10^4$  sejtet ültettünk ki. A kezeléseket megelőző 24 órában 0,5%-os, hővel inaktivált lószérumot tartalmazó médiumban általános jelcsillapítás céljából széruméheztettük a sejteket. A kezeléseket leállítása és a sejtek fixálása 4%-os, 37°C-os paraformaldehidben (PFA) történt, szobahőmérsékleten, 1 órán át tartó lassú rázatás mellett. Ezt követően a sejteket 2x5 percig mostuk foszfát-pufferelt sóoldatban (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), amit 3x15 perc mosás követett tris-pufferelt sóoldatban (TBS: 50 mM Tris-HCl (pH7,4), 150 mM NaCl). Az

aspecifikus kötőhelyek blokkolása érdekében a mintákat 5% TBS-Triton-ban (50 nM Tris-HCl, pH 7,4; 150 nM NaCl, 0,1% Triton-X-100) oldott zsírmentes tejben inkubáltuk, 4°C-on, 1 óra lassú rázatás mellett. Az elsődleges antitesteket 1:100 arányban hígítottuk anti-CRFR1 (Fine Biotech, PRC) és anti-CRFR2 (Sigma Aldrich, Magyarország) esetében, míg anti-pERK1/2 (Cell Signaling Technology, USA) használatakor ez 1:300 arányban történt. Az elsődleges antitestet tartalmazó blokkoló oldatot egy éjszakán át hagytunk a mintán 4°C-on, lassú rázatás mellett. Másnap a nem kötődött antitesteket 2x5, majd 3x15 perc TBS-sel mostuk ki. A Cyanin 3-mal konjugált másodlagos, anti-nyúl fluoreszcens antitestet (Jackson Immuno Research, Cambridgeshire, UK) 1:300 (CRFR1 és CRFR2 detektálás) és 1:600 (pERK1/2 esetében) arányban 3%-os zsírmentes tejben oldottuk, majd a sejteket 4°C-on ebben az oldatban inkubáltuk 1 órán keresztül. Ezt követően a nem specifikusan kötődött antitesteket TBS-ben történő mosással (5x10 perc) távolítottuk el lassú rázatás mellett. Az első mosási lépés során a TBS-ben 1:10.000 arányban oldott Hoechst 33342 (Calbiochem, La Jolla, CA) festéssel láthatóvá tettük a sejtmagokat. A preparátumokat Vectashilddel (Vector Laboratories Inc.) fedtük le, majd a fluoreszcens jelet lézer pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkóp segítségével jelenítettük meg. A fent említett ellenanyag koncentrációk alkalmazásával, az elsődleges antitestek kihagyásával készített módszertani kontroll minták nem adtak immun-jelet az alkalmazott mikroszkópos beállítások mellett.

### ***3.8 Konfokális mikroszkópia adatelemzés***

Az ábrákon látható felvételek hasonló eredményeket adó sorozatokból készültek. Minden kísérletet legalább három alkalommal megismételtünk. A konfokális képalkotást Olympus Fluo View-1000 rendszer és a FW10ASW szoftver használatával végeztük. Az egyes optikai metszeteket 40x-es, nagy munkatávolságú, kombinált fáziskontraszt és fluoreszcencia

objektívvel (NA:0.75) készítettük. A konfokális apertúrát 130  $\mu\text{m}$ -re állítottuk, a másodlagos antitesthez konjugált Cy3 festék gerjesztése 543 nm-en történt, az emissziós hullámhossz 567 nm volt. A jelintegráció típusa „line Kalman” volt.

### **3.9 CellTiter-Glo 2.0 ATP-esszé**

A sejtszám meghatározás egyik általunk is használt lehetséges módszere a CellTiter-Glo 2.0 (Promega, Madison, Wis., USA) ATP-esszé. Ennek során az alkalmazott reakcióban a luciferin oxidálódik luciferáz hatására a sejtek által termelt ATP jelenlétében. ATP a metabolikusan aktív sejtekben termelődik, így a lumineszcens jel közvetlenül arányos a tenyészetben lévő ép, élő sejtek számával. Körülbelül 500 darab MCF7 sejtet tenyésztettünk 96-lyukú lemezekben, ahogy azt már korábban leírtuk (3.1), aztán kezeltük őket 10 nM végkoncentrációjú humán urokortinnal 24- és 48 órán keresztül.

### **3.10 ATP-esszé adatelemzés**

A lumineszcens jelet fotométerrel (ELISA microplate reader, FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Németország) detektáltuk. A kísérleteket legalább három alkalommal, mintánkénti triplikátumok használatával ismételtük meg. Az ábrákon feltüntetett értékek az egymástól függetlenül elvégzett kísérletek átlagai és a szórások. A statisztikai elemzéshez a kezeletlen kontroll csoportokra normalizált adatokat használtuk. Az egyes csoportok közötti szignifikancia különbségek meghatározása kétutas ANOVA teszttel, Tukey-korrekciót alkalmazva történt. A  $P < 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, melyet az ábra szövegében fel is tüntettünk.

### ***3.11 MTT sejtproliferációs és életképességi vizsgálat***

Az MTT festék (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid) egy tetrazólium só, mely formazánná alakul mitokondriális oxidoreduktáz enzimek által, amik azonban csak egészséges sejtekben aktívak. A reakció láthatóvá tételéhez a formazán kristályokat fel kell oldani, ami ekkor lila szín megjelenését eredményezi. Az MCF7 és HeLa sejteket (kb. 5000 db) a már korábban részletezett módon (3.1) tenyésztettük 96-lyukú lemezeken, majd kezeltük önmagában 10 nM humán urokortinnal, vagy a CRFR1 inhibitor Antalarminnal, illetve a CRFR2 antagonistá Astressin2b-vel kombinálva azt, 24 és/vagy 48 órán keresztül. Ezután 10 µl, steril vízben oldott Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Merck, Budapest, Magyarország) festékoldatot (5 mg/ml) pipettáztunk a sejtek médiumába (100 µl/lyuk) és termosztátban további 4 órán keresztül inkubáltuk őket. Ezt követően a sejtekről leöntöttük a felülúszót és 100 µl DMSO-etanol 1:1 arányú elegyével kimostuk belőlük a bennük felhalmozódott festéket. Ez lila színreakciót eredményezett, melynek intenzitása arányos a tenyészet metabolikus aktivitásával. Végül ELISA microplate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Németország) használatával 595 nm-en mértük meg a színes festékoldat fényelnyelését.

### ***3.12 MTT-esszé adatelemzés***

Mintáinkat 96-lyukú lemezre, kezelésenkénti triplikátumok formájában vittük fel. Kísérleteinket egymástól függetlenül, legalább háromszor végeztük el. Az ábrákon szereplő adatok ezek eredményeinek az átlagai és az azokhoz tartozó szórások. A kezelések közötti szignifikáns különbségek megállapítása egyutas ANOVA teszttel, a megfelelő korrekciót alkalmazva történt. A P-érték <0,05-öt tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak, melyet az ábrák szövegében fel is tüntettünk.

## 4 EREDMÉNYEK

### 4.1 CRF receptorok expressziójának vizsgálata MCF7 sejtekben

Az MCF7 sejtek humán urokortinnal való kezelése előtt vizsgáltuk, hogy a CRF receptorok, melyekhez ez a peptid ligand kötődik, expresszálódnak-e ebben a humán sejtvonalban. Ez Western blot analízis segítségével történt, az 1-es és 2-es típusú CRF receptorokra specifikus antitestek használatával. Ahogy azt az 1-es ábra mutatja, mind a CRFR1 (60 kDa), mind a CRFR2 (47 kDa) immunreaktivitás megjelent a blotokon, alátámasztva, hogy mindkét receptor izoforma kifejeződik MCF7 sejtekben.

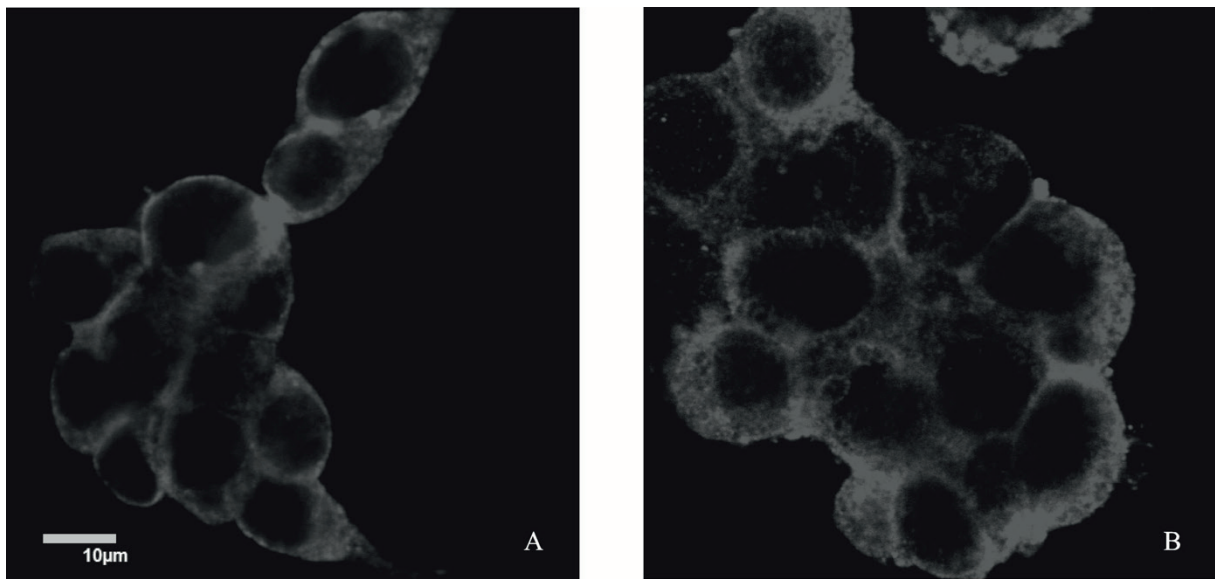


- 1. ábra:** CRF receptorok expressziójának vizsgálata Western blot segítségével. A bal oldali felső kvadránsban a CRFR1, a jobb felsőben pedig a CRFR2 immunreaktivitás jele látható MCF7 sejtekből származó fehérje lizátumokból. Az alsó sorban lévő két kvadránsban a béta-aktin jelet detektáltuk, amivel a géltre felvitt fehérjék összmennyiségét ellenőriztük.

### 4.2 CRF receptorok lokalizációjának vizsgálata MCF7 sejtekben

A CRFR1 és 2 expresszió detektálása után vizsgáltuk ezeknek a receptoroknak a sejtszintű lokalizációját is. Ez a már korábban is használt, izoforma-specifikus CRFR1 és CRFR2 antitestek, továbbá az ezeket felismerő, fluoreszcens festékekkel konjugált (Cy3)

másodlagos antitestek hozzáadásával történt. A lézer pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkóppal készített felvételek alapján azt láttuk, hogy az immunreaktivitás mindkét CRF receptor esetében citoplazmatikus eloszlású, és főleg a CRFR1 esetében maximális jelintenzitással a citoplazma perifériája felé, illetve helyenként kifejezetten a plazmamembrán mentén halmozódik. A CRFR2 immun-jel szélesebb eloszlási mintázatot mutat, granuláris megjelenésű és a citoplazma mélyebb rétegeibe is benyúlik.



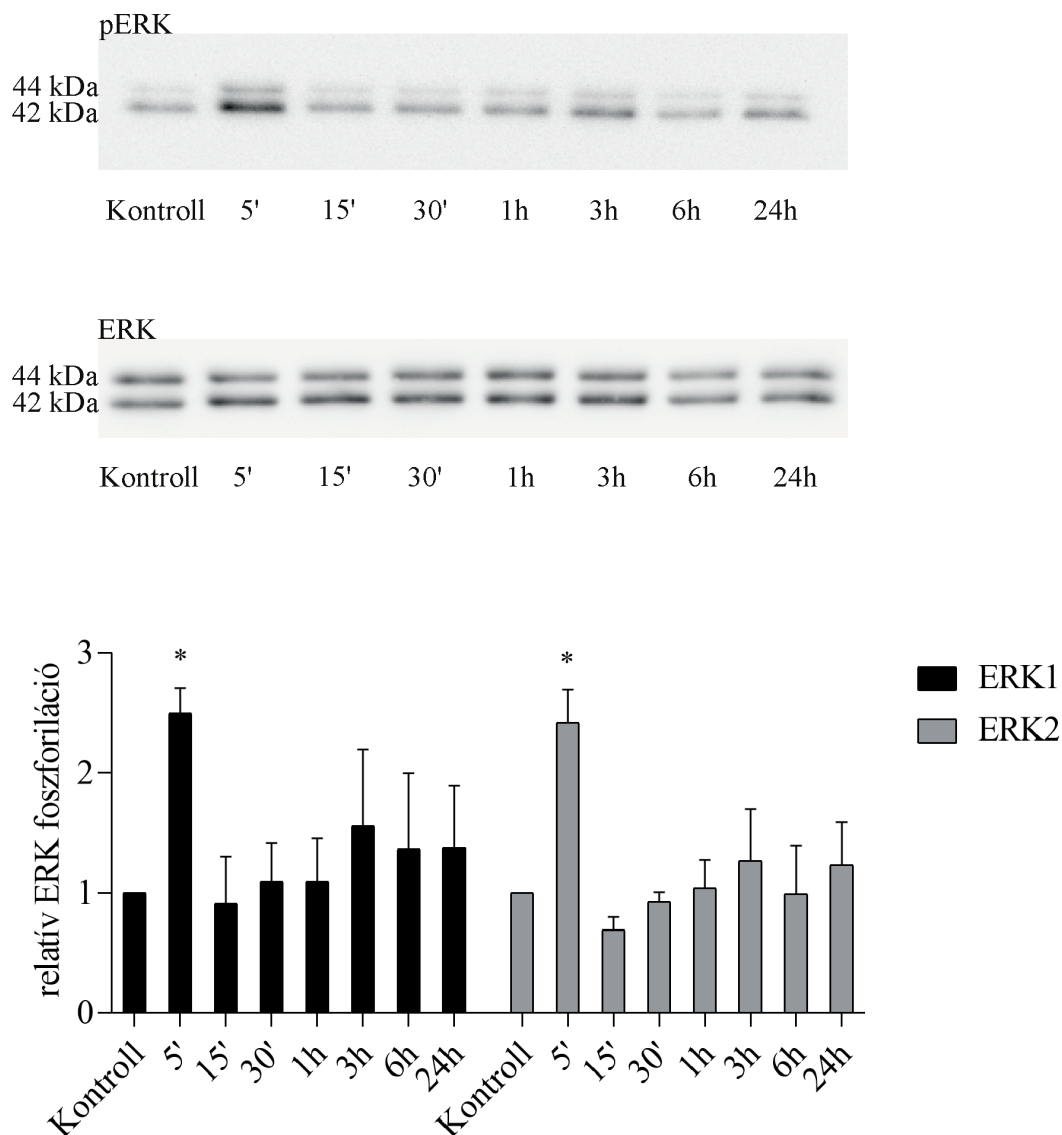
- 2. ábra:** CRFR1 és 2 sejtben belüli lokalizációjának vizsgálata MCF7 sejtekben, lézer pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkóp használatával. CRFR1 (A) és CRFR2 (B) citoplazmatikus immun-jel MCF7 sejtekben, CRFR1 esetében gyakran maximális jelintenzitással a plazmamembrán mentén. Az elsődleges antitest kihagyásával készült metodikai kontroll esetében nem detektáltunk immun-jelet az alkalmazott mikroszkópos beállítások mellett. Az "A" panelen látható méretarányos sáv (10 µm) mindkét mikroszkópos felvételre vonatkozik.

#### ***4.3 Humán urokortin által indukált ERK1/2 aktiváló foszforiláció időkinetikája MCF7 sejtekben***

Az urokortin sejtproliferációt serkentő képessége ismeretében vizsgáltuk a peptid által indukált ERK1/2 aktiváló foszforilációt. Korábbi tapasztalatainkból kiindulva 10 nM végkoncentrációjú humán urokortin1 (HU10) jelenlétében tenyésztettük a sejteket, különböző



hosszúságú időtartamokig adagolva a peptidet a sejtek médiumához, amit az ezzel a kísérlettel kapcsolatos ábrán fel is tüntettünk (3. ábra). Időkinetikai kísérleteink eredményei maximális ERK1/2 foszforilációt mutattak 5 perces urokortin kezelés hatására. Az aktiváló foszforiláció azonban csak átmeneti volt. Az 5 perces kezelést követően hamarosan már csökkenni kezdett a jelintenzitás, majd visszaesett a kezeletlen kontroll körüli szintre. Eredményeink alapján azt mondhatjuk tehát, hogy HU kezelés hatására gyorsan szignifikáns ERK1/2 foszforiláció indukálódott MCF7 sejtekben, de csak átmeneti jelleggel.

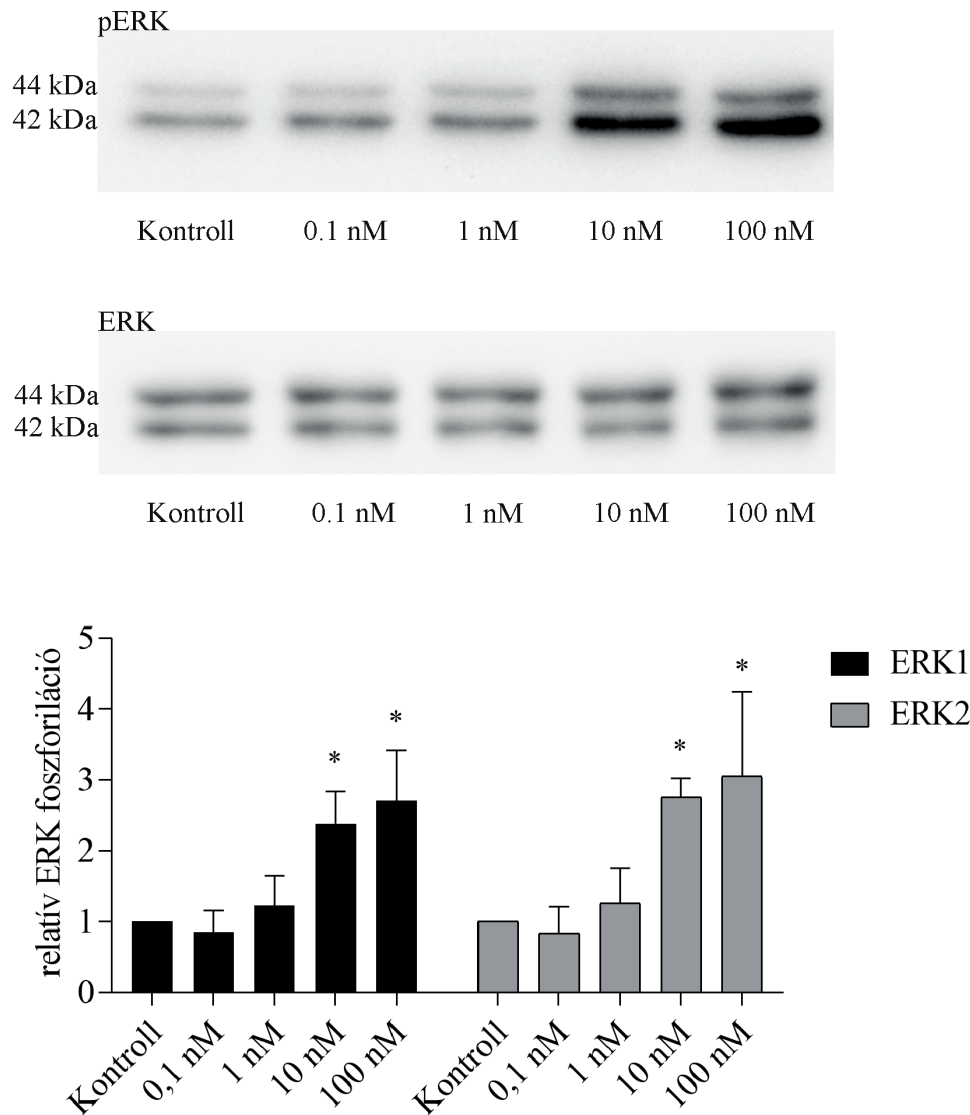


**3. ábra:** HU-indukált ERK1/2 foszforiláció időkinetikája MCF7 sejtekben, Western blot vizsgálattal. Az MCF7 sejteket 10 nM végkoncentrációjú humán urokortinnal kezeltük 5, 15 és 30 percre, továbbá 1, 3, 6 és 24 órán keresztül. Az ábrán látható eredmény azt

mutatja, hogy a kezeletlen kontrollhoz képest maximális ERK1/2 foszforiláció indukálódott 5 perces HU10 kezelés hatására MCF7 sejtekben. Az oszlopdiaagram számszerűsítve jelzi ezt a szignifikáns ERK1/2 aktiváló foszforilációt (az ERK1 foszforiláció a bal oldali 8 oszlop, a jobb oldali 8 oszlop pedig az ERK2 foszforiláció a diagramon). Az ERK fehérje nem foszforilált formájának (ERK1/2) immun-jele szolgált a géltre felvitt minták töltési (loading) kontrolljaként (blot alsó fele), ez utóbbit használtuk viszonyítási alapként a relatív ERK foszforiláció megállapításához (pERK1/2/össz-ERK). Az oszlopdiaagramon mutatott értékek öt, egymástól független kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll (kétutas ANOVA, DUNNET).

#### ***4.4 HU-indukált ERK1/2 aktiváló foszforiláció dóziszfüggésének vizsgálata MCF7 sejtekben***

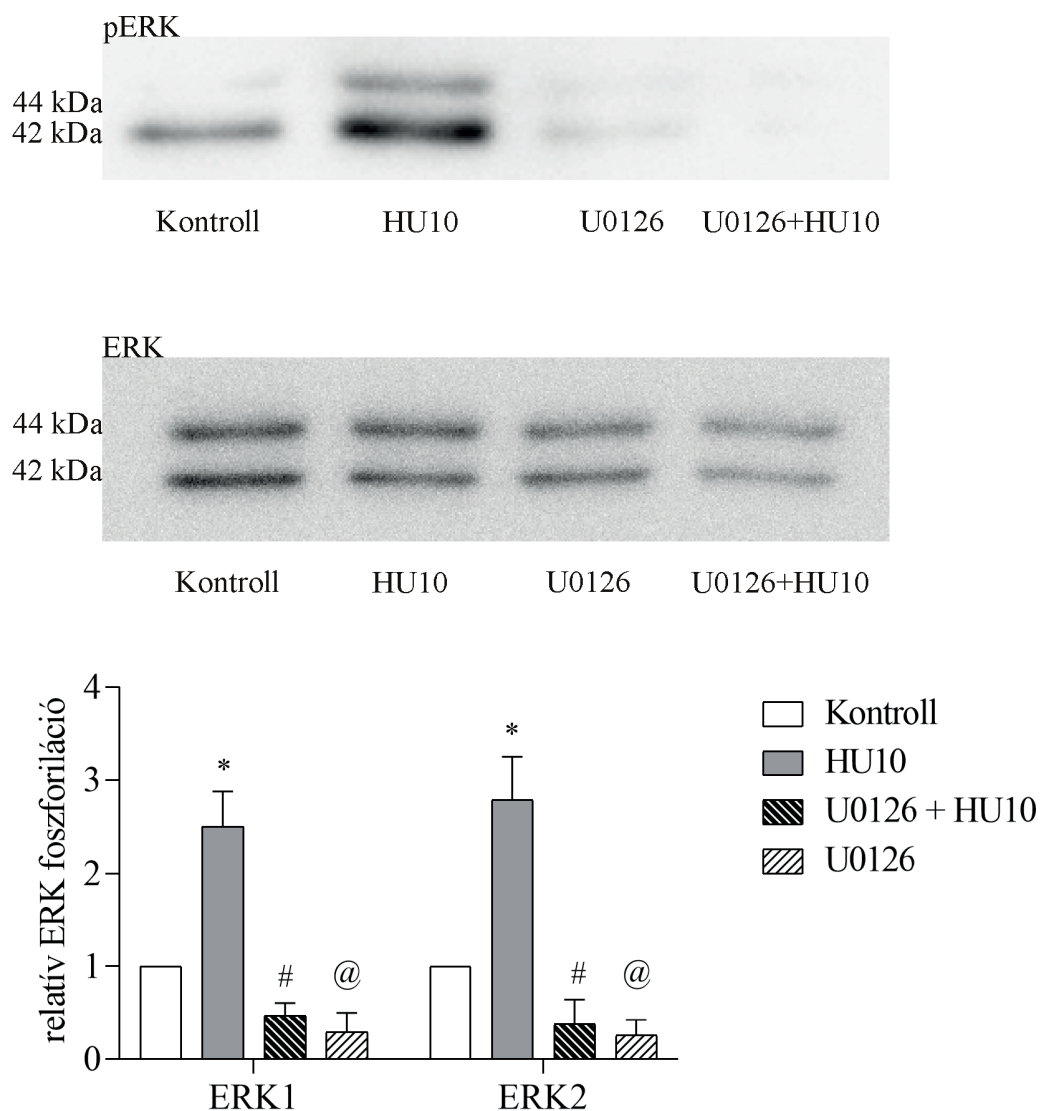
Az MCF7 sejteket különböző koncentrációjú humán urokortinnal is kezeltük 5 percig, hogy igazoljuk a 10 nM-os kezelési végkoncentráció, mint irodalmi adatokból megállapított, ideális dózis tényleges megalapozottságát. Ahogy a 4. ábrán lévő felső blot és az oszlopdiaagram mutatja, a 10 nM és 100 nM koncentrációjú HU kezelés hatására markáns ERK1/2 foszforiláció indukálódott. A statisztikai elemzés alapján viszont nincs szignifikáns különbség a két kezelési koncentráció között, így nem tartottuk indokoltnak a töményebb koncentráció alkalmazását. Ennek megfelelően további kísérleteinkhez is 10 nM végkoncentrációjú HU-t használtunk.



**4. ábra:** HU-indukált ERK1/2 foszforiláció dóziszfüggésének vizsgálata Western blottal. Az MCF7 sejteket 5 percig tartó, különböző koncentrációjú (0,1 nM-100 nM) humán urokortinnal kezeltük, vagy kezeletlenül hagytuk (Kontroll). Ahogy azt az oszlopdiagram is mutatja, a 10 nM és 100 nM koncentrációjú HU kezelés hatására szignifikáns ERK1/2 foszforiláció indukálódott. A statisztikai elemzésnél a fehérje inaktív formája (ERK1/2, alsó blot) szolgált loading kontrollként. A pERK1/2/össz-ERK arány alapján határoztuk meg a relatív ERK foszforilációt. Az oszlopdiagramon látható értékek három független kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll (kétutas ANOVA, DUNNET).

#### ***4.5 MEK inhibitor U0126 hatásának vizsgálata HU-kezelt MCF7 sejtekben***

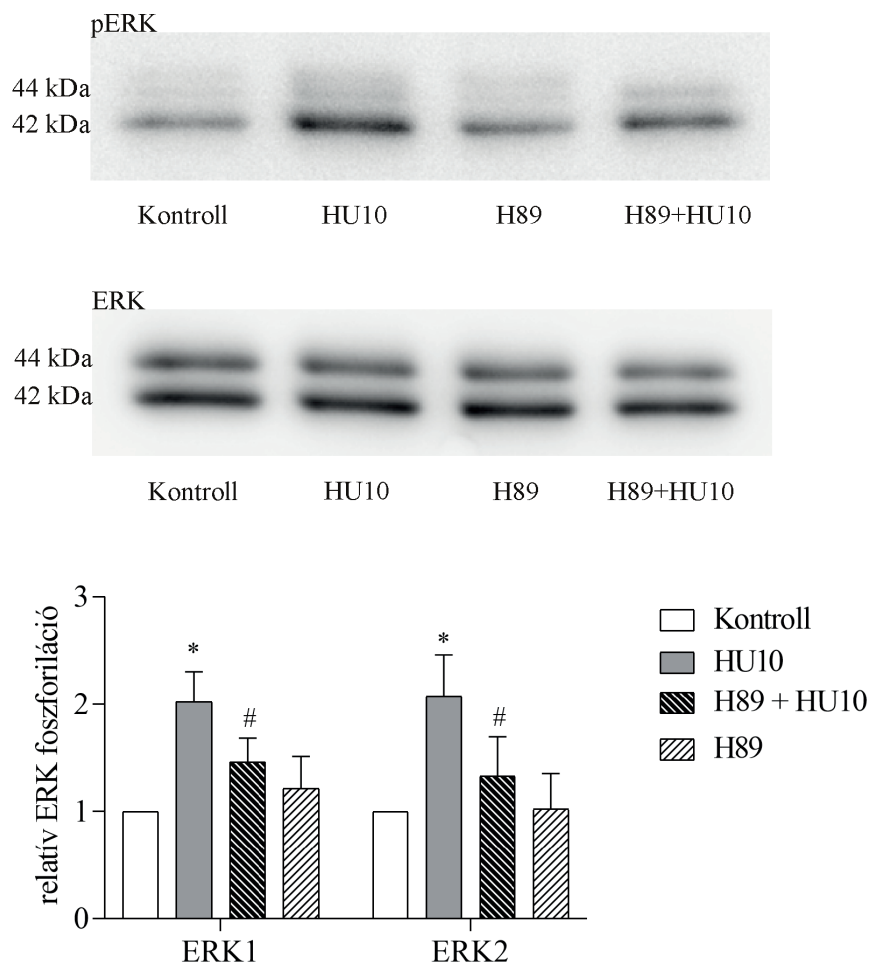
Az MCF7 sejteket MEK gátló U0126 inhibitorral is kezeltük, hogy megállapítsuk az ERK1/2 MAPK-t aktiváló MEK enzim szerepét a humán urokortin által indukált ERK foszforilációban. Ahogy azt az 5. ábra mutatja, a HU10 adását megelőző U0126 előkezelés teljes mértékben megszüntette az urokortin ERK1/2-t foszforiláló képességét. A sejteknek a gátlóval önmagában történt kezelése is csökkentette az alap ERK1/2 foszforilációt, ebben a mintában így alig látható immun-jel a felső bloton. Ezen megfigyeléseink alapján arra következtethettünk, hogy a MEK fehérje kulcsfontosságú szerepet játszik a HU-indukált ERK1/2 aktiváló foszforilációban MCF7 sejtekben.



**5. ábra:** MEK gátlás hatásának vizsgálata a HU-indukált ERK1/2 foszforilációra Western blottal. Az MCF7 sejteket 20  $\mu$ M végkoncentrációjú U0126 inhibitorral kezeltük, ami a MEK kináz aktivitását blokkolja. A gátlás az 5 perces HU kezelés megkezdése előtt fél órával kezdődött, majd folytatódott a humán urokortin adása során is (összesen 35 perc). Az U0126 kezelés gátolta a HU ERK1/2-t foszforiláló hatását, egymagában alkalmazva pedig szinte a detektálhatóság mértéke alá csökkentette a foszforilációt. Betöltési kontrollként az összes ERK1/2 fehérje jele szolgált, miután stripping pufferrel eltávolítottuk az anti-pERK1/2 antitesteket a membránról. A relatív fehérje foszforiláció mértékét a foszforilált/nem foszforilált ERK fehérje aránya alapján határoztuk meg. Kísérleteinket háromszor, egymástól függetlenül végeztük el. Az ábrán szereplő értékek ezeknek a kísérleteknek az átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  Kontroll vs. HU10, # $p < 0,05$  HU10 vs. U0126+HU10, @ $p < 0,05$  Kontroll vs. U0126 (kétutas ANOVA, Tukey).

#### 4.6 PKA gátló H89 hatásának vizsgálata HU-kezelt MCF7 sejtekben

Annak érdekében, hogy megállapítsuk a PKA szerepét a humán urokortin által indukált ERK1/2 foszforilációban, a sejteket PKA gátló vegyülettel, H89-cel kezeltük. Ahogy azt a 6. ábra is mutatja, 5 perces HU10 kezelés hatására markáns ERK1/2 foszforiláció indukálódott MCF7 sejtekben, ez a hatás azonban PKA inhibitor H89 kezeléssel gátolható volt. A HU10 adagolást megelőző H89 előkezelés ERK1/2 MAPK indukciót gátló hatása oly mértékű, hogy a statisztikai elemzés nem mutatott szignifikáns eltérést a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva. Ebből arra következtethettünk, hogy ez a szerin/treonin specifikus fehérje kináz fontos szerepet játszik a HU-indukált aktiváló ERK1/2 foszforilációban MCF7 sejtekben.

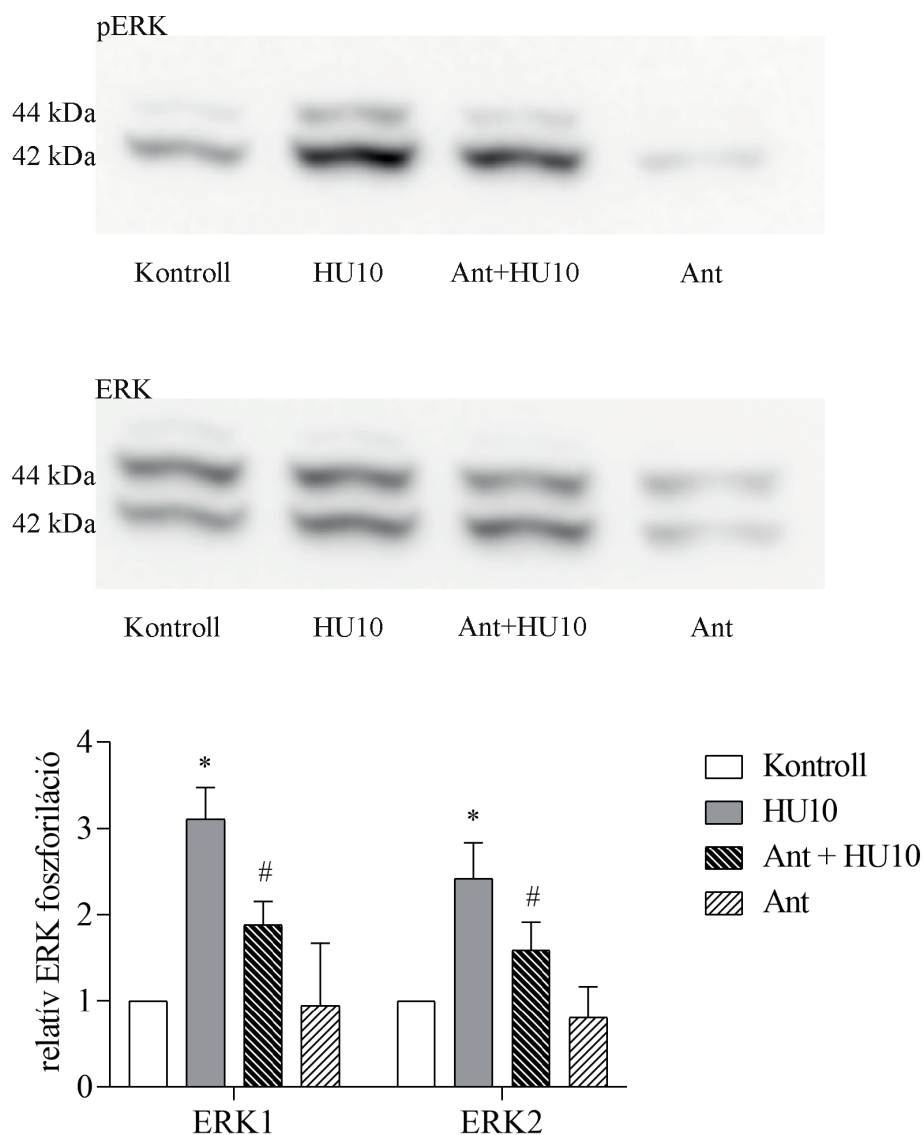


6. ábra: PKA gátlás hatásának vizsgálata a HU-indukált ERK1/2 foszforilációra Western blottal vizsgálva. Fél órával a HU kezelés megkezdése előtt 10  $\mu$ M végkoncentrációjú

H89-cet adtunk a sejteknek, majd a gátlás folytatódott az 5 perces humán urokortin kezelés ideje alatt is (összesen 35 perc). Töltési kontrollként az ugyanazon a membránon detektált össz-ERK fehérje jele szolgált, miután stripping pufferrel eltávolítottuk az anti-pERK1/2 antitestet. Később ezeket a jeleket használtuk a relatív ERK foszforiláció megállapítására (pERK1/2/össz-ERK). Kísérleteinket egymástól függetlenül, négy alkalommal végeztük el. A diagramon szereplő értékek ezeknek a kísérleteknek az átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll, # $p < 0,05$  HU10 vs. H89+HU10 (kétutas ANOVA, Tukey).

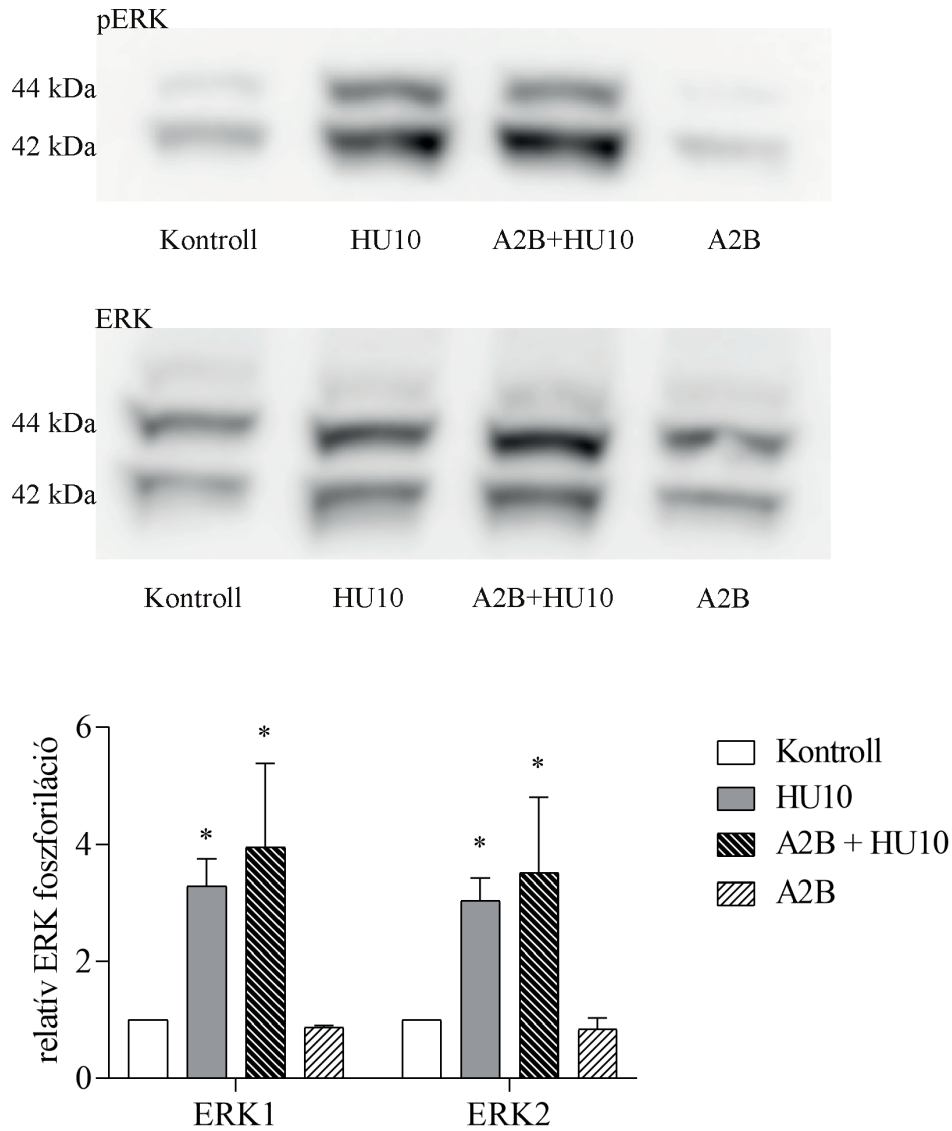
#### **4.7 CRF receptor 1 és 2 gátlás hatása MCF7 sejtekben**

Az MCF7 sejteket az 1-es és 2-es típusú CRF receptorokra specifikus gátlókkal is kezeltük, hogy megállapítsuk a két receptor izoforma szerepét a humán urokortin által indukált ERK1/2 foszforilációban. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a CRFR1-specifikus inhibitor Antalarmin (Ant) markánsan csökkentette a HU-indukált ERK1/2 aktivációt (7. ábra). Ezzel szemben a CRFR2-re specifikus antagonistá Asterssin2b (A2b) nem gátolta azt (8. ábra). Ezekből az eredményekből azt a következtetést vonhattuk le, hogy az 1-es típusú CRF receptor meghatározó szerepet játszik a HU jelátvitelében MCF7 sejtekben, hiszen gátlása specifikus antagonistával szignifikánsan csökkentette a HU ERK1/2-t foszforiláló képességét.



**7. ábra:** CRFR1 inhibitor Antalarmin hatásának vizsgálata a HU-indukált ERK1/2 foszforilációra Western blottal. Az MCF7 sejteket 100 nM végkoncentrációjú Antalarminnal kezeltük 30 perccel a HU10 adását megelőzően (5 perces kezelés), majd azzal folytatólagosan (összesen 35 perc). Az Antalarmin kezelés gátolta a HU10-stimulált ERK1/2 foszforilációt. Betöltési kontrollként az össz-ERK fehérje jele szolgált (alsó blot), ezt a blotot használtuk a relatív ERK foszforiláció megállapításához (pERK1/2/össz-ERK). Kísérleteinket egymástól függetlenül, négy alkalommal végeztük el. A diagramon szereplő értékek ennek a négy kísérletnek az átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  Kontroll vs. HU10, # $p < 0,05$  HU10 vs. Ant+HU10 (kétutas ANOVA, Tukey).

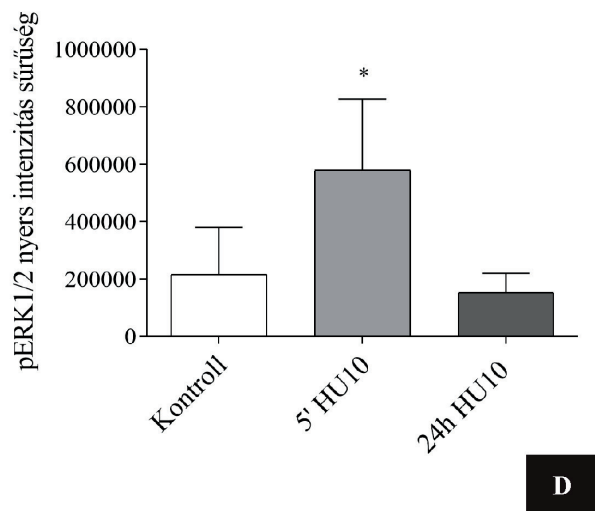
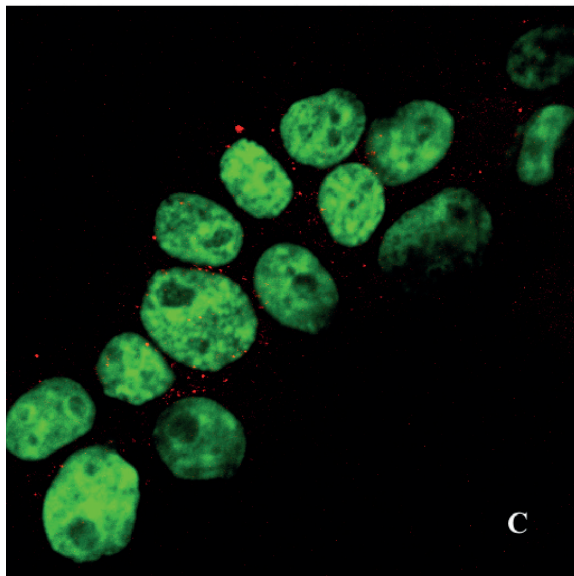
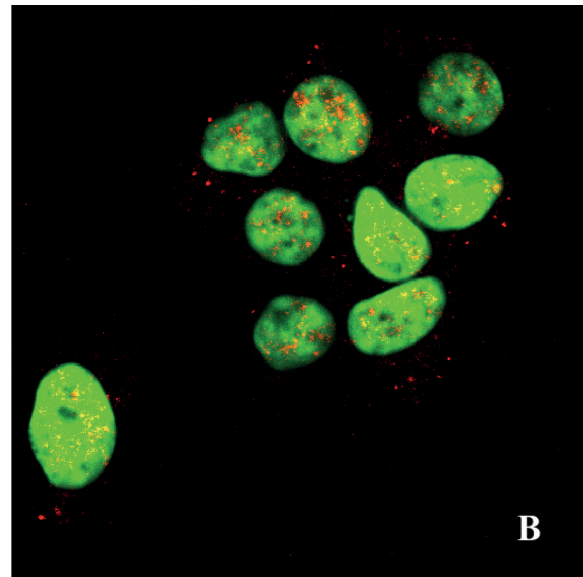
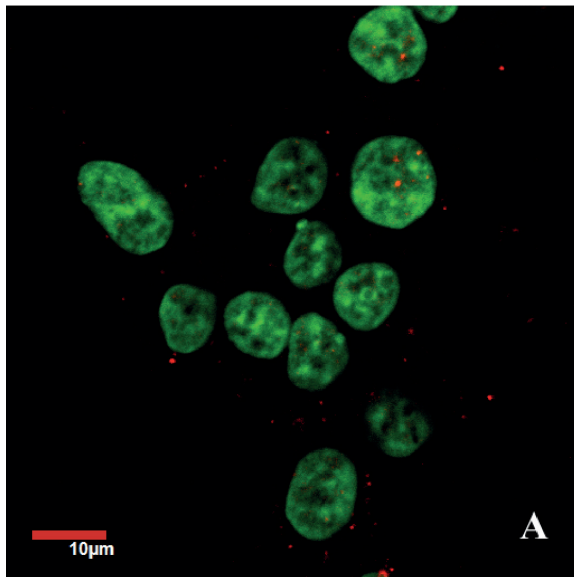




**8. ábra:** CRFR2 inhibitor Astressin2b hatásának vizsgálata a HU-indukált ERK1/2 foszforilációra Western blottal. A sejtek előkezelése 100 nM végkoncentrációjú A2b-vel 30 perccel a HU10 adását (5 perc hosszan) megelőzően kezdődött, majd a gátlás folytatódott a peptid jelenlétében is (összesen 35 perc). A CRFR2 antagonistá A2b nem gátolta a HU ERK1/2-t foszforiláló hatását. Töltési kontrollként az össz-ERK fehérje jele szolgált (alsó blot), ezt használtuk a relatív ERK foszforiláció megállapításához (pERK1/2/össz-ERK). A diagramon látható értékek három független kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll (kétutas ANOVA, Tukey).

#### ***4.8 Az aktivált ERK1/2 fehérje sejten belüli lokalizációjának vizsgálata MCF7 sejtekben***

A foszforilált, tehát aktivált ERK1/2 fehérje intracelluláris elhelyezkedését immunfluoreszcenciával, lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. Az MCF7 sejteket HU10 jelenlétében 5 percig (a HU-val kiváltható legerősebb ERK1/2 foszforiláció), valamint 24 órán keresztül tenyésztettük. A kezeltlen sejtekben gyenge pERK jelet detektáltunk a sejtek citoplazmájában. Ehhez képest 5 perccel az urokortin kezelés megkezdése után a jel intenzitása fokozódott, az egyedi sejtek szintjén is észlelhetően erősebbé vált. Továbbá nem csupán a citoplazmában, hanem a sejtmagokban is megjelent a pERK1/2 immunreaktivitás. 24 órával a kezelése megkezdése után a HU-indukált ERK1/2 foszforiláció már lecsengett, a jelintenzitás a kontroll sejtekben mért körüli szintre esett vissza, – épp úgy, mint Western bloton – és ismét citoplazmatikus lokalizációt mutatott. Immunfluoreszcens felvételeinkkel megerősítettük korábbi Western blottal detektált eredményünket, miszerint HU10 kezelés hatására ERK1/2 foszforiláció következik be MCF7 sejtekben (9. ábra). Meghatároztuk továbbá az aktív ERK fehérje sejten belüli elhelyezkedését. A statisztikai elemzéssel nyert adatokkal is alátámasztva azt a következtetést vonhattuk le, hogy az 5 percig tartó, HU10-indukált aktiváló ERK1/2-foszforiláció következtében a fehérje a sejtmagba is transzlokálódik.



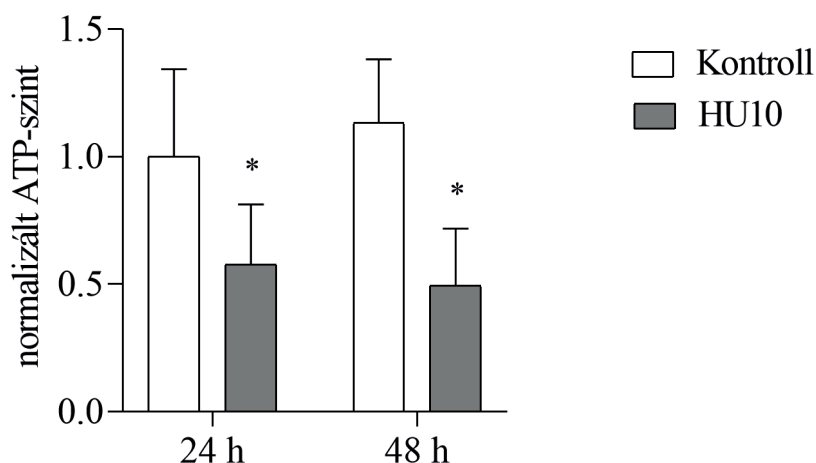
**9. ábra:** Foszforilált ERK1/2 sejten belüli lokalizációjának vizsgálata immunfluoreszcenciával és lézer pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkóppal. A: gyenge pERK1/2 jel (piros) a kontroll (kezeletlen) sejtek citoplazmájában. B: megemelkedett jelintenzitás a sejtek citoplazmájában (piros) és a sejtmagban (zöld + piros = sárga) 5 perces HU10 kezelést követően. C: többnyire citoplazmatikus pERK1/2 szignál 24 órás humán urokinin kezelést követően. Az alkalmazott mikroszkópos beállítások mellett az elsődleges antitest elhagyásával készült minta (metodikai kontroll) nem adott immun-jelet (itt nem mutatjuk). A sejtmagokat Hoechst 33342-vel (Calbiochem, La Jolla, CA) festettük meg. A konfokális felvételeket ImageJ szoftver használatával denzitometráltuk. Az aktivált, nukleáris pERK1/2 jel intenzitását (nyers intenzitás sűrűség) a sejtmagok pixelintenzitásainak összegével határoztuk meg a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva. A P-érték <0,05 volt az, amit szignifikánsnak tekintettünk. A csoportok közötti markáns különbségek meghatározása

Kruskal-Wallis-teszt segítségével, Dunn-korrekciót alkalmazva történt. Az „A” panelen lévő méretarányos sáv (10  $\mu\text{m}$ ) mindhárom mikroszkópos felvételre vonatkozik. A képek három, egymástól függetlenül megismételt kísérlet reprezentatív eredményei.

D: A nukleáris pERK1/2 jelintenzitások összehasonlításának (A, B és C minta) statisztikai elemzése. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll (Kruskal-Wallis teszt, Dunn).

#### 4.9 ATP-szint mérés HU kezelt MCF7 sejtekben

Az indukált jelátviteli utak mellett célunk volt annak meghatározása is, hogy a sejtek milyen biológiai választ adnak humán urokortin kezelés hatására. Ennek egyik módja, hogy mérjük a sejtek által termelt ATP mennyiségét, amiből az életképes sejtek arányára lehet következtetni. Az MCF7 sejteket HU10 jelenlétében 24-és 48 órán keresztül tenyésztettük, míg a kontroll csoportokat kezeletlenül hagytuk. Ahogy azt a 10. ábra is mutatja, 10 nM-os HU kezelés hatására a sejtek ATP termelése szignifikánsan csökkent a kezeletlen csoporthoz viszonyítva. A CRFR1-specifikus inhibitor Antalarmin, valamint a CRFR2 antagonistá Arestressin2b kezelések nem befolyásolták a HU10 ATP termelésre gyakorolt hatását, így ezeket az adatokat nem mutatjuk.

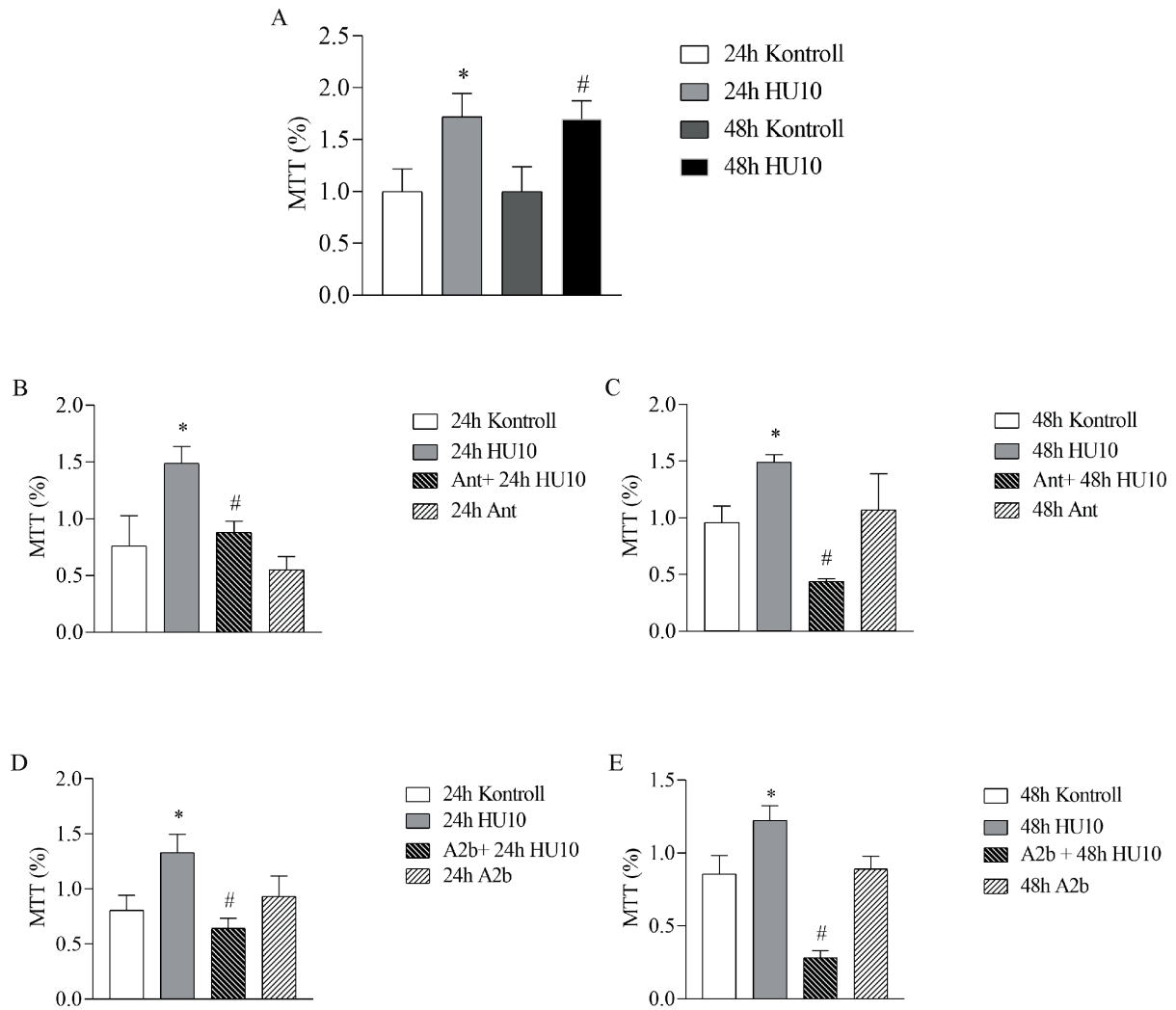


**10. ábra:** Humán urokortin ATP termelésre gyakorolt hatásának vizsgálata MCF7 sejtekben. A mérések elvégzéséhez CellTiter-Glo 2.0 ATP-esszét használtunk. A diagramon látható értékek 6 egymástól független kísérlet átagai és a szórások. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll, az ábrán feltüntetett időpontokban (kétutas ANOVA, Tukey).

#### ***4.10 HU kezelés MCF7 sejtek proliferációjára gyakorolt hatásának vizsgálata***

##### ***MTT-esszével***

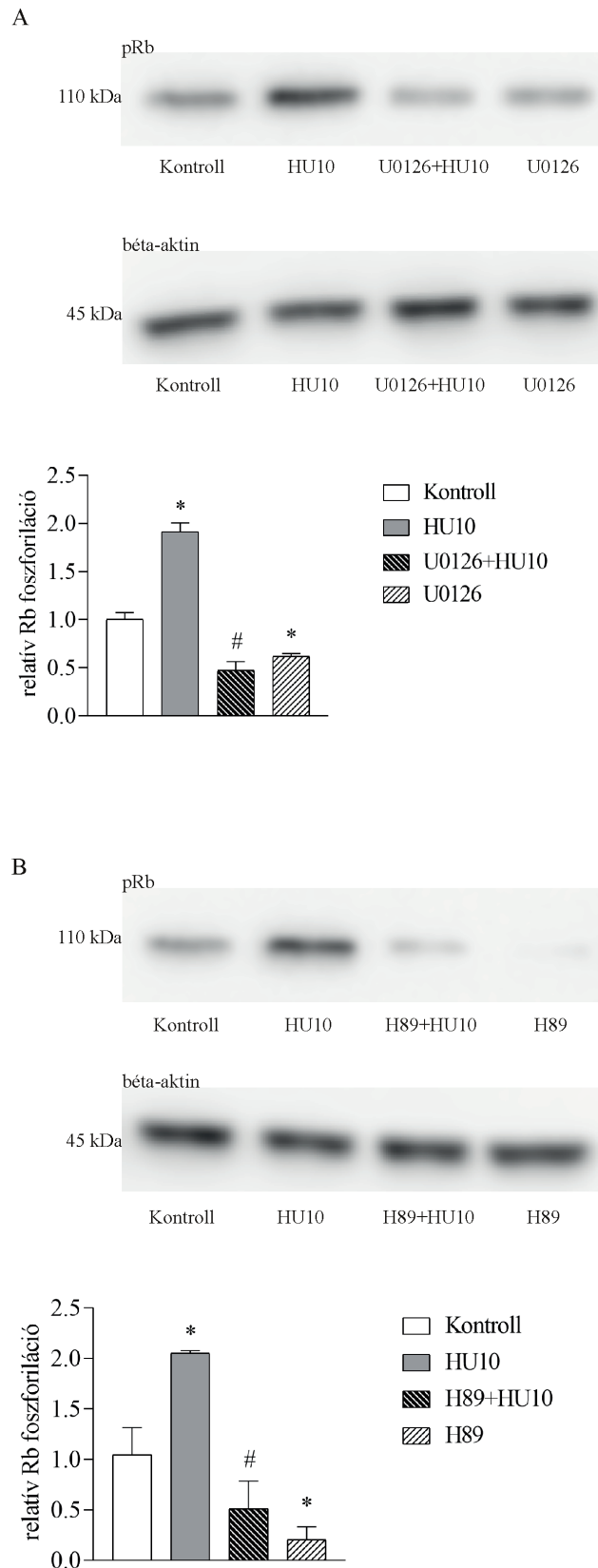
Az MTT-esszé egy sejtproliferációs és életképességi mérési módszer, hasonlóan a már korábban használt ATP-esszéhez. A megfelelő kezeletlen kontroll csoportokhoz viszonyítva szignifikáns sejtosztódás fokozódást mértünk MCF7 sejtekben 24-és 48 órás HU10 kezelés hatására. Azonban a CRFR1 gátló Antalarmin és a CRFR2 inhibitor Astressin2b előkezelések gátolták a HU sejtosztódásra gyakorolt pozitív hatását, vagyis a sejtproliferáció fokozását (11. ábra). Eszerint a CRF receptor inhibitorok antagonizálják a HU hatását, szignifikánsan gátolva a peptidet biológiai hatásának kifejezésében. Eredményeinkből arra következtethettünk, hogy a HU stimulálja az MCF7 sejtek proliferációját. A CRFR1 hatása, legalábbis részben, valószínűleg az ERK1/2 fehérje aktiváló foszforilációjának közvetítésével történik.



**11. ábra:** Humán urokortin sejtosztódásra gyakorolt hatásának vizsgálata MTT-esszé használatával MCF7 sejtekben. A 24-és 48 órás HU kezelés hatására szignifikánsan emelkedett a formazánná átalakított MTT reagens aránya a kezeltlen kontroll csoportokhoz viszonyítva (A). Ez a hatás CRFR1-és CRFR2-specifikus kémiai inhibitor Antalarmin (B, C) és Astressin2b (D, E) előkezelés hatására gátlódott, mind a 24- és a 48 órás urokortin kezelés esetében. A reprezentatív ábrák három, egymástól függetlenül elvégzett kísérlet átlagai és a szórások. Panel A: \* $p < 0,05$  24h Kontroll vs. 24h HU10, # $p < 0,05$  48h Kontroll vs. 48h HU10; Panel B: \* $p < 0,05$  24h Kontroll vs. 24h HU10, # $p < 0,05$  24h HU10 vs. Ant+24h HU10; Panel C: \* $p < 0,05$  48h Kontroll vs. 48h HU10, # $p < 0,05$  48h HU10 vs. Ant+48h HU10; Panel D: \* $p < 0,05$  24h Kontroll vs. 24h HU10; # $p < 0,05$  24h HU10 vs. A2b+24h HU10; Panel E: \* $p < 0,05$  48h Kontroll vs. 48h HU10; # $p < 0,05$  48h HU10 vs. A2b+48h HU10 (egyutas ANOVA, Sidak)

#### ***4.11 HU-stimulált retinoblasztóma (Rb) fehérje foszforiláció MCF7 sejtekben***

Az Rb fehérje egyike a sejtciklus legfontosabb szabályozóinak. 10 nM-os HU kezelés hatására szignifikáns Rb fehérje foszforiláció indukálódott MCF7 sejtekben 48 órával a kezelés megkezdése után. Ez a foszforiláció blokkolható volt a MEK inhibitor U0126 (12. ábra/A) jelenlétében, vagy a PKA inhibitor H89 (12. ábra/B) előkezeléssel. Ez arra engedett következtetni, hogy a MEK fehérje és a PKA fontos közvetítő szerepet játszanak a humán urokortin által indukált jelátviteli folyamatok szabályozásában MCF7 sejtekben, az Rb fehérje irányába.



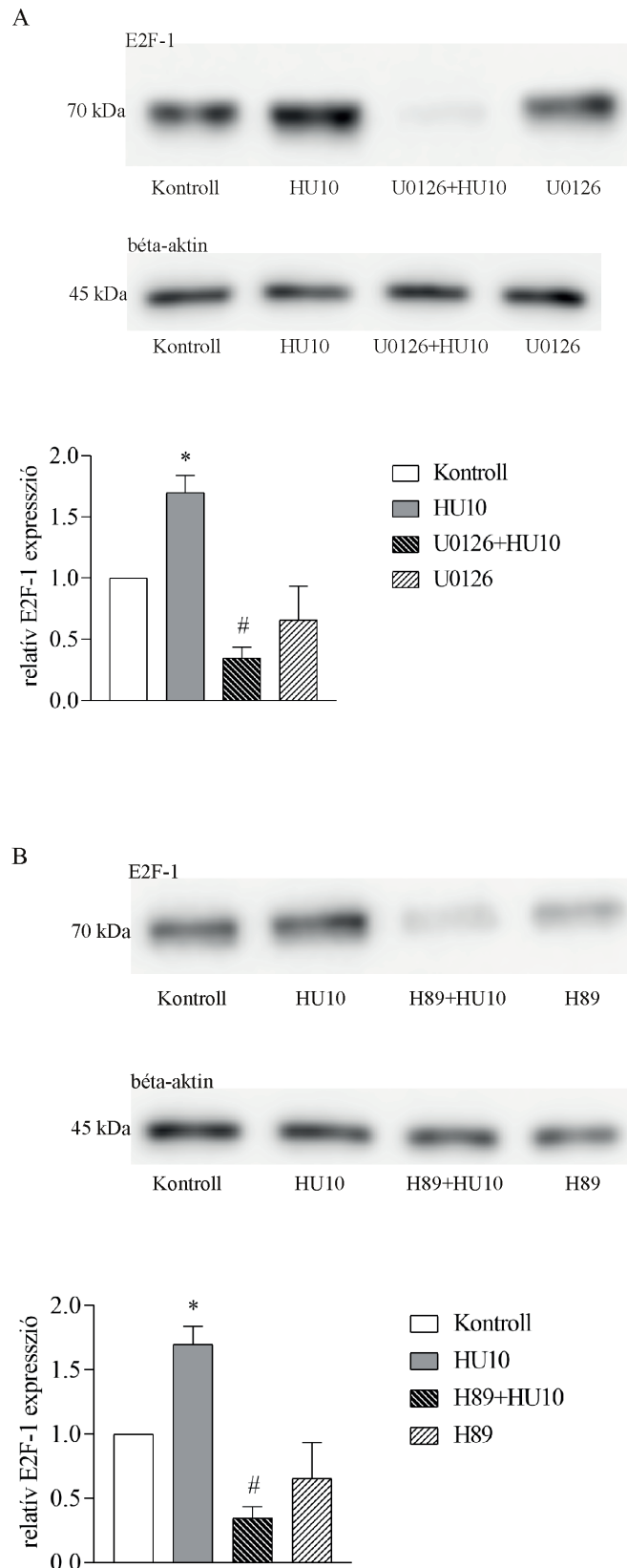
**12. ábra:** HU10-indukált Rb foszforiláció MCF7 sejtekben, Western blottal vizsgálva. 48 órás HU10 kezelés hatására markáns Rb fehérje foszforiláció indukálódott MCF7 sejtekben. Ez a hatás blokkolható volt MEK inhibitor U0126 (A) és PKA inhibitor H89 (B) jelenlétében. A minták betöltési mennyiségének ellenőrzése ugyanazon a



membránon a béta-aktin jel előhívásával történt, amihez viszonyítva a relatív Rb foszforilációt is meghatároztuk (pRb/béta-aktin). Az oszlopdiagrammon feltüntetett értékek három független kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll; # $p < 0,05$  HU10 vs. U0126+HU10, vs. H89+HU10 (egyutas ANOVA, Tukey).

#### ***4.12 HU kezelés stimulálja az E2F-1 fehérje expresszióját MCF7 sejtekben***

48 órás HU10 kezelés hatására jól látható E2F-1 fehérje expresszió fokozódás indukálódott a sejtekben. Az E2F-1 fehérje egy transzkripciós faktor, mely serkenti az S-fázis gének expresszióját, így fokozva a sejtosztódást. Ez a hatás blokkolható volt MEK inhibitor U0126 (13. ábra/A) és PKA gátló H89 (13. ábra/B) jelenlétében.

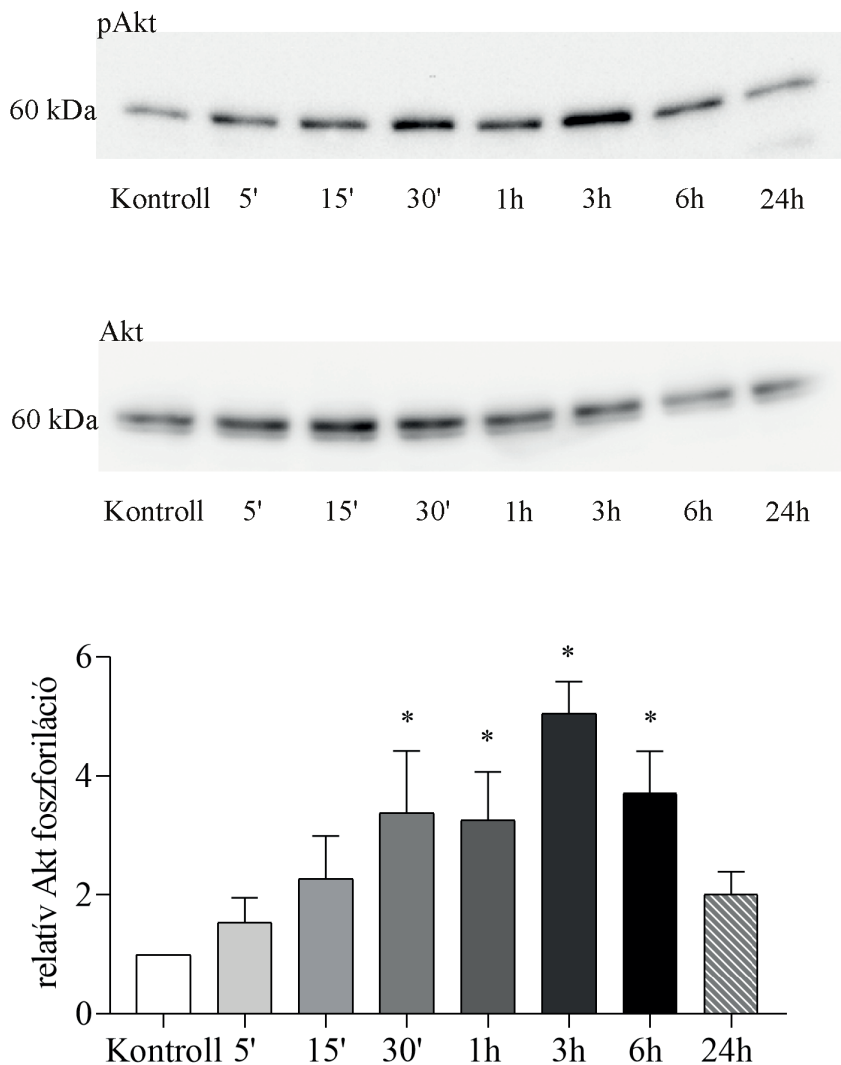


**13. ábra:** HU10 által indukált E2F-1 fehérje expresszió vizsgálata MCF7 sejtekben Western blottal. 48 órás HU10 kezelés hatására fokozódott az E2F-1 transzkripciós faktor expressziója MCF7 sejtekben, mely szignifikáns mértékű volt a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva (A és B panel felső blotjai). Ez a hatás gátolható volt a

MEK inhibitor U0126 (A) és a PKA inhibitor H89 (B) előkezelésekkel. A betöltési mennyiség ellenőrzése a membránon a használt antitestek lemosását („sztrippelését”) követően a béta-aktin jel detektálásával történt. Később ezeket a blotokat használtuk a relatív E2F-1 fehérje expresszió megállapítására. Az oszlopdiagrammon feltüntetett értékek három független kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll; # $p < 0,05$  HU10 vs. U0126+HU10, vs. H89+HU10 (egyutas ANOVA, Tukey).

#### ***4.13 HU kezelés stimulálja a PKB/Akt fehérje foszforilációját MCF7 sejtekben***

Kísérleteink során vizsgáltuk a PKB/Akt fehérje foszforilációját is, hiszen ez a szerin/treonin specifikus fehérje kináz a túlélést közvetítő jelátvitel egyik kulcseleme. HU10 kezelés hatására elnyújtott PKB/Akt foszforiláció indukálódott MCF7 sejtekben. A kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikáns mértékű aktiváló foszforiláció volt mérhető a 30 percestől a 6 órás kezelésig, majd a hatás lecsengett, és a fehérje ismét visszatért a nyugalmi állapotba. A kináz maximális foszforilációja 3 órával a kezelések megkezdése után indukálódott (14. ábra).

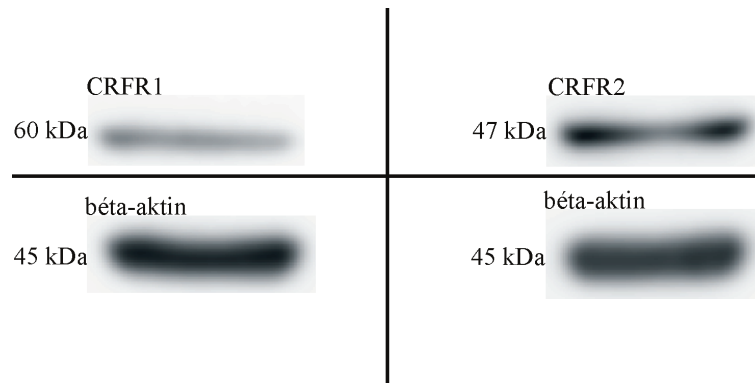


**14. ábra:** HU-indukált PKB/Akt foszforiláció időkinetikájának vizsgálata MCF7 sejtekben Western blottal. Szignifikáns PKB/Akt foszforiláció indukálódott a sejtekben HU10 jelenlétében az oszlopdiaagramon \*-al jelölt időpontokban. A géltre felvitt fehérje töltési mennyiségének ellenőrzése az Akt fehérje inaktív, nem foszforilált formájának mennyiségmérése alapján történt (alsó blot). Ezeket a jeleket használtuk a relatív Akt foszforiláció meghatározására (pAkt/Akt). Az oszlopdiaagramon feltüntetett értékek három egymástól független kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll (egyutas ANOVA, Dunnett)

#### 4.14 CRFR expresszió vizsgálata HeLa sejtekben

Az MCF7 sejteken végzett vizsgálatainkat követően figyelmünk egy másik, ugyancsak a női reproduktív traktus szövetéből származó sejtvonal irányába terelődött, így HeLa

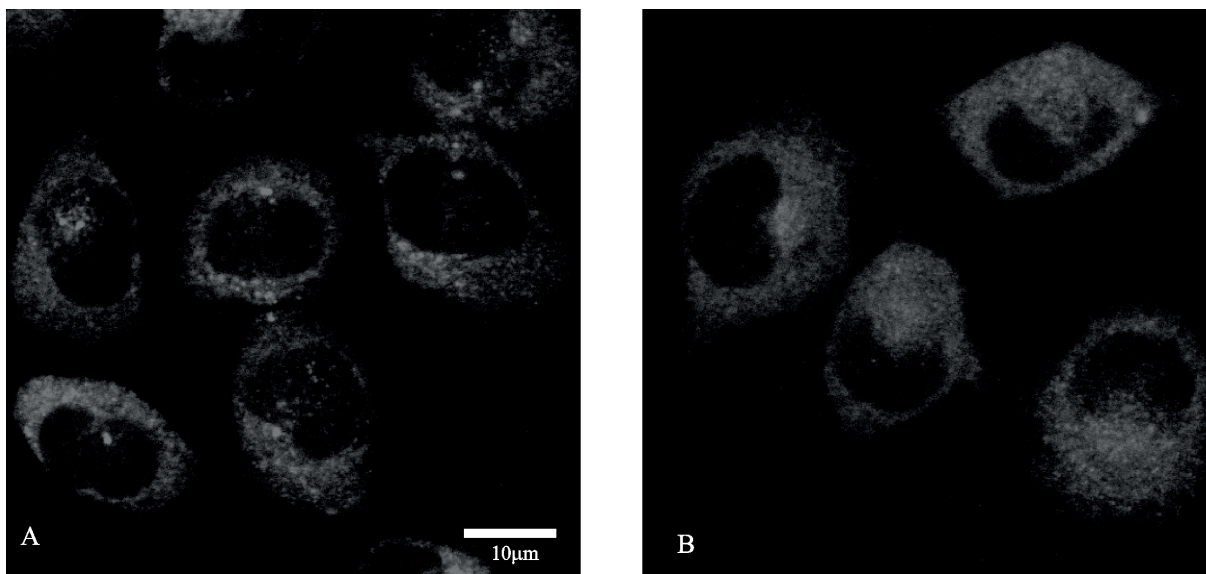
sejtvonalon is megvizsgáltuk a CRFR1 és CRFR2 receptorok expresszióját. Ahogy a 15. ábra mutatja, mindkét receptor izoforma jelen van ebben a sejtvonalban is. Ezeket is a korábban már használt, CRFR1 és CRFR2-t specifikusan felismerő antitestekkel, immunoblot módszerrel detektáltuk.



**15. ábra:** CRFR1 és CRFR2 jelenlétének vizsgálata HeLa sejtekben. Western blot segítségével mutattuk ki a CRFR1 (60 kDa) és CRFR2 (47 kDa) receptorokat, izoforma-specifikus antitestekkel. A betöltött fehérje mennyiségét a béta-aktin jel mérésével állapítottuk meg.

#### ***4.15 CRFR1 és CRFR2 lokalizáció HeLa sejtekben immunfluoreszcenciával***

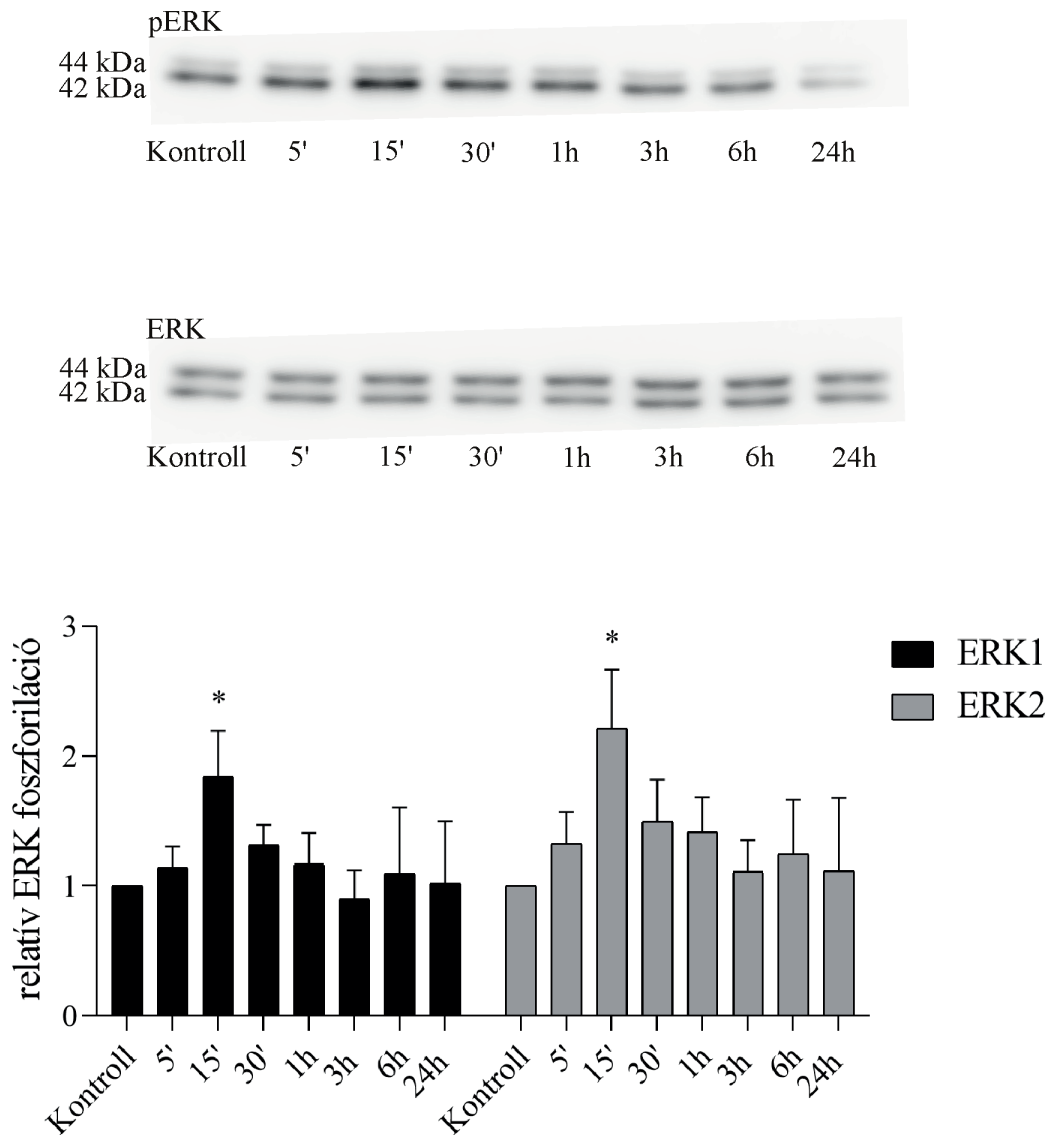
CRFR-specifikus antitestek, valamint az ezeket felismerő Cy3-fluorofórral konjugált másodlagos ellenanyag használatával vizsgáltuk a CRF receptor izoformák intracelluláris elhelyezkedését HeLa sejtekben. Ahogy azt a 16. ábra (A és B) is mutatja, mindkét CRFR izoforma immunreaktivitása jelen van a sejtek membránja mentén, erős citoplazmatikus expressziót mutatva. A CRFR1 immun-jel durvább, míg a CRFR2 finomabb szemcséket generált.



**16. ábra:** CRFR1 és CRFR2 intracelluláris lokalizációja lézer pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkópiával. A CRFR1 (A) és a CRFR2 (B) immun-jel is jól észlelhető a HeLa sejtek citoplazmájában. Az elsődleges antitestek kihagyásával készült metodikai kontroll nem eredményezett immun-jelet, ahogy az a 20. D ábrán is látható. Az „A” panelen lévő méretarányos sáv mindkét mikroszkópos felvételre vonatkozik.

#### ***4.16 HU-stimulált ERK1/2 foszforiláció időkinetikája HeLa sejtekben***

HeLa sejtekben is megvizsgáltuk az urokortin esetleges ERK1/2 MAPK foszforilációt szabályozó hatását. Korábbi, HU-kezelt MCF7 sejtekkel nyert eredményeink alapján az urokortin kezelések végkoncentrációját ebben a sejtvonalba is 10 nM-ban állapítottuk meg. Időkinetikai kísérletünk során azt tapasztaltuk, hogy 15 perces HU kezelés hatására markáns, átmenti ERK1/2 MAPK foszforiláció indukálódott HeLa sejtekben, majd a jelintenzitás gyorsan visszaesett az alapszint körüli értékre (17. ábra).

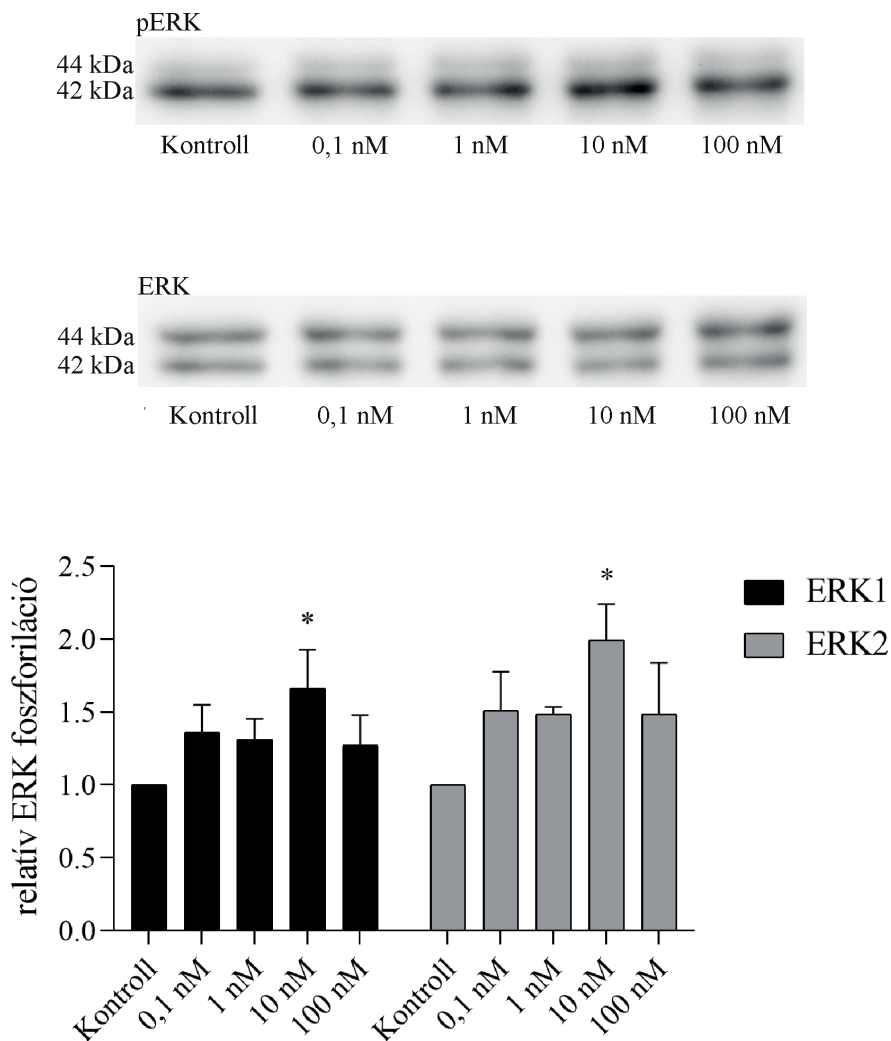


**17. ábra:** HU-indukált ERK1/2 foszforiláció időkinetikája HeLa sejtekben. Immunoblot segítségével vizsgáltuk a sejtek ERK1/2 MAPK foszforilációját, miután 10 nM koncentrációjú HU-val kezeltük őket az ábrán feltüntetett időpontokban. Kontrollként a kezeletlenül hagyott minták szolgáltak. A kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikáns ERK1/2 foszforiláció (pERK a felső bloton) indukálódott 15 perccel a kezelések megkezdése után. A relatív ERK foszforilációt a pERK1/2/ össz-ERK (alsó blot) jelek aránya alapján határoztuk meg. Az oszlopdiaagramon feltüntetett értékek öt független kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll (kétutas ANOVA, DUNNET).

## 4.17 HU-indukált ERK1/2 foszforiláció koncentráció függésének vizsgálata

### HeLa sejtekben

A HeLa sejteket különböző koncentrációjú HU-val kezeltük (18. ábra), a korábbi, MCF7 sejtekben is használt séma szerint. 15 perces HU kezelés hatására szignifikáns ERK1/2 foszforiláció indukálódott a sejtekben 10 nM-os HU tenyészetekhez adásának hatására, míg a többi kezelési koncentráció nem bizonyult ennyire hatékonynak. Így erősítettük meg, hogy az általunk eddig más sejtvonalakon használt, 10 nM-os koncentráció a legoptimálisabb mennyiség a további kísérleteink elvégzéséhez is.



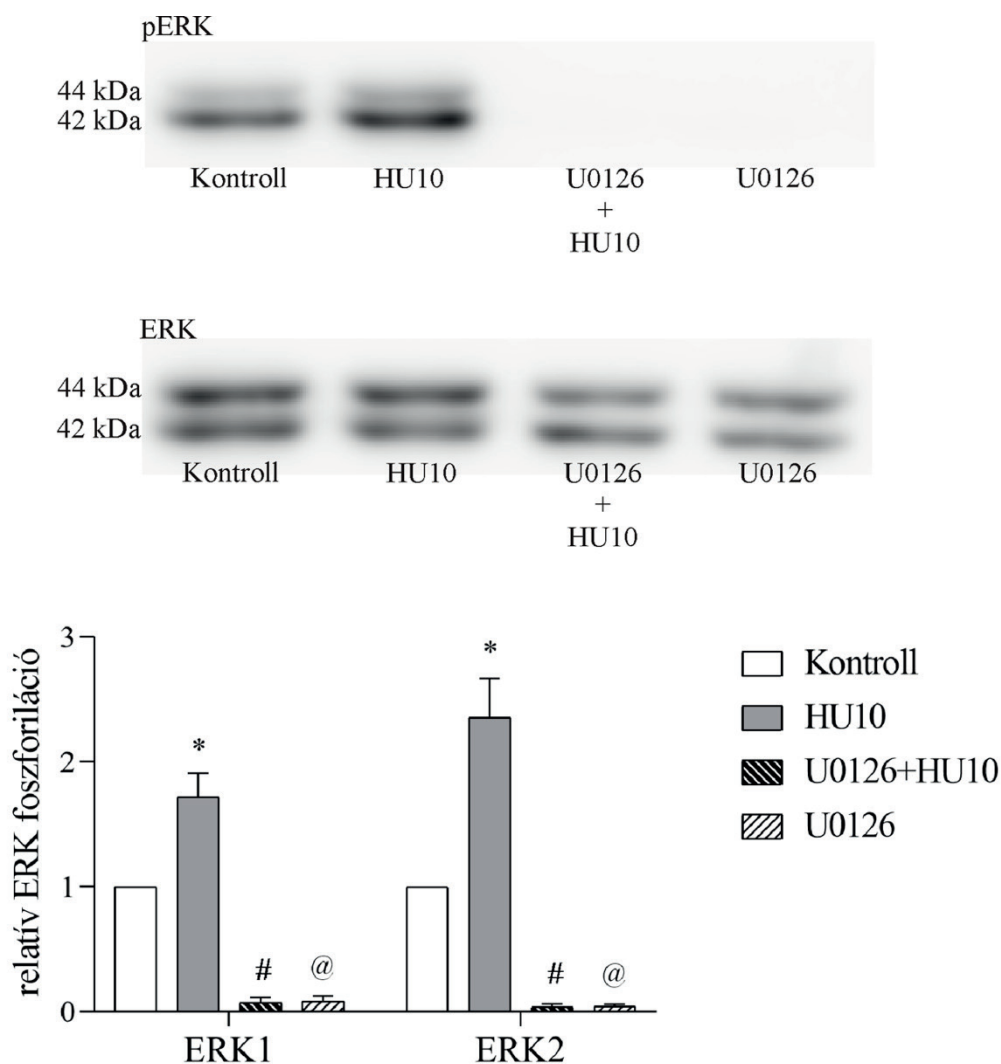
**18. ábra:** Különböző koncentrációjú HU kezelések hatása az ERK1/2 foszforilációra Western blottal. A HeLa sejteket humán urokortin különböző hígításaival (0,1 nM-100



nM) kezeltük (15 percig, a maximális pERK1/2 indukció elérése érdekében), illetve a kontroll mintákat kezeletlenül hagytuk. 10 nM-os HU kezelés hatására szignifikáns ERK1/2 MAPK foszforiláció következett be. A relatív ERK aktivitás meghatározásához a fehérje inaktív, nem foszforilált formájának immun-jelét használtuk (ERK, alsó blot). Az oszlopdiagramon feltüntetett értékek négy egymástól független kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  Kontroll vs. 10 nM HU (kétutas ANOVA, Dunnett).

#### ***4.18 MEK gátlása HU-kezelt HeLa sejtekben***

Ebben a sejtvonalban is vizsgáltuk a MEK szerepét a HU-indukált ERK1/2 MAPK foszforilációjában. A sejtek 30 perces előkezelése a MEK kináz aktivitását gátló U0126 inhibitorral teljesen megszüntette a HU ERK1/2-t aktiváló képességét. Továbbá a 19. ábra felső blotja alapján az is látható, hogy a sejtek kezelése önmagában az inhibitorral csökkentette az alap ERK1/2 foszforilációt is, itt ugyanis gyakorlatilag nem kaptunk érzékelhető jelet. Eredményeink alapján tehát a MEK fehérje kulcsszerepet játszik a HU-indukált ERK1/2 foszforilációban HeLa sejtekben, csakúgy, mint MCF7 sejtekben (5. ábra).

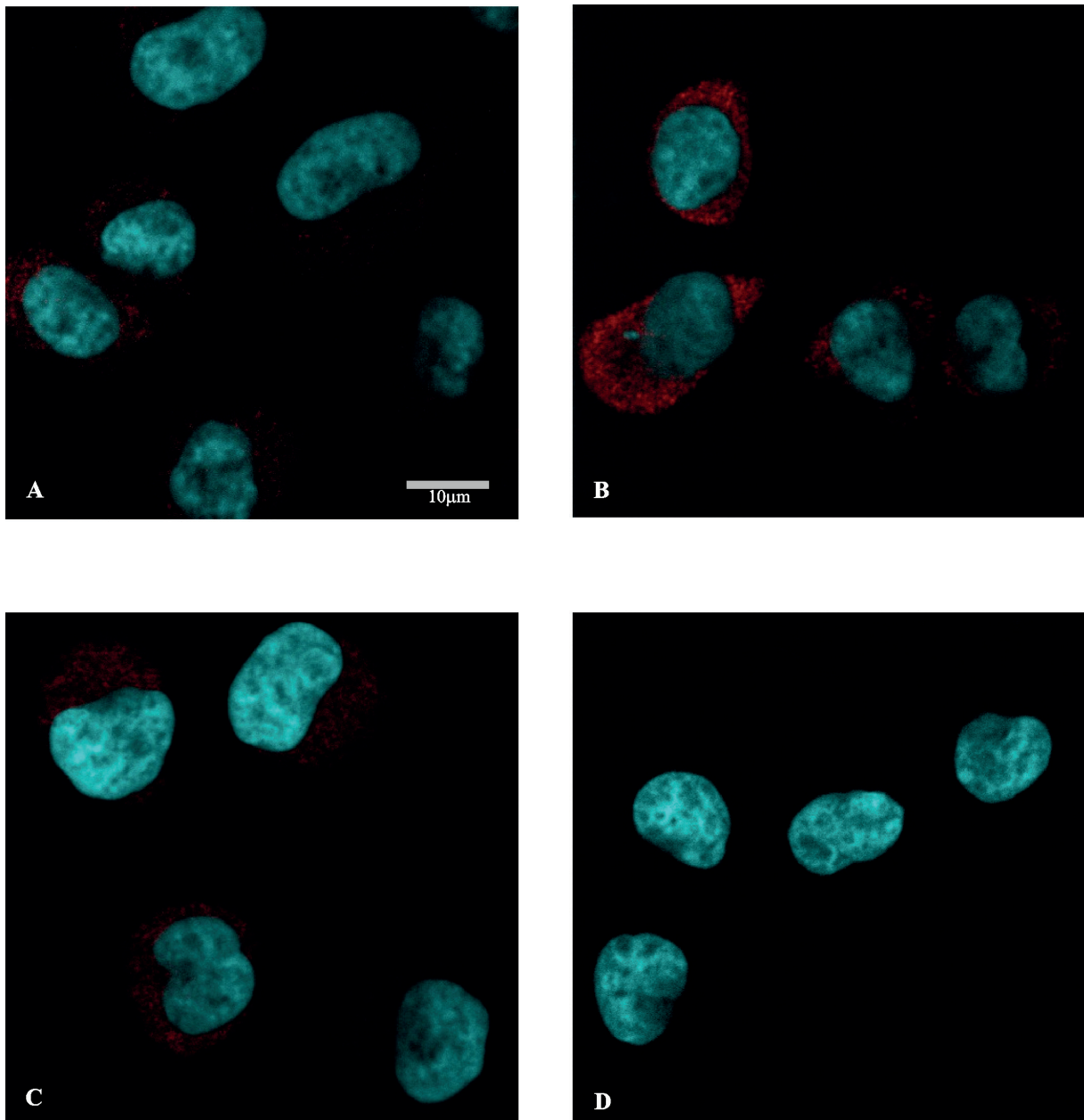


**19. ábra:** MEK gátlás hatása a HU-indukált ERK1/2 foszforilációra HeLa sejtekben. A HeLa sejteket MEK inhibitor U0126-tal kezeltük elő 30 percig, 20  $\mu$ M végső koncentrációt alkalmazva. A gátlás folytatódott a 15 perces HU10 kezeléssel egyidőben is (az előkezeléssel együtt 45 perc). A gátló szignifikánsan csökkentette a HU-indukált, valamint az alap ERK1/2 foszforilációt (pERK) is. A fehérje nem foszforilált (ERK, alsó blot) formáját használva állapítottuk meg a relatív ERK foszforilációt (pERK1/2/össz-ERK). Az ábrán látható értékek öt egymástól függetlenül elvégzett kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  Kontroll vs. HU10; # $p < 0,05$  HU10 vs. U0126+HU10; @ $p < 0,05$  Kontroll vs. U0126 (kétutas ANOVA, Tukey).

#### 4.19 A pERK1/2 intracelluláris lokalizációja HU-kezelt HeLa sejtekben

A pERK1/2 sejtben belüli lokalizációjának megállapítása immunfluoreszcenciával, lézer pásztázó konfokális mikroszkóp használatával történt. A kezeletlen kontroll sejtekben gyenge,

alig észrevehető pERK1/2 jelet detektáltunk a sejtek citoplazmájában. 15 perccel a HU kezelés megkezdése után a kontrollhoz képest jóval markánsabb pERK1/2 jel volt látható, szintén a sejtek citoplazmájában. 24 órával a HU10 kezelés kezdetét követően ismét gyengébb, citoplazmatikus jelet detektáltunk a sejtekben (20. ábra). A mikroszkópos felvételek pERK jelintenzitása összhangban van a pERK1/2 időkinetikai eredményünket prezentáló Western blot jeleinek erősségével (17. ábra).

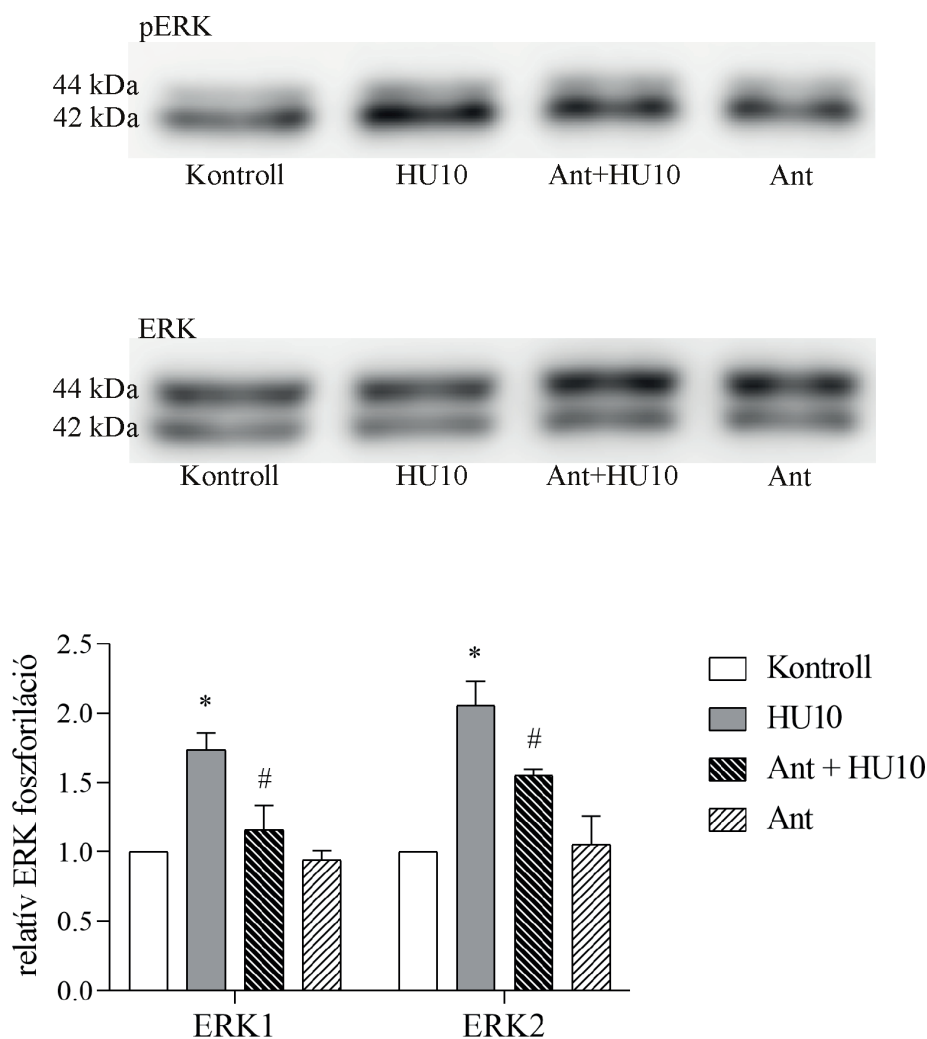


**20. ábra:** Intracelluláris pERK1/2 lokalizáció HeLa sejtekben konfokális mikroszkóppal. „A”: gyenge foszfo-ERK1/2 jel a kezeltlen kontroll sejtek citoplazmájában.

„B”: erősebb pERK1/2 immun-jel a sejtek citoplazmájában 15 perccel a HU kezelés megkezdése után. „C”: gyengébb pERK1/2 immun-jel 24 órával a HU kezelést követően. „D”: az elsődleges antitest kihagyásával készített módszertani kontroll mintán nem észlelhető immun-jel az alkalmazott mikroszkópos beállítások mellett. A sejtmagokat Hoechst 33342-vel (Calbiochem, La Jolla, CA) festettük meg. Az „A” ábrán látható méretarányos skála (10  $\mu$ m) mind a négy (A-D) immunfluoreszcens felvételre vonatkozik.

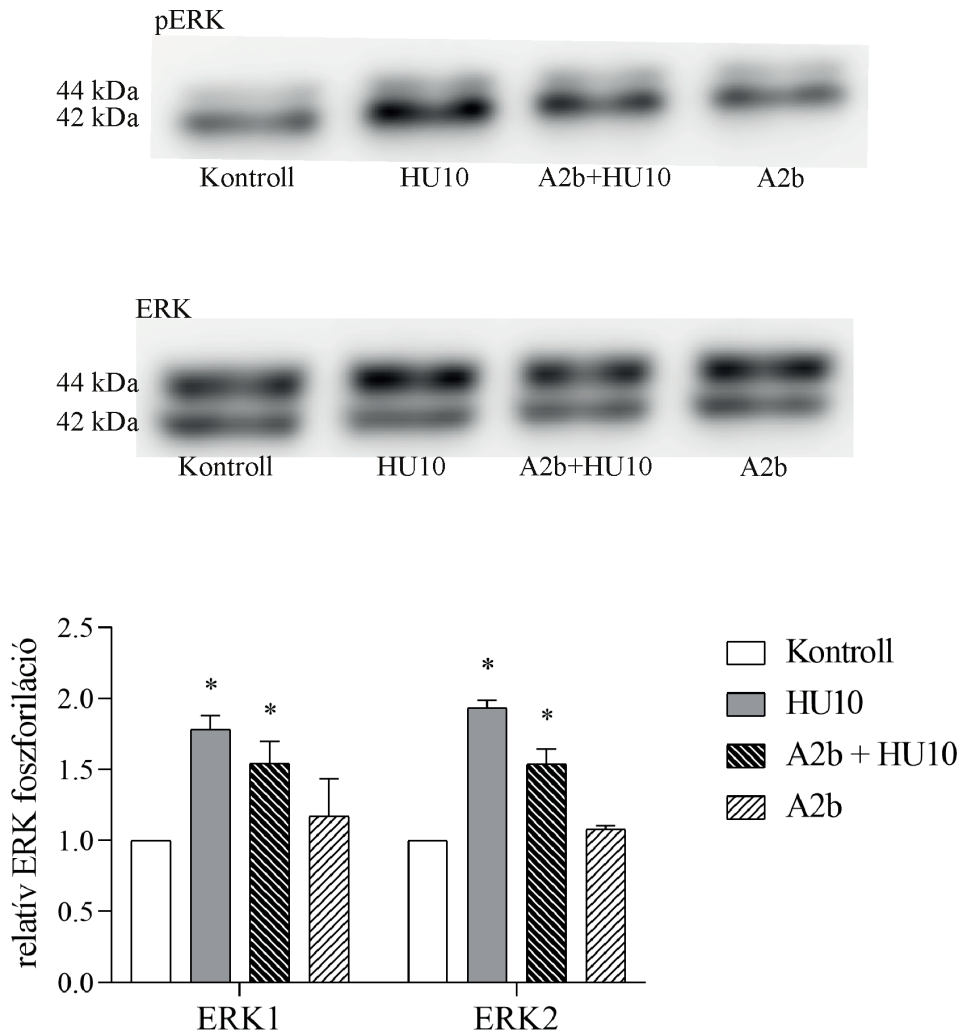
#### ***4.20 CRF receptorok szelektív gátlása HeLa sejtekben***

CRFR izoforma-specifikus inhibitorokkal vizsgáltuk a receptorok szerepét a HU-stimulált ERK1/2 foszforilációban. A HeLa sejtek előkezelése a CRFR1-specifikus antagonistá Antalarminnal szignifikánsan csökkentette a HU ERK1/2-t foszforiláló képességét (21. ábra). A CRFR1 tehát a HU intracelluláris jelátvitelének fontos közvetítője.



**21. ábra:** CRFR1 gátlás hatásának vizsgálata HeLa sejtekben Western blottal. A sejteket 100 nM végkoncentrációjú CRFR1 inhibitor Antalarminnal kezeltük. A gátlás fél órával az urokortin kezelése megkezdése előtt indult, illetve folytatódott tovább a 15 perces HU10 kezeléssel egyidőben (összesen 45 perc) is. A HU10-zel kezelt csoportban mért foszforilációhoz képest az inhibitor (Ant) jelentős mértékben csökkentette a HU-indukált ERK1/2 aktivációt. A relatív ERK foszforiláció meghatározása a pERK1/2/ össz-ERK viszonyítás alapján történt. Az ábrán bemutatott értékek három egymástól független kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  Kontroll vs. HU10; # $p < 0,05$  HU10 vs. Ant+HU10 (kétutas ANOVA, Tukey).

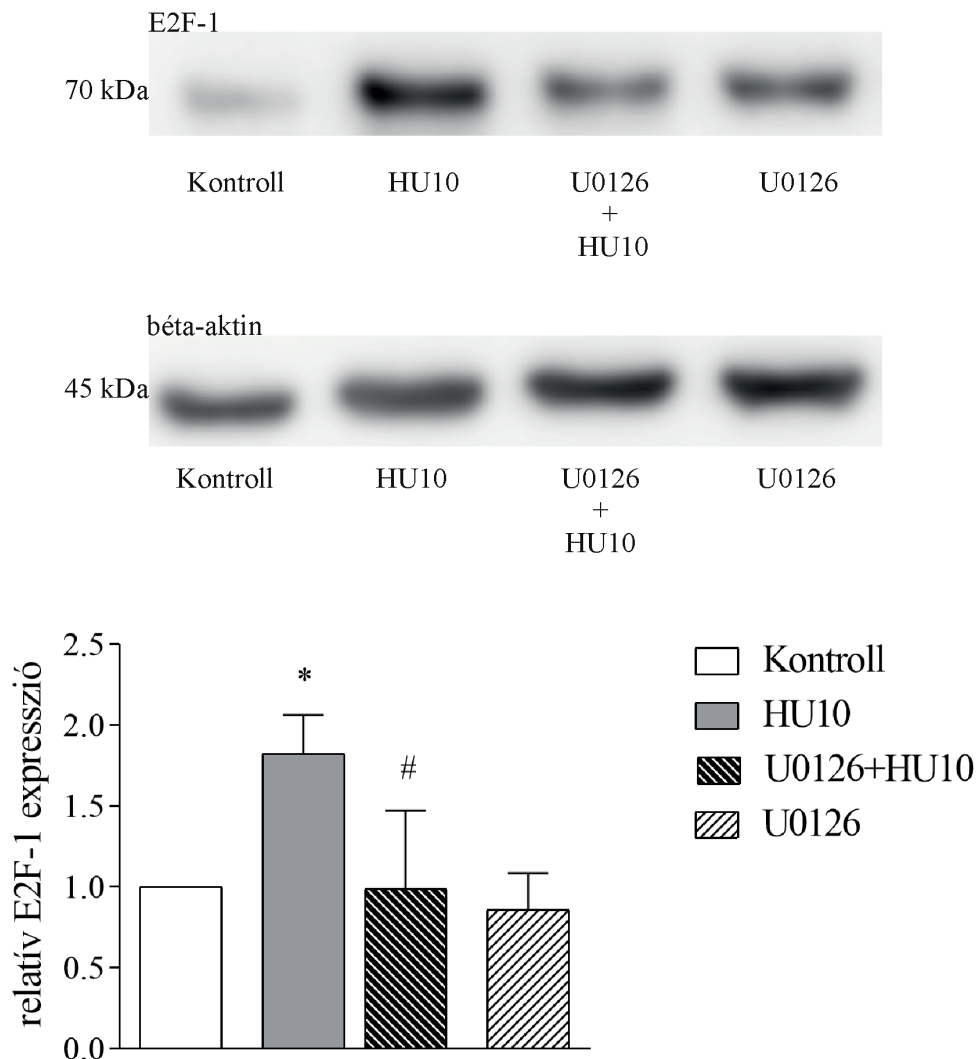
A CRFR2-specifikus inhibitor A2b ugyan kis mértékben csökkentette az urokortin ERK1/2-t foszforiláló képességét HeLa sejtekben, de szignifikáns különbség itt nem volt mérhető a csak humán urokortinnal kezelt csoporthoz képest (22. ábra).



**22. ábra:** CRFR2 gátlás hatásának vizsgálata HeLa sejtekben Western blottal. A sejteket fél órával a 15 perces urokortin kezelés megkezdése előtt 100 nM végkoncentrációjú CRFR2 antagonistá A2b-vel kezeltük 30 percig (összesen 45 perc). Az A2b nem csökkentette markánsan a HU-indukált ERK1/2 aktivációt, a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva szignifikáns ERK1/2 foszforiláció (pERK a felső blotton) mérhető az inhibitor jelenlétében is. A fehérje nem foszforilált formáját (ERK) használtuk a relatív ERK foszforiláció meghatározásához (pERK1/2/össz-ERK). Az ábrán bemutatott értékek három egymástól független kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll (kétutas ANOVA, Tukey).

#### 4.21 HU-stimulált E2F-1 fehérje expresszió HeLa sejtekben

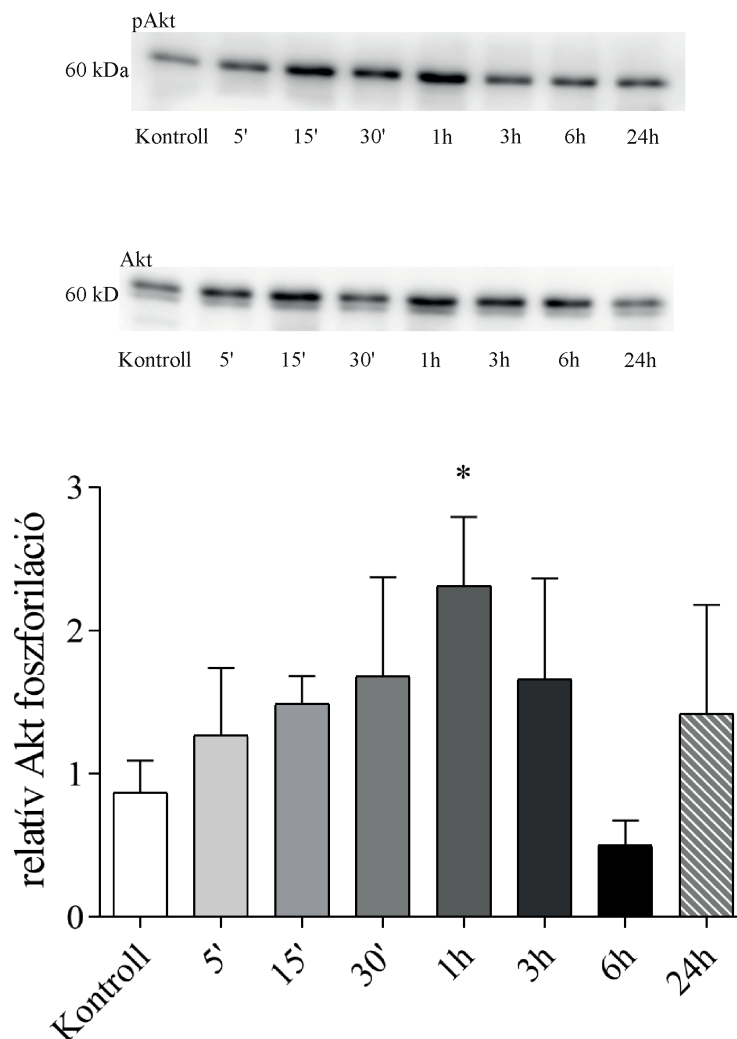
24 órás urokortin kezelés hatására szignifikánsan fokozódott az S-fázis géneket indukáló E2F-1 transzkripciós faktor expressziója HeLa sejtekben. Ez a hatás azonban blokkolható volt a MEK inhibitor U0126 jelenlétében, ahogy azt a 23. ábra is mutatja.



**23. ábra:** HU-indukált E2F-1 expresszió Western blottal. 24 órás HU10 kezelés hatására szignifikánsan emelkedett az E2F-1 transzkripciós faktor szintje a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ez a hatás gátolható volt MEK inhibitor U0126-tal. A géltre felvitt fehérje mennyiségének ellenőrzésére a béta-aktin immun-jelet használtuk. A relatív E2F-1 expressziót az E2F-1/béta-aktin arány alapján határoztuk meg. Az ábrán feltüntetett értékek három egymástól független kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll, # $p < 0,05$  HU10 vs. U0126+HU10 (egyutas ANOVA, Tukey)

#### 4.22 PKB/Akt fehérje foszforilációjának vizsgálata HU-kezelt HeLa sejtekben

Western immunoblot módszerrel vizsgáltuk HeLa sejtekben a PKB/Akt fehérje foszforilációjának időkinetikáját, csakúgy, mint korábban MCF7 sejtekben. 1 órás HU10 kezelés hatására szignifikáns Akt foszforiláció indukálódott a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva, majd a jelintenzitás gyorsan az alapszint körüli értékre esett vissza (24. ábra).

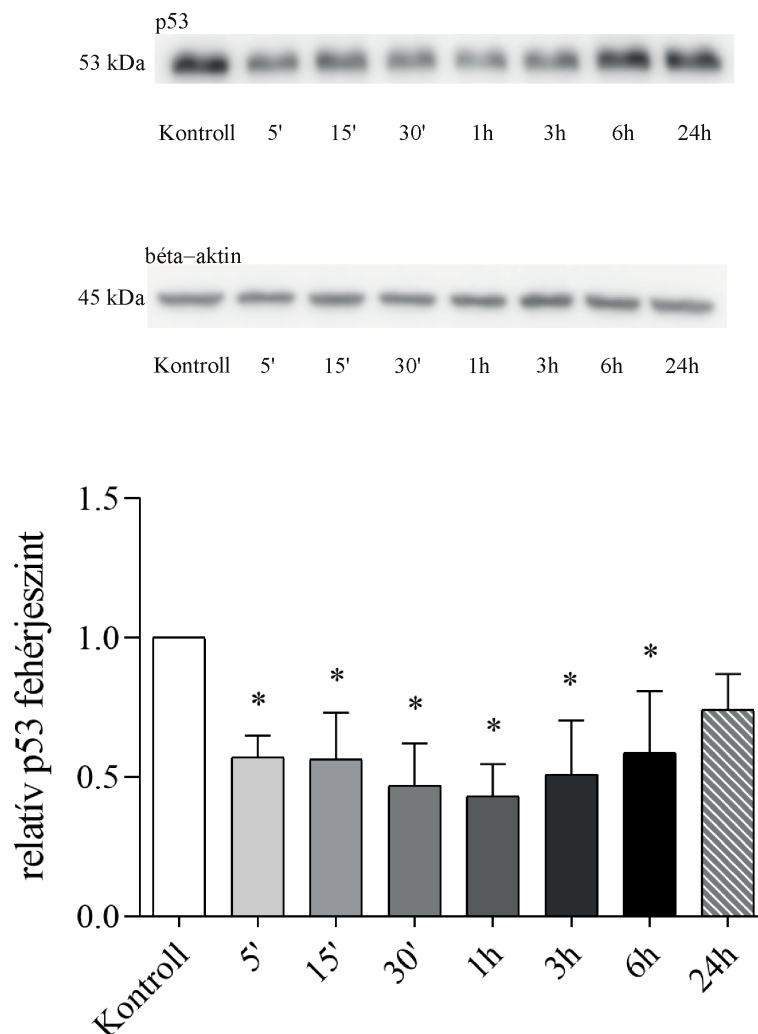


**24. ábra:** PKB/Akt foszforiláció időkinetikája Western blottal HeLa sejtekben. 10 nM-os HU kezelés hatására markáns Akt foszforiláció (pAkt, felső blot) indukálódott 1 órával a kezelések megkezdése után. A betöltött minta mennyiségének ellenőrzése a fehérje nem foszforilált (Akt, alsó blot) formájának detektálásával történt. Később ezt az Akt fehérje jelet használtuk a relatív Akt foszforiláció meghatározására (pAkt/Akt). Az ábrán látható értékek négy egymástól független kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll (egyutas ANOVA, Dunnett)



#### 4.23 HU kezelés csökkenti a p53 fehérje szintet HeLa sejtekben

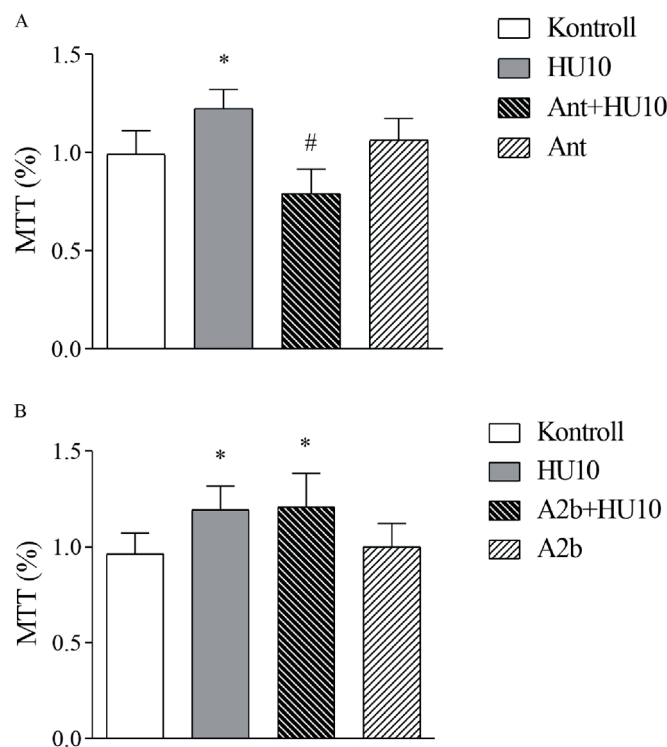
HeLa sejtek fehérje lizátumában Western blottal vizsgáltuk a p53 fehérje lehetséges szerepét a HU-indukált jelátviteli utakban. Ahogy az a 25. ábrán látható, HU10 kezelés hatására elnyúló, szignifikáns p53 fehérje szint csökkenés következett be (az 5 perc - 6 óra közötti kezelési idő tartományban) a kontroll csoporthoz viszonyítva. A kezelés napjának végére a jelintenzitás visszatért a kezeletlen sejtek lizátumában mért érték körüli szintre.



**25. ábra:** Csökkent p53 expresszió HU-kezelt HeLa sejtekben Western blottal. HU10 jelenlétében szignifikáns p53 fehérje expresszió csökkenés látható az oszlopdiaagramon \*-al jelölt időpontokban (5 perc – 6 óra). A membránokon később az aktin immun-jelét is megmértük. A relatív p53 fehérje szintet a p53/ béta-aktin arány alapján határoztuk meg. Az ábrán szereplő értékek négy egymástól független kísérlet átlagai és a szórások. \* $p < 0,05$  vs. Kontroll (egyutas ANOVA, Dunnett)

#### 4.24 Sejtprolifерáció mérése MTT-esszével HeLa sejtekben

Az urokortin által stimulált jelátviteli utak szignalizációs komponenseinek vizsgálata után a HeLa sejtek biológiai válaszára voltunk kíváncsiak a peptid ligand jelenlétében. A HU kezelés sejtosztódásra gyakorolt lehetséges hatását MTT túlélési és proliferációs esszével vizsgáltuk. A hagyományos tenyésztő médiumban tartott, kezeletlen kontroll csoporthoz képest szignifikáns sejtszám gyarodást mértünk 24 órás HU10 kezelés hatására. A HU sejtprolifерációt fokozó hatása gátolható volt CRFR1 inhibitor Antalarminnal, azonban a CRFR2 antagonistá A2b előkezelés hatástalannak bizonyult a HU-stimulált, fokozott mértékű sejtosztódás gátlásában (26. ábra).



**26. ábra:** Fokozott mértékű sejtosztódás HU-kezelt HeLa sejtekben MTT méréssel. 24 órás HU10 kezelés hatására jelentős mértékben fokozódott a sejtek osztódási üteme a kezeletlen kontroll csoporthoz képest. Ez a hatás gátolható volt CRFR1-specifikus inhibitor Antalarminnal (A), míg a CRFR2 antagonistá A2b előkezelés nem akadályozta a HU-t a sejtprolifерációt serkentő hatásának kifejtésében (B). Az oszlopdiaagramon megjelenő értékek hat egymástól függetlenül elvégzett kísérlet átlagai és a szórások. Panel A: \* $p < 0,05$  Kontroll vs. HU10; # $p < 0,05$  HU10 vs. Ant+HU10; Panel B: \* $p < 0,05$  vs. Kontroll (egyutas ANOVA, Tukey)

## 5 MEGBESZÉLÉS

A CRF családba tartozó urokortinok változatos expressziót mutatnak. Előfordulnak a központi idegrendszerben és perifériás szervekben is megtalálhatóak, úgy, mint a szívben, méhlepényben és a gyomor-bél rendszerben (Bale & Vale, 2004; Athina Kaprara et al., 2010). Meghatározó szerepet játszanak a táplálékbevitel, a stresszkezelés és a szorongás szabályozásában, továbbá hatással vannak a kardiovaszkuláris rendszerre és befolyásolják az immunrendszer működését is (Arcuri et al., 2002; Athina Kaprara et al., 2010; Reul, J.M., Holsboer, 1953). A CRF neuropeptidok és receptoraik expresszálódnak ezen kívül többféle daganat típusban és azok mikro környezetében, úgy, mint humán emlőrák és glióma sejtvonalakban, patkány feokromocitóma (PC12) sejtekben vagy Y79 retinoblasztómában, AtT-20 hipofízis karcinómában és még számos egyéb sejt típusban. Ennél fogva ezeknek a peptideknek fontos szabályozó szerepük lehet akár a tumoros betegségek alakulásában is (Androulidaki et al., 2009; Arcuri et al., 2002; A. Kaprara et al., 2010; Athina Kaprara et al., 2010; Wang & Li, 2007).

A CRF peptidek tumorsejtekre gyakorolt hatása – összefüggésben a specifikus CRF receptor izoformák expressziójával – nagymértékben sejt- és szövettípus függő. A CRF receptorok által közvetített ERK1/2 MAPK aktivációt már számos sejt típusban leírták, például neuronális, szív- és izomsejtekben. A szakirodalomból az is jól ismert, hogy az ERK1/2 fehérjék a sejtproliferáció központi szabályozói normál, azaz egészséges és rosszindulatú tumorsejtekben egyaránt (Brar et al., 2004 a; 2004 b). A peptid ligand sejt felszíni receptorához kapcsolódva heterotrimer G-fehérje G $\alpha$ s alegységét aktiválja, ami ekkor stimulálja effektorát, az adenilát ciklázot. Utóbbi egy transzmembrán fehérje, ami fokozza a sejtek cAMP termelését (Brar et al., 2004). A vízoldékony másodlagos messenger (hírvivő) cAMP diffúzióval éri el célfehérjéjét a PKA-t, és allosztérikus hatással megváltoztatja annak aktivitását (Elliott-Hunt et

al., 2002). A PKA-n kívül azonban számos egyéb enzimfehérje játszhat még szerepet az ERK1/2 aktiváló foszforilációjában, úgy, mint PKB/Akt, PKC, Raf-1 vagy a PI3K (Brar, Jonassen, et al., 2004; Punn et al., 2006).

Urokortin kezelés hatására ERK1/2 aktiváló foszforiláció indukálódik humán myometrális (méhizomzat) sejtekben is, amely hatás gátolható MEK inhibitor U0126 jelenlétében (Karteris et al., 2004). Az urokortin-indukált ERK1/2 aktiváció védi az izolált patkány szívet ischaemiás és reperfüziós sérülésekkel szemben (Brar, Jonassen, et al., 2004; Elliott-Hunt et al., 2002). A szívizomnak ez a fajta védelme az urokortinok által nem csak *in vitro*, hanem *in vivo* is működik az ERK1/2 MAPK jelátviteli úton keresztül (Davidson et al., 2009; Schulman et al., 2002). Sőt, az urokortin által stimulált ERK1/2 foszforilációt stresszhez való adaptáció (Sananbenesi et al., 2003), neuroprotekciónak (Elliott-Hunt et al., 2002; Pedersen et al., 2002), valamint az apoptózis szabályozása (Dermitzaki et al., 2002; Radulovic et al., 2003) kapcsán is leírták már.

Saját kísérleteinkben HU10 kezelés hatására maximális ERK1/2 foszforiláció indukálódott MCF7 (5 perces HU kezelés) és HeLa (15 perc után a peptid jelenlétében) sejtekben is. Mindkét sejtvonal esetében gyors és átmeneti lefutású ERK1/2 MAPK foszforiláció volt detektálható a Western blotokon, a maximális jelintenzitás hamar a nyugalmi szint körüli értékre esett vissza. Ismert, hogy PC12 sejtekben az átmeneti kinetikájú ERK1/2 aktiváció fokozza a sejtek osztódási képességét (Marshall, 1995). Az MCF7 és HeLa sejtek előkezelése MEK gátló U0126-tal teljesen megszüntette az urokortin ERK1/2-t foszforiláló hatását, sőt az alap ERK1/2 foszforiláció mértékét is jelentős mértékben csökkentette. Eredményeink alapján tehát a MEK fehérje kulcsszerepet játszik a HU-indukált ERK1/2 aktivációban MCF7 és HeLa sejtekben is.

Idegsejtekben a CRF receptor izoformákon keresztül indukált ERK1/2 aktivációt a cAMP/PKA jelátviteli út közvetíti (Elliott-Hunt et al., 2002), míg egér szívizomsejtekben ugyanez a MAPK-t aktiváló foszforiláció PKA független folyamat (Brar et al., 2004). Vannak ráadásul olyan sejtes rendszerek is, melyekben a PKA gátolja az ERK1/2 foszforilációt (Graziani

et al., 2007; Papadopoulou et al., 2004). Egyes sejtekben a PKA foszforilálja a CRFR1-et (Papadopoulou et al., 2004), míg másokban a béta-adrenerg receptorokat (Daaka et al., 1997), ami aztán aktiválja a G-fehérjét, végül ezen keresztül stimulálja az ERK1/2-t.

Kísérleteink során vizsgáltuk a PKA szerepét a HU-stimulált jelátviteli utakban. Az enzim kémiai gátlása H89 inhibítorral akadályozta a HU ERK1/2-t foszforiláló képességét MCF7 sejtekben. Ez alapján MCF7 sejtekben a HU-indukált ERK1/2 foszforiláció PKA függő folyamat. Ezzel szemben HeLa sejtekben nem tapasztaltunk hasonló gátlást H89 jelenlétében.

Az urokortinok által kifejtett biológiai hatás sokfélesége függ a sejtípustól, a CRF ligandtól és a CRF receptor izoformáktól is. Cloudman melanómasejtek kezelése a CRF család különböző peptidjeivel csökkenti a sejtek osztódási képességét, továbbá gátolja a B16 melanóma növekedését *in vivo*, feltételezhetően a CRFR1-en keresztül (Carlson et al., 2001). Ishikawa endometriális sejtvonalban az 1-es típusú CRF receptor sejtosztódást gátló hatást közvetít, míg perifériás limfocitákban az apoptózist mozdítja elő (A. Kaprara et al., 2010). A CRF, mint ligand receptorához kötődve gátolja az MCF7 sejtek proliferációját és apoptózisát is (Androulidaki et al., 2009). Ezzel szemben Minas és munkatársai a CRF és CRFR1-nek a tumorsejtek proliferációját serkentő hatásáról számoltak be (Minas et al., 2007).

Saját kísérleteink során HU10 kezelés hatására ERK1/2 foszforiláció indukálódott mindkét általunk vizsgált (MCF7 és HeLa) sejtípusban. Lézer pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkóp használatával vizsgáltuk a foszforilált-ERK1/2 sejten belüli elhelyezkedését is. 5 perces HU10 kezelés hatására erősebb foszfo-ERK1/2 immun-jelét mutattunk ki az MCF7 sejtek citoplazmájában, és a sejtmagokban is. Vagyis az aktivált, foszforilált-ERK1/2 egy része nukleárisan transzlokálódott az MCF7 sejtekben. Ezzel szemben HeLa sejtekben túlnyomórészt csak a citoplazmában láttunk pERK1/2 immunreaktivitás fokozódást 15 perccel az urokortin kezelés megkezdését követően, fluoreszcencia mikroszkópiával. A citoplazmatikus lokalizációjú ERK1/2 ismerten fokozza a PC12 sejtek proliferációját, míg a nukleáris

elhelyezkedésű ERK1/2 lassítja a sejtciklust és differenciációt indukál ugyanebben a sejttypusban (Marshall, 1995).

Nemrég Koureta és munkatársai CRFR2 immunreaktivitást detektáltak standard tenyésztési körülmények között tartott MCF7 sejtekben, ahol az immun-jel a sejtmembránba lokalizálódott. Ösztadiol kezelés hatására itt a CRFR1 mRNS szintű expressziója is nagymértékben fokozódott a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva kísérletes rendszerükben (Koureta et al., 2020). A CRF és a CRFR1 mRNS szintű expresszióját, valamint a ligand antiproliferatív hatását MCF7 sejtekben Graziani és munkatársai is közzétették egy korábbi tanulmányukban (Graziani et al., 2007).

Western blot, immunfluoreszcens konfokális mikroszkópia és poliklonális anti-CRFR1 és 2 antitestek használatával mi is kimutattuk az 1-es és 2-es típusú CRF receptorok jelenlétét MCF7 és HeLa sejtekben. MCF7 sejtekben a CRFR1 immunreaktivitás főként a plazmamembránba és annak mentén lokalizálódott. A CRFR1 jelnek a sejtmembrán menti elhelyezkedését korábban már mások is leírták (Hasdemir et al., 2012, 2017). Ezzel szemben a CRFR2 immun-jel valamivel szélesebb eloszlási mintázatot mutatott, mélyebbre benyúlva a citoplazmába és szemcsésebb megjelenésű is volt MCF7 sejtekben.

HeLa sejtekben a CRFR1 és 2 immun-jel szintén ott volt a sejtmembrán mentén, de mindkét izoforma esetében még inkább jellemző volt a citoplazmába mélyen benyúló jelmintázat. Ebben a sejttypusban a CRFR1 immunreaktivitás nagyobb, míg a CRFR2 finomabb szemcséket produkált. Annak ellenére, hogy a tenyésztési körülmények és az immuncitokémiai lépések teljesen azonosak voltak a két sejvonallal végzett immunfluoreszcens kísérleteink során, mégis adódtak különbségek a CRF receptor izoformák jeleloszlásában. Mivel MCF7 sejtekben sejtmembrán közeli volt a CRFR1 immun-jel, míg HeLa sejtekben a CRFR1 a citoplazma mélyebb rétegeiben is megjelent, csakúgy, mint a CRFR2 jelmintázat is mindkét sejttypusban,

ezért ezek az eltérések valószínűleg sejtípustól függő, specifikus tulajdonságoknak tudhatók be.

CRF receptorokat expresszáló HL-1 szívizom sejtekben az urokortin által stimulált ERK1/2 foszforiláció blokkolható a CRFR1-specifikus kémiai inhibitor Antalarminnal, és részben gátolható a CRFR2 antagonistá antisauvagine-30-cal (Yuan et al., 2010). Patkányból származó nyelőcső sejtekben a CRFR2-specifikus gátló Astressin2b blokkolja az urokortin hatását az ERK1/2 foszforiláció vonatkozásában (Wu et al., 2007).

Az MCF7 és HeLa sejtek előkezelése a CRFR1 antagonista Antalarminnal szignifikánsan csökkentette a HU ERK1/2-t foszforiláló képességét saját kísérleteinkben, mindkét sejtvonalban. Ezzel szemben a CRFR2 inhibitor Astressin2b jelenlétében nem tudtunk hasonló, az urokortin ERK1/2-t foszforiláló gátló hatását kimutatni egyik fent említett, általunk vizsgált humán sejtvonalban sem. A megfelelő kezeletlen kontroll csoportokhoz viszonyítva HU kezelés hatására szignifikáns ERK1/2 foszforiláció indukálódott A2b jelenlétében MCF7 és HeLa sejtekben is. Eredményeink hangsúlyozzák a CRFR1 fontosságát a HU által stimulált ERK1/2 aktiváló foszforilációban ennél a két sejtípustól. A szakirodalom alapján a CRFR1 elsősorban stressz-adaptív válaszokat közvetít, míg a CRFR2-ről érkező jelek többnyire tompítják az 1-es típusú CRF receptor hatásait, így enyhítve a biológiai rendszerek stresszre adott válaszreakcióit (Hotta et al., 1999; Reyes et al., 2001).

Az urokortinok és az ERK1/2 sejtproliferációt szabályozó hatása tekintetében vizsgáltuk a sejtek HU10 kezelésre adott biológiai válaszát is MTT-essét alkalmazva. Az MTT festék egy tetrazólium só, ami formazánná alakul mitokondriális oxidoreduktáz enzimek hatására, ami viszont csak egészséges sejtekben aktív. Így az átalakított formazán mennyisége összhangban van az életképes sejtek számával.

MCF7 sejteket 24- és 48 órán keresztül HU10 jelenlétében tenyésztve jelentős mértékben emelkedett a formazán kristályokká átalakított MTT festék mérhető mennyisége. Ebből arra

következtethettünk, hogy a HU kezelés fokozza az MCF7 sejtek osztódási képességét. Ez a hatás azonban gátolható volt CRFR1 inhibitor Antalarmin, és CRFR2 antagonistá Arestin2b jelenlétében.

HeLa sejtek 24 órás HU10 kezelése szintén nagymértékben fokozta az MTT festék formazánná alakulását. Vagyis urokortin kezelés hatására a sejtproliferáció üteme szignifikáns mértékben emelkedett HeLa sejtekben is. Ez a sejtosztódást serkentő hatás gátolható volt a CRFR1 inhibitor Antalarmin jelenlétében, míg a CRFR2 antagonistá Arestin2b használata nem akadályozta az urokortin ennek a biológiai hatásának a kifejtésében. Ez utóbbi ismét egy szembeeső eltérés az MCF7 sejtekben tapasztaltakhoz képest, ahol mindkét specifikus receptor antagonistá gátolta az urokortin által stimulált sejtosztódás fokozódást a CRFR1-en, illetve a CRFR2-n keresztül is. Ezek a különbségek ismételen rámutatnak az urokortin jelátvitelének sejttípustól függő, specifikus jellegzetességeire.

Annak érdekében, hogy jobban megértsük az urokortin által stimulált sejtproliferáció fokozódás molekuláris mechanizmusát MCF7 és HeLa sejtekben, Western blottal megvizsgáltunk néhányat a sejtciklust szabályozó legfontosabb fehérjék közül.

Ezek egyike az Rb fehérje, melynek foszforilációja szignifikánsan emelkedett HU kezelés hatására MCF7 sejtekben. Ez a hatás gátolható volt a MEK inhibitor U0126 és a PKA inhibitor H89 jelenlétében is. Ebből arra következtettünk, hogy mindkét enzim szerves része az urokortin sejtosztódást szabályozó jelátviteli hálózatának MCF7 sejtekben. Ezzel szemben HeLa sejtekben a HU kezelés nem indukált szignifikáns Rb foszforiláció emelkedést (utóbbi adat a saját, nem közölt megfigyelésünk).

A másik vizsgált, sejtciklust szabályozó fehérje, az E2F-1 egy transzkripciós faktor, ami az S-fázis gének egyik kulcsfontos aktivátora. HU10 kezelés hatására szignifikánsan emelkedett az E2F-1 fehérje szintje, mindkét általunk vizsgált humán sejtvonalban, és ez a hatás blokkolható volt a MEK inhibitor U0126 jelenlétében. Így ismét megerősítettük azt a korábbi



eredményünket, hogy a MEK enzim fontos szerepet játszik a humán urokortin sejtosztódást szabályozó jelátvitelében MCF7 és HeLa sejtekben egyaránt. Továbbá MCF7 sejtekben az urokortin által indukált E2F-1 fehérje szint emelkedését is gátolni tudtuk a PKA inhibitor H89 előkezeléssel, ami arra utal, hogy ez az enzim is része a HU jelátviteli útjainak ebben a sejttypusban. Ehhez hasonló gátló hatást HeLa sejtekben nem tapasztaltunk, ami újfent lényeges, sejttypustól függő különbségekre utal.

MCF7 sejtekben egyébként ATP-esszével is vizsgáltuk az urokortin sejtekre gyakorolt hatását. HU jelenlétében szignifikánsan csökkent a mért lumineszcens jel intenzitása, vagyis a sejtek ATP termelése. A sejtek által termelt ATP mennyisége pedig arányos a metabolikus aktivitással, ezen át pedig összefügg az életképes sejtek számával is. Ebből akár arra is következtethetnénk, hogy a HU csökkenti az MCF7 sejtek proliferációs képességét. Viszont a kísérleteink során feltárt molekuláris jelátviteli mechanizmusok a HU jelátvitelében az MTT-esszé által detektált biológiai hatást, vagyis a sejtosztódás fokozódást támogatták a peptid jelenlétében. Ilyen például a Rb fehérje foszforilációjának, vagy az E2F-1 transzkripció faktor szintjének szignifikáns mértékű emelkedése urokortin adása mellett. Az ATP termelés HU jelenlétében megfigyelt csökkenését ennek tükrében, és a közlésre beküldött adatainkat értékelő független bírálókkal is egyetértésben más, általunk nem vizsgált anyagcsere mechanizmusoknak tulajdonítottuk.

Az apoptózis, vagyis a programozott sejthalál egy másik olyan biológiai jelenség, aminek közvetítésében CRF receptorok gyakran szerepet játszanak. Makrofágokban urokortin kezelés apoptózist indukál a CRFR2-n keresztül, mely magában foglalja egyes pro-apoptotikus fehérjék aktivációját, így például a Bad és a Bax fehérjékét (Tsatsanis et al., 2005). Hasonló molekuláris mechanizmussal indukál apoptózist a CRF peptid az 1-es típusú CRF receptoron keresztül RM-1 egér prosztatarák, és LNCaP humán prosztatarák sejt vonalakban. Az előbb említett sejtek kezelése UCN2-vel azonban fokozza az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérje

expresszióját a CRFR2-n keresztül, ami a sejtek túlélését támogatja (Jin et al., 2011). PC12 sejteket CRF jelenlétében tenyésztve a sejtek apoptózissal elpusztulnak, mely hatás a CRFR1-en keresztül közvetített (Dermitzaki et al., 2002). Más sejtípusokban, mint például Wistar patkányokban a CRF neuropeptidek gátolják az apoptózist (Mayoral-González et al., 2022). Hasonlóan működik a CRF és az urokortinok a CRFR2-t expresszáló AGS, emberi gyomorrák eredetű sejtvonalban is. Az urokortin jól ismert kardioprotektív hatásán kívül egy másik szervben, az emberi gyomorban is védő hatást fejt ki az apoptózis gátlásán keresztül (Chatzaki et al., 2006). Y79 humán retinoblasztóma sejtekben is az apoptózis ellen dolgozik a CRF a pro-kaspáz 3 aktiválásának megakadályozásával (Radulovic et al., 2003). A szakirodalomban rendelkezésre álló információkból arra következtethetünk, hogy a CRF peptidek apoptózisra gyakorolt hatása is sejtípustól függő folyamat.

Kísérleteink során Western blottal vizsgáltuk még a sejtosztódást- és túlélést szabályozó transzkripciós faktor, a p53 expresszióját. HeLa sejtekben eleinte szignifikánsan csökkent a p53 fehérje szintje, majd a kezelés napjának végére visszaállt a kiindulási szint körüli értékre.

A sejt túlélést közvetítő PKB/Akt enzim szerepét is vizsgáltuk Western immunoblottal MCF7 és HeLa sejtekben. Urokortin kezelés hatására a CRFR2-n keresztül aktiválódik a PI3K enzim humán monocita eredetű THP-1 sejtekben (Chandras et al., 2009), míg HEK293 humán embrionális vese sejtekben ez a hatás a CRFR1-en keresztül közvetített (Punn et al., 2006). Vannak azonban olyan biológiai rendszerek is melyekben az UCN2 gátolja az Akt foszforilációját (Gao et al., 2016).

MCF7 sejtekben HU10 jelenlétében emelkedett a sejtek túlélését serkentő PKB/Akt fehérje foszforilációjának mértéke, ami 3 órával az urokortin hozzáadása után érte el a maximumát.

HeLa sejtekben is fokozódott a PKB/Akt fehérje foszforilációja, 1 órával az urokortin kezelés megkezdését követően indukálva maximális, és szignifikáns aktivációt. A HU által stimulált

PKB/Akt foszforiláció hozzájárulhat az MCF7 és a HeLa sejtek fokozott túléléséhez, amit utóbbiban a csökkent p53 fehérje szint általunk észlelt jelensége is tovább támogathat.

Fontos megjegyezni, hogy a munkánk során használt MCF7 és HeLa humán sejtvonalak mindegyike női eredetű. Továbbá a méhnyakrákból származó HeLa sejtekben a humán papillomavírusok korai fehérjéi (E6 és E7) ismertén zavarják a legfontosabb sejtciklus-szabályozó fehérjék, úgy mint a retinoblastóma és a p53 fehérje normális működését (Funk et al., 1997; Jones et al., 1997; Mantovani & Banks, 2001; Zur Hausen, 1999). Ezért adataink értelmezését, és azok lehetséges patológiás és terápiás jelentőségét illetően fontos szem előtt tartanunk a nemet (Bangasser et al., 2010), mint befolyásoló tényezőt épp úgy, mint a jelátvitelt módosító, vírus eredetű, egyéb faktorok jelenlétét is.

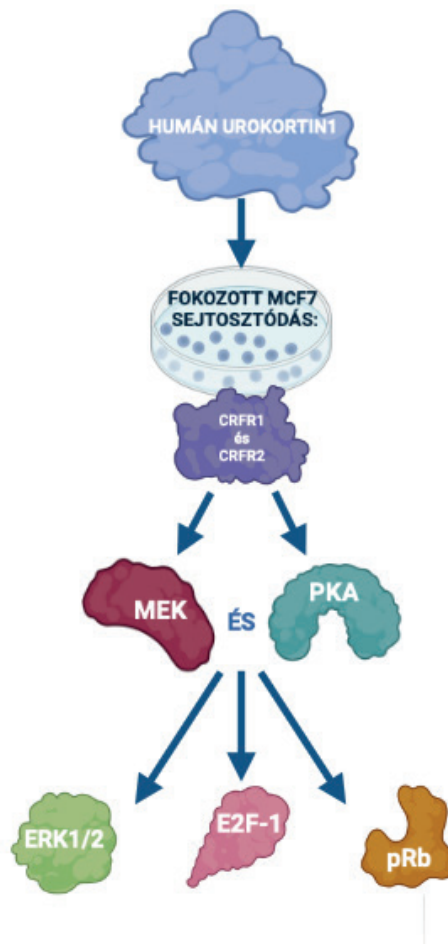
## 6 ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során Western blottal és lézer pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkóppal vizsgáltuk a CRF receptor izoformák expresszióját két humán eredetű, daganatos sejtvonalban. MCF7 sejtekben a CRFR1 immun-jel a plazmamembrán mentén lokalizálódott, míg a HeLa sejtvonalban mélyebbre benyúlt az immun-szignál a citoplazmába is, csakúgy, mint a CRFR2 immunreaktivitás is, mindkét sejtípus esetében. HU10 kezelés hatására átmeneti ERK1/2 foszforiláció indukálódott MCF7 és HeLa sejtekben is. Ez a hatás gátolható volt a CRFR1-specifikus inhibitor Antalarminnal, azonban a sejtek előkezelése a CRFR2 antagonistá Astressin2b-vel nem gátolta az urokortin annak ERK1/2 MAPK-t aktiváló képességében. A HU-stimulált ERK1/2 foszforiláció mindkét általunk vizsgált sejtípusban gátolható volt a MEK inhibitor U0126 jelenlétében, ami alapján a MEK kulcsszerepet játszik az urokortin által indukált ERK1/2 foszforilációban, MCF7 és HeLa sejtekben egyaránt. MCF7 sejtekben hasonló, HU-indukált ERK1/2 foszforilációt gátló hatást mértünk a PKA inhibitor H89 adagolását követően is. Vagyis ez az enzim is fontos szerepet játszik a HU által indukált ERK1/2 foszforilációban, viszont méréseink alapján csak MCF7 sejtekben. Urokortin kezelés hatására mindkét sejtvonalban fokozódott az E2F-1 transzkripciós faktor expressziós szintje, ami gátolható volt a MEK inhibitor U0126 jelenlétében. Ez ismét hangsúlyozza a MEK enzim szerepét a HU-stimulált jelátviteli utakban a kísérleteinkhez használt sejtípusokban. Sőt, MCF7 sejtekben az Rb fehérje foszforilációja is fokozódott az urokortin peptid jelenlétében, amely hatás aztán blokkolható volt a MEK gátló U0126-tal, valamint a PKA inhibitor H89 adását követően is, csakúgy, mint a HU-stimulált E2F-1 fehérjeszint növekedése. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy urokortin kezelés következtében az MCF7 és a HeLa sejtek osztódását serkentő fehérjék aktiválódnak, mely hatás egyik fontos jelátviteli közvetítője a MEK. Továbbá HU10 kezelés hatására nőtt a formazánná alakított MTT festék mennyisége

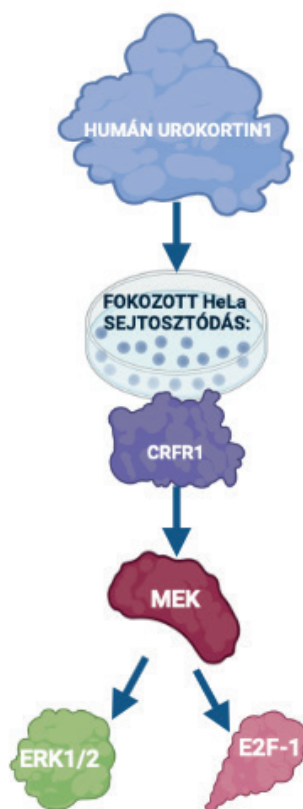
is mindkét általunk vizsgált sejttípusban, vagyis urokortin jelenlétében tenyésztve a sejteket fokozódott azok osztódási képessége. MCF7 sejtekben ez a hatás gátolható volt a CRFR1 inhibitor Antalarmin és a CRFR2 antagonistá Astressin2b jelenlétében is, míg HeLa sejtekben csak az Antalarmin kezelés akadályozta az urokortin ennek a biológiai hatásának a kifejtésében. Ez az egyik sejttípustól függő különbség, amit munkánk során sikerült azonosítanunk. Az urokortin jelenlétében, mindkét általunk vizsgált humán sejttípusban mért E2F-1 fehérjeszint emelkedés és a formazán festék termelésének szignifikáns mértékű fokozódása – valamint az Rb fehérje fokozott foszforilációja MCF7 sejtekben – az MCF7 és HeLa sejtek osztódási képességének erősödésére utalnak. Továbbá a sejttúlélés kulcsfontosságú szabályozójának, a PKB/Akt fehérjének a foszforilációja is emelkedett HU10 jelenlétében mindkét vizsgált sejttípusban. A HU-indukált PKB/Akt aktiváló foszforiláció fokozza az általunk vizsgált humán sejtvonalak túlélését, amit a HeLa sejtekben mért csökkent p53 fehérje expresszió is tovább támogat.

Eredményeinket összefoglalva arra következtethetünk, hogy a HU az MCF7 sejtekben a sejtosztódást fokozó hatását a CRFR1-en, a PKA-n és a MEK-en keresztül közvetíti az ERK1/2 felé. Azonban az Astressin2b MTT mérésre gyakorolt hatásának tekintetében itt nem zárhatjuk ki a CRFR2-ről kiinduló egyéb jelátviteli utak részvételét sem. A MEK és a PKA kulcsszerepet játszanak az urokortin által stimulált Rb fehérje foszforilációban és az E2F-1 transzkripciós faktor fokozott expressziójában is, utóbbi két fehérje pedig szintén a sejtek osztódási képességét fokozza a neuropeptid jelenlétében (27. ábra).

Eredményeink alapján továbbá azt a következtetést vonhatjuk még le, hogy a HU a sejtproliferációt fokozó hatását HeLa sejtekben a CRFR1-en és a MEK-en keresztül közvetíti az ERK1/2 MAPK felé. A MEK fontos közvetítő szerepet játszik a HU-indukált E2F-1 fehérje expresszió emelkedésben is, ami pedig a sejtek fokozott osztódását mozdítja elő urokortin kezelés mellett (28. ábra).



**27. ábra:** A humán urokortin jelátvitelének sémás modellje MCF7 sejtekben



**28. ábra:** Humán urokortin-indukált jelátvitel vázlatos folyamatábrája HeLa sejtekben

Végül a két sejtvonalban tapasztalt urokortin jelátviteli hasonlóságokat és különbségeket táblázatos formában is összefoglaljuk az egyszerűbb áttekinthetőség érdekében.

**Eredményeinket összefoglaló táblázat:**

VIZSGÁLT JELENSÉG	MCF7 sejtekben	HeLa sejtekben
CRFR1 és 2 immunpozitivitás / Western Blot	<b>igen</b>	<b>igen</b>
CRFR1 immunpozitivitás / Immunfluoreszcencia	<b>igen (gyakran a plazmamembrán szintjében)</b>	<b>igen (a citoplazmában)</b>
CRFR2 immunpozitivitás / Immunfluoreszcencia	<b>igen (a citoplazmában)</b>	<b>igen (a citoplazmában)</b>
HU általi ERK1/2 foszforiláció indukciója	<b>igen (5'-es maximum után gyorsan lecseng)</b>	<b>igen (15'-es maximum után gyorsan lecseng)</b>
HU általi ERK1/2 foszforiláció indukció gátlhatósága U0126 (MEK inhibitor) vegyülettel	<b>igen</b>	<b>igen</b>
HU általi ERK1/2 foszforiláció indukció gátlhatósága H89 (PKA inhibitor) vegyülettel	<b>igen</b>	<i>nem</i>
HU általi ERK1/2 foszforiláció indukció gátlhatósága Antalarmin (CRFR1 inhibitor) vegyülettel	<b>igen</b>	<b>igen</b>

HU általi ERK1/2 foszforiláció indukció gátolhatósága Astressin2b (CRFR2 inhibitor) vegyülettel	<i>nem</i>	<i>nem</i>
HU általi E2F-1 expresszió fokozódás	<b>igen</b>	<b>igen</b>
HU általi E2F-1 expresszió fokozódás gátlása U0126 (MEK inhibitor) vegyülettel	<b>igen</b>	<b>igen</b>
HU általi E2F-1 expresszió fokozódás gátlása H89 (PKA inhibitor) vegyülettel	<b>igen</b>	<i>nem</i>
HU általi Rb foszforiláció indukciója	<b>igen</b>	<i>nem</i>
HU általi Rb foszforiláció indukció gátolhatósága U0126 (MEK inhibitor) vegyülettel	<b>igen</b>	nem vizsgáltuk
HU általi Rb foszforiláció indukció gátolhatósága H89 (PKA inhibitor) vegyülettel	<b>igen</b>	nem vizsgáltuk
HU általi p53 expresszió gátlás	<i>nem</i>	<b>igen</b>
HU általi PKB/Akt foszforiláció indukciója	<b>igen (3h-s maximum után lecseng)</b>	<b>igen (1h-s maximum után lecseng)</b>
HU általi sejtproliferáció indukciója (MTT-esszével)	<b>igen</b>	<b>igen</b>
HU általi sejtproliferáció indukciójának a gátolhatósága Antalarmin (CRFR1 inhibitor) vegyülettel (MTT-esszé)	<b>igen</b>	<b>igen</b>
HU általi sejtproliferáció indukciójának a gátolhatósága Astressin2b (CRFR2 inhibitor) vegyülettel (MTT-esszé)	<b>igen</b>	<i>nem</i>
HU általi ATP termelődés fokozódása	<b>igen</b>	nem vizsgáltuk
a női reproduktív szervrendszerből származó sejtípus	<b>igen</b>	<b>igen</b>
a vizsgált sejtek irodalomból ismert HPV korai fehérje (E6/E7) expressziója	<i>nem</i>	<b>igen</b>

Megítélésünk szerint eredményeink segítenek jobban megérteni az urokortin jelátviteli folyamatainak sejtípustól függő különbségeit, valamint ennek a neuropeptidnek a sejtproliferáció szabályozásában, és ezzel a daganatképződésben betöltött lehetséges szerepét. Így ezzel méréseink hozzájárulhatnak akár jövőbeli, szelektívebben ható terápiás eljárások kidolgozásának a sikeréhez is, a különböző rosszindulatú daganatok célzott kezelésének területén.



## 7 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Ifj. Dr. Sétáló Györgynek szakmai vezetéséért, hogy fáradhatatlan munkával és türelemmel segített munkám során, akihez mindig bátran fordulhattam bármilyen gondommal.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Vecsernyés Mónikának a kísérletek kivitelezésében és az ábrák szerkesztésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Veres-Székely Apornak a statisztikai elemzés elsajátításában nyújtott segítségét, valamint baráti jótanácsait.

Továbbá köszönettel tartozom Dr. Berta Gergelynek az ImageJ szoftver használatának elsajátításában nyújtott segítségéért.

Köszönet illeti Dr. Rimayné Dr. Ábrahám Hajnalka Gabriella igazgatóasszonyt, hogy biztosította számomra kísérleteim elvégzéséhez és tanulmányaim lefolytatásához a szükséges feltételeket.

Köszönöm az Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratórium minden munkatársának, hogy hasznos elméleti és gyakorlati tanácsaikkal hozzájárultak kísérleteim sikeréhez.

Szívből köszönöm családomnak és barátaimnak a biztatást, hogy végig támogattak céljaim elérésében. Különösképp köszönöm feleségemnek, Balogh Adriennek a türelmét és az összefoglaló ábrák elkészítésében nyújtott segítségét.

Továbbá köszönöm mindenkinek, aki valamilyen formában hozzájárult Ph.D. dolgozatom elkészüléséhez.

## 8 IRODALOMJEGYZÉK

- Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Venihaki, M., Karagianni, E., Rassouli, O., Andreakou, E., Stournaras, C., Margioris, A. N., & Tsatsanis, C. (2009). Corticotropin releasing factor promotes breast cancer cell motility and invasiveness. *Molecular Cancer*, *8*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-30>
- Arai, M., Assil, I. Q., & Abou-Samra, A. B. (2001). Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: A novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. *Endocrinology*, *142*(1), 446–454. <https://doi.org/10.1210/endo.142.1.7879>
- Arcuri, F., Cintonino, M., Florio, P., Floccari, F., Pergola, L., Romagnoli, R., Petraglia, F., Tosi, P., & Del Vecchio, M. T. (2002). Expression of urocortin mRNA and peptide in the human prostate and in prostatic adenocarcinoma. *Prostate*, *52*(3), 167–172. <https://doi.org/10.1002/pros.10094>
- Bale, T. L., & Vale, W. W. (2004). CRF and CRF Receptors: Role in Stress Responsivity and Other Behaviors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *44*, 525–557. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410>
- Bangasser, D. A., Curtis, A., Reyes, B. A. S., Bethea, T. T., Parastatidis, I., Ischiropoulos, H., Van Bockstaele, E. J., & Valentino, R. J. (2010). Sex differences in corticotropin-releasing factor receptor signaling and trafficking: Potential role in female vulnerability to stress-related psychopathology. *Molecular Psychiatry*, *15*(9), 896–904. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.66>
- Boorse, G. C., & Denver, R. J. (2006). Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. *General and Comparative Endocrinology*, *146*(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.yggen.2005.11.014>

- Brar, B. K., Chen, A., Perrin, M. H., & Vale, W. (2004). Specificity and regulation of extracellularly regulated kinase1/2 phosphorylation through corticotropin-releasing factor (CRF) receptors 1 and 2 $\beta$  by the CRF/urocortin family of peptides. *Endocrinology*, *145*(4), 1718–1729. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1023>
- Brar, B. K., Jonassen, A. K., Egorina, E. M., Chen, A., Negro, A., Perrin, M. H., Mjøs, O. D., Latchman, D. S., Lee, K. F., & Vale, W. (2004). Urocortin-II and Urocortin-III Are Cardioprotective against Ischemia Reperfusion Injury: An Essential Endogenous Cardioprotective Role for Corticotropin Releasing Factor Receptor Type 2 in the Murine Heart. *Endocrinology*, *145*(1), 24–35. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0689>
- Cano, E., & Mahadevan, L. C. (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends in Biochemical Sciences*, *20*(3), 117–122. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)88978-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)88978-1)
- Catalano, R. D., Kyriakou, T., Chen, J., Easton, A., & Hillhouse, E. W. (2003). Regulation of corticotropin-releasing hormone type 2 receptors by multiple promoters and alternative splicing: Identification of multiple splice variants. *Molecular Endocrinology*, *17*(3), 395–410. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0302>
- Chandras, C., Koutmani, Y., Kokkotou, E., Pothoulakis, C., & Karalis, K. P. (2009). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B by corticotropin-releasing factor in human monocytes. *Endocrinology*, *150*(10), 4606–4614. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1810>
- Chang, C. P., Pearse, R. V., O'Connell, S., & Rosenfeld, M. G. (1993). Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron*, *11*(6), 1187–1195. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90230-O](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90230-O)
- Chen, R., Lewis, K. A., Perrin, M. H., & Vale, W. W. (1993). Expression cloning of a human

- corticotropin-releasing-factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(19), 8967–8971. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.8967>
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., & Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor to different g proteins by protein kinase A. *Nature*, 390(6655), 88–91. <https://doi.org/10.1038/36362>
- Dautzenberg, F. M., & Hauger, R. L. (2002). The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(2), 71–77. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)01946-6](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)01946-6)
- Davidson, S. M., Rybka, A. E., & Townsend, P. A. (2009). The powerful cardioprotective effects of urocortin and the corticotropin releasing hormone (CRH) family. *Biochemical Pharmacology*, 77(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.08.033>
- Dedic, N., Chen, A., & Deussing, J. M. (2017). The CRF Family of Neuropeptides and their Receptors - Mediators of the Central Stress Response. *Current Molecular Pharmacology*, 11(1), 4–31. <https://doi.org/10.2174/1874467210666170302104053>
- Dermitzaki, E., Tsatsanis, C., Gravanis, A., & Margioris, A. N. (2002). Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14), 12280–12287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111236200>
- Elliott-Hunt, C. R., Kazlauskaitė, J., Wilde, G. J. C., Grammatopoulos, D. K., & Hillhouse, E. W. (2002). Potential signalling pathways underlying corticotrophin-releasing hormone-mediated neuroprotection from excitotoxicity in rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 80(3), 416–425. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00712.x>
- Fekete, É. M., & Zorrilla, E. P. (2007). Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: Ancient CRF paralogs. *Frontiers in Neuroendocrinology*,

28(1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.09.002>

- Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B., & Galloway, D. A. (1997). Inhibition of CDK activity and pcna-dependent DNA replication p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes and Development*, *11*(16), 2090–2100. <https://doi.org/10.1101/gad.11.16.2090>
- Gao, M. H., Giamouridis, D., Lai, N. C., Walenta, E., Paschoal, V. A., Kim, Y. C., Miyanochara, A., Guo, T., Liao, M., Liu, L., Tan, Z., Ciaraldi, T. P., Schenk, S., Bhargava, A., Oh, D. Y., & Hammond, H. K. (2016). One-time injection of AAV8 encoding urocortin 2 provides long-term resolution of insulin resistance. *JCI Insight*, *1*(15). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88322>
- Grammatopoulos, D. K. (2012). Insights into mechanisms of corticotropin-releasing hormone receptor signal transduction. *British Journal of Pharmacology*, *166*(1), 85–97. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01631.x>
- Grammatopoulos, D. K., Randeva, H. S., Levine, M. A., Katsanou, E. S., & Hillhouse, E. W. (2000). Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: An effect mediated via R1 $\alpha$  and R2 $\beta$  CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins. *Molecular Endocrinology*, *14*(12), 2076–2091. <https://doi.org/10.1210/me.14.12.2076>
- Graziani, G., Tentori, L., Muzi, A., Vergati, M., Tringali, G., Pozzoli, G., & Navarra, P. (2007). Evidence that corticotropin-releasing hormone inhibits cell growth of human breast cancer cells via the activation of CRH-R1 receptor subtype. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *264*(1–2), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.10.006>
- Graziani, G., Tentori, L., Portarena, I., Barbarino, M., Tringali, G., Pozzoli, G., & Navarra, P. (2002). CRH inhibits cell growth of human endometrial adenocarcinoma cells via CRH-receptor 1-mediated activation of cAMP-PKA pathway. *Endocrinology*, *143*(3), 807–813.

<https://doi.org/10.1210/endo.143.3.8694>

- Hasdemir, B., Mahajan, S., Bunnett, N. W., Liao, M., & Bhargava, A. (2012). Endothelin-converting enzyme-1 actions determine differential trafficking and signaling of corticotropin-releasing factor receptor 1 at high agonist concentrations. *Molecular Endocrinology*, 26(4), 681–695. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1361>
- Hasdemir, B., Mahajan, S., Oses-Prieto, J., Chand, S., Woolley, M., Burlingame, A., Grammatopoulos, D. K., & Bhargava, A. (2017). Actin cytoskeleton-dependent regulation of corticotropin-releasing factor receptor heteromers. *Molecular Biology of the Cell*, 28(18), 2386–2399. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-11-0778>
- Hauger, R. L., Grigoriadis, D. E., Dallman, M. F., Plotsky, P. M., Vale, W. W., & Dautzenberg, F. M. (2003). International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 21–26. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.3>
- Hauger, R., Risbrough, V., Brauns, O., & Dautzenberg, F. (2008). Corticotropin Releasing Factor (CRF) Receptor Signaling in the Central Nervous System: New Molecular Targets. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 5(4), 453–479. <https://doi.org/10.2174/187152706777950684>
- Hoare, S. R. J., Sullivan, S. K., Schwarz, D. A., Ling, N., Vale, W. W., Crowe, P. D., & Grigoriadis, D. E. (2004). Ligand Affinity for Amino-Terminal and Juxtamembrane Domains of the Corticotropin Releasing Factor Type I Receptor: Regulation by G-Protein and Nonpeptide Antagonists. *Biochemistry*, 43(13), 3996–4011. <https://doi.org/10.1021/bi036110a>
- Hotta, M., Shibasaki, T., Aral, K., & Demura, H. (1999). Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates emotional stress-induced inhibition of food intake and behavioral changes in rats. *Brain Research*, 823(1–2), 221–225. <https://doi.org/10.1016/S0006->

8993(99)01177-4

- Hsu, S. Y., & Hsueh, A. J. W. (2001). Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nature Medicine*, 7(5), 605–611. <https://doi.org/10.1038/87936>
- Jin, L., Zhang, Q., Guo, R., Wang, L., Wang, J., Wan, R., Zhang, R., Xu, Y., & Li, S. (2011). Different effects of corticotropin-releasing factor and urocortin 2 on apoptosis of prostate cancer cells in vitro. *Journal of Molecular Endocrinology*, 47(2), 219–227. <https://doi.org/10.1530/JME-11-0048>
- John R. Masters. (2002). Asbestos and its lethal legacy. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 311–315. <https://doi.org/10.1038/nrc774>
- Jones, D. L., Alani, R. M., & Münger, K. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21(Cip1)-mediated inhibition of cdk2. *Genes and Development*, 11(16), 2101–2111. <https://doi.org/10.1101/gad.11.16.2101>
- Kaprara, A., Pazaitou-Panayiotou, K., Chemonidou, M. C., Constantinidis, T. C., Lambropoulou, M., Koffa, M., Kiziridou, A., Kakolyris, S., Kortsaris, A., & Chatzaki, E. (2010). Distinct distribution of corticotropin releasing factor receptors in human breast cancer. *Neuropeptides*, 44(5), 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2010.06.005>
- Kaprara, Athina, Pazaitou-Panayiotou, K., Kortsaris, A., & Chatzaki, E. (2010). The corticotropin releasing factor system in cancer: Expression and pathophysiological implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(8), 1293–1306. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0265-2>
- Karteris, E., Hillhouse, E. W., & Grammatopoulos, D. (2004). Urocortin II Is Expressed in Human Pregnant Myometrial Cells and Regulates Myosin Light Chain Phosphorylation: Potential Role of the Type-2 Corticotropin-Releasing Hormone Receptor in the Control of

- Myometrial Contractility. *Endocrinology*, 145(2), 890–900.  
<https://doi.org/10.1210/en.2003-1210>
- Koureta, M., Karaglani, M., Panagopoulou, M., Balgkouranidou, I., Papadaki-Anastasopoulou, A., Zarouchlioti, C., Dekavallas, S., Kolios, G., Lambropoulou, M., Baritaki, S., & Chatzaki, E. (2020). Corticotropin Releasing Factor Receptors in breast cancer: Expression and activity in hormone-dependent growth in vitro. *Peptides*, 129(April), 170316. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170316>
- Kuperman, Y., & Chen, A. (2008). Urocortins: emerging metabolic and energy homeostasis perspectives. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 19(4), 122–129.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.12.002>
- Lovenberg, T. W., Liaw, C. W., Grigoriadis, D. E., Clevenger, W., Chalmers, D. T., De Souza, E. B., & Oltersdorf, T. (1995). Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(3), 836–840.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.3.836>
- Mantovani, F., & Banks, L. (2001). The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*, 20(54 REV. ISS. 7), 7874–7887.  
<https://doi.org/10.1038/sj/onc/1204869>
- Markovic, D., & Grammatopoulos, D. K. (2009). Focus on the splicing of Secretin GPCRs transmembrane-domain 7. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(9), 443–452.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.06.002>
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80(2), 179–185.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90401-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90401-8)
- Mayoral-González, I., Calderón-Sánchez, E. M., Galeano-Otero, I., Martín-Bórnez, M.,



- Gutiérrez-Carretero, E., Fernández-Velasco, M., Domenech, N., Crespo-Leiro, M. G., Gómez, A. M., Ordóñez-Fernández, A., Hmadcha, A., & Smani, T. (2022). Cardiac protection induced by urocortin-2 enables the regulation of apoptosis and fibrosis after ischemia and reperfusion involving miR-29a modulation. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 27(March), 838–853. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.01.003>
- Minas, V., Rolaki, A., Kalantaridou, S. N., Sidiropoulos, J., Mitrou, S., Petsas, G., Jeschke, U., Paraskevaidis, E. A., Fountzilias, G., Chrousos, G. P., Pavlidis, N., & Makrigiannakis, A. (2007). Intratumoral CRH modulates immuno-escape of ovarian cancer cells through FasL regulation. *British Journal of Cancer*, 97(5), 637–645. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603918>
- Nordström, K. J. V., Lagerström, M. C., Wallér, L. M. J., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2009). The Secretin GPCRs descended from the family of Adhesion GPCRs. *Molecular Biology and Evolution*, 26(1), 71–84. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn228>
- Pal, K., Swaminathan, K., Xu, H. E., & Pioszak, A. A. (2010). Structural basis for hormone recognition by the human CRFR2 $\alpha$  G protein-coupled receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 40351–40361. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.186072>
- Papadopoulou, N., Chen, J., Randeve, H. S., Levine, M. A., Hillhouse, E. W., & Grammatopoulos, D. K. (2004). Protein kinase A-induced negative regulation of the corticotropin-releasing hormone R1 $\alpha$  receptor-extracellularly regulated kinase signal transduction pathway: The critical role of Ser301 for signaling switch and selectivity. *Molecular Endocrinology*, 18(3), 624–639. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0365>
- Pedersen, W. A., Wan, R., Zhang, P., & Mattson, M. P. (2002). Urocortin, but not urocortin II, protects cultured hippocampal neurons from oxidative and excitotoxic cell death via corticotropin-releasing hormone receptor type I. *Journal of Neuroscience*, 22(2), 404–412. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-02-00404.2002>

- Perrin, M., Donaldson, C., Chen, R., Blount, A., Berggren, T., Bilezikjian, L., Sawchenko, P., & Vale, W. (1995). Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2969–2973. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2969>
- Potter, E., Sutton, S., Donaldson, C., Chen, R., Perrin, M., Lewis, K., Sawchenko, P. E., & Vale, W. (1994). Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), 8777–8781. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.8777>
- Punn, A., Levine, M. A., & Grammatopoulos, D. K. (2006). Identification of signaling molecules mediating corticotropin-releasing hormone-R1 $\alpha$ -mitogen-activated protein kinase (MAPK) interactions: The critical role of phosphatidylinositol 3-kinase in regulating ERK1/2 but not p38 MAPK activation. *Molecular Endocrinology*, 20(12), 3179–3195. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0255>
- Rademaker, M. T., & Richards, A. M. (2017). Urocortins: Actions in health and heart failure. *Clinica Chimica Acta*, 474(July), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.09.003>
- Radulovic, M., Hippel, C., & Spiess, J. (2003). Corticotropin-releasing factor (CRF) rapidly suppresses apoptosis by acting upstream of the activation of caspases. *Journal of Neurochemistry*, 84(5), 1074–1085. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01594.x>
- Reubi, J. C., Waser, B., Vale, W., & Rivier, J. (2003). Expression of CRF1 and CRF2 receptors in human cancers. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(7), 3312–3320. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021853>
- Reul, J.M., Holsboer, F. (1953). Basic research. *Chemical and Engineering News*, 31(34), 3455–3456. <https://doi.org/10.1021/cen-v031n034.p3455>
- Reyes, T. M., Lewis, K., Perrin, M. H., Kunitake, K. S., Vaughan, J., Arias, C. A., Hogenesch,

- J. B., Gulyas, J., Rivier, J., Vale, W. W., & Sawchenko, P. E. (2001). Urocortin II: A member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(5), 2843–2848. <https://doi.org/10.1073/pnas.051626398>
- Roberson, E. D., English, J. D., Adams, J. P., Selcher, J. C., Kondratick, C., & Sweatt, J. D. (1999). The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *19*(11), 4337–4348. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-11-04337.1999>
- Rossant, C. J., Pinnock, R. D., Hughes, J., Hall, M. D., & McNulty, S. (1999). Corticotropin-releasing factor type 1 and type 2 $\alpha$  receptors regulate phosphorylation of calcium/cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*, *140*(4), 1525–1536. <https://doi.org/10.1210/endo.140.4.6656>
- Sananbenesi, F., Fischer, A., Schrick, C., Spiess, J., & Radulovic, J. (2003). Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in the Hippocampus and Its Modulation by Corticotropin-Releasing Factor Receptor 2: A Possible Link between Stress and Fear Memory. *Journal of Neuroscience*, *23*(36), 11436–11443. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-36-11436.2003>
- Schulman, D., Latchman, D. S., & Yellon, D. M. (2002). Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *283*(4 52-4), 1481–1488. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01089.2001>
- ȘERBAN COMȘA, A. M. C. and M. R. (n.d.). *3147.full-2*.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma<sup>1,2</sup>. *Journal of the National Cancer*

- Institute*, 51(5), 1409–1416. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>
- Spiess, J., Rivier, J., Rivier, C., & Vale, W. (1981). Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(10 I), 6517–6521. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6517>
- Szeberényi J. 2011. Molekuláris sejtbológia. Dialóg Campus kiadó. 261-264.
- Szeberényi, J., & Erhardt, P. (1994). Cellular components of nerve growth factor signaling. *BBA - Molecular Cell Research*, 1222(2), 187–202. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)90168-6](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90168-6)
- Takahashi, L. K. (2001). Role of CRF1 and CRF2 receptors in fear and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(7–8), 627–636. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00046-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00046-X)
- Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Charalampopoulos, I., Spiess, J., Gravanis, A., & Margioris, A. N. (2005). Urocortin 1 and Urocortin 2 induce macrophage apoptosis via CRFR 2. *FEBS Letters*, 579(20), 4259–4264. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.06.057>
- Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*. 1995 Nov 16;378(6554):287-92. doi: 10.1038/378287a0. PMID: 7477349.
- Vuppaladhiam L, Ehsan C, Akkati M, Bhargava A. Corticotropin-Releasing Factor Family: A Stress Hormone-Receptor System's Emerging Role in Mediating Sex-Specific Signaling. *Cells*. 2020 Mar 31;9(4):839. doi: 10.3390/cells9040839. PMID: 32244319; PMCID: PMC7226788.
- Wang, J., & Li, S. (2007). Corticotropin-releasing factor family and its receptors: Tumor therapeutic targets? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(4),

785–788. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.014>

Wu, S. V., Yuan, P. Q., Wang, L., Peng, Y. L., Chen, C. Y., & Taché, Y. (2007). Identification and characterization of multiple corticotropin-releasing factor type 2 receptor isoforms in the rat esophagus. *Endocrinology*, *148*(4), 1675–1687. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0565>

Yi SQ, An JX, Liao CC, Lei S, Jin H, T. B. (2021). The role of corticotropin-releasing hormone (CRH) family in tumors. *Neoplasma*, *68*(5), 907–916. <https://doi.org/10.4149/neo>

Yuan, Z., McCauley, R., Chen-Scarabelli, C., Abounit, K., Stephanou, A., Barry, S. P., Knight, R., Saravolatz, S. F., Saravolatz, L. D., Ulgen, B. O., Scarabelli, G. M., Faggian, G., Mazzucco, A., Saravolatz, L., & Scarabelli, T. M. (2010). Activation of Src protein tyrosine kinase plays an essential role in urocortin-mediated cardioprotection. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *325*(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.013>

Zur Hausen, H. (1999). Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Seminars in Cancer Biology*, *9*(6), 405–411. <https://doi.org/10.1006/scbi.1999.0144>

## 9 TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK ÉS KONGRESSZUSI ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

Összesített impakt faktor: 13,711

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények impakt faktora: 6,7

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

**Balogh B**, Vecsernyés M, Stayer-Harci A, Berta G, Tarjányi O, Sétáló G Jr. Urocortin stimulates the ERK1/2 signaling pathway and the proliferation of HeLa cells via CRF receptor 1. FEBS Open Bio. 2023 Mar 27. doi: 10.1002/2211-5463.13602. Epub ahead of print. PMID: 36971048. *IF: 2,6*

**Balogh B**, Vecsernyés M, Veres-Székely A, Berta G, Stayer-Harci A, Tarjányi O, Sétáló G Jr. Urocortin stimulates ERK1/2 phosphorylation and proliferation but reduces ATP production of MCF7 breast cancer cells. Mol Cell Endocrinol. 2022 May 1;547:111610. doi: 10.1016/j.mce.2022.111610. Epub 2022 Feb 24. PMID: 35219718. *IF: 4,1*

### Egyéb közlemények:

Tarjányi O, Haerer J, Vecsernyés M, Berta G, Stayer-Harci A, **Balogh B**, Farkas K, Boldizsár F, Szeberényi J, Sétáló G Jr. Prolonged treatment with the proteasome inhibitor MG-132 induces apoptosis in PC12 rat pheochromocytoma cells. Sci Rep. 2022 Apr 6;12(1):5808. doi: 10.1038/s41598-022-09763-z. PMID: 35388084; PMCID: PMC8987075. *IF: 4,6*

Telek V, Erlitz L, Caleb I, Nagy T, Vecsernyés M, **Balogh B**, Sétáló G, Hardi P, Jancsó G, Takács I. Effect of Pioglitazone on endoplasmic reticulum stress regarding in situ perfusion rat model. Clin Hemorheol Microcirc. 2021;79(2):311-325. doi: 10.3233/CH-211163. PMID: 33867357. IF: 2,411

**Konferencia absztraktok, poszterek, előadások:**

Tarjányi Oktávia, Vecsernyés Mónika, Berta Gergely, Stayer-Harci Alexandra, **Balogh Bálint**, Boldizsár Ferenc, Szeberényi József, ifj. Sétáló György. Proteaszóma gátló (MG-132) és kináz gátlók hatása patkány feokromocitóma (PC12) sejtek jelátvitelére.

2022 május 17-20. 51. membrán-transzport konferencia, Sümeg

Alexandra Stayer-Harci, Katalin Götzer, **Bálint Balogh**, Mónika Vecsernyés, Noémi Sóki, Abigél Molnár, György Sétáló Jr., László Seress, Hajnalka Ábrahám. Effect of Urocortin2 on the maturation of parvalbumin-immunoreactive neurons in organotypic hippocampal slice culture.

2022 január 27-28. International Neuroscience Meeting – IBRO workshop, Budapest

**Bálint Balogh**, Mónika Vecsernyés, Apor Veres-Székely, Gergely Berta, Alexandra Stayer-Harci, Oktávia Tarjányi and György Sétáló Jr. Urocortin stimulates ERK1/2 phosphorylation but reduces cell proliferation in MCF7 breast cancer cells.

2021 október 27-30. 11<sup>th</sup> ISCTICO – HUPHAR – IUPHAR – Conference, Pécs, Hungary

Oktávia Tarjányi, Mónika Vecsernyés, Gergely Berta, Alexandra Stayer-Harci, **Bálint Balogh**, Ferenc Boldizsár, György Sétáló Jr. In vitro treatment with the proteasome inhibitor MG-132 has a biphasic effect in rat pheochromocytoma cells.

2021 október 27-30. 11<sup>th</sup> ISCTICO – HUPHAR – IUPHAR – Conference, Pécs, Hungary

Noémi Sóki, Alexandra Stayer-Harci, **Bálint Balogh**, Melinda Boros, Mónika Vecsernyés, György Sétáló, László Seress, Hajnalka Ábrahám. Development of parvalbumin-immunoreactive neurons in organotypic slice culture.

2020. január 29-30. IBRO conference, Szeged

Eva Miko, **Balint Balogh**, Gyorgy Setalo, Emese Mezosi, Timea Balassa, Judit Varga, Matyas Meggyes, Aliz Barakonyi, Laszlo Szereday. Thyroid-stimulating hormone receptor expression by peripheral blood lymphocytes.

2019. november 13-16. 14th World Congress of the International Society for Immunology of Reproduction (ISIR 2019)/The 34th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology of Reproduction (34th JSIR) Nara, Japan

**Balogh Bálint:** Humán Urocortin hatásainak és jelátviteli kapcsolatainak vizsgálata emberi emlő tumorsejtekben.

2019 november 13. Magyar Biológiai Társaság Pécsi Csoportja, Pécs

**Balogh B**, Stayer-Harci A, Berta G, Tarjányi O, Vecsernyés M, Szeberényi J, Sétáló Jr. Gy Signaling effects of Urocortin2 in rat pheochromocytoma (PC12) cell line.

2017 szeptember 20-23. FENS regional meeting. Pécs, Hungary



**Bálint Balogh**, Alexandra Stayer-Harci, Gergely Berta, Oktávia Tarjányi, Mónika Vecsernyés, Hajnalka Ábrahám, József Szeberényi, György Sétáló Jr. Signaling connections of Urocortin2 in PC12 cells.

2016 május 24-27. 16th International ELMI (European Light Microscopy Initiative) meeting, Debrecen

Harci Alexandra, **Balogh Bálint**, Berta Gergely, Tarjányi Oktávia, Vecsernyés Mónika, Ábrahám Hajnalka, Szeberényi József, ifj. Sétáló György: Az urocortin jelátviteli kapcsolatainak vizsgálata PC12 sejtekben.


2015 szeptember 3-5. VIII. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest

## 10 MELLÉKLETEK

**Balogh B**, Vecsernyés M, Stayer-Harci A, Berta G, Tarjányi O, Sétáló G Jr. Urocortin stimulates the ERK1/2 signaling pathway and the proliferation of HeLa cells via CRF receptor 1. FEBS Open Bio. 2023 Mar 27. doi: 10.1002/2211-5463.13602. Epub ahead of print. PMID: 36971048.

**Balogh B**, Vecsernyés M, Veres-Székely A, Berta G, Stayer-Harci A, Tarjányi O, Sétáló G Jr. Urocortin stimulates ERK1/2 phosphorylation and proliferation but reduces ATP production of MCF7 breast cancer cells. Mol Cell Endocrinol. 2022 May 1;547:111610. doi: 10.1016/j.mce.2022.111610. Epub 2022 Feb 24. PMID: 35219718.

# Urocortin stimulates the ERK1/2 signaling pathway and the proliferation of HeLa cells via CRF receptor 1

Bálint Balogh<sup>1</sup>, Mónika Vecsernyés<sup>1,2</sup>, Alexandra Stayer-Harci<sup>1,2</sup>, Gergely Berta<sup>1,2</sup>, Oktávia Tarjányi<sup>1,2</sup> and György Sétáló Jr<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup> Department of Medical Biology and Central Electron Microscope Laboratory, Medical School, University of Pécs, Hungary

<sup>2</sup> Signal Transduction Research Group, János Szentágotthai Research Centre, Pécs, Hungary

## Keywords

cell proliferation; E2F-1; ERK1/2, MEK; HeLa; urocortin

## Correspondence

G. Sétáló Jr, Department of Medical Biology and Central Electron Microscope Laboratory, University of Pécs, Medical School, H-7643, Pécs, Szigeti út 12, Hungary  
Tel: +36 72 536216  
Fax: +36 72 536453  
E-mail: [gyorgy.setalo.jr@gmail.com](mailto:gyorgy.setalo.jr@gmail.com)

(Received 18 November 2022, revised 7 March 2023, accepted 23 March 2023)

doi:10.1002/2211-5463.13602

Edited by Ivana Novak

Corticotropin-releasing factor (CRF) stimulates adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion from the pituitary gland and is an essential regulator of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis. Isoforms of CRF receptor are known to mediate the effects of urocortin stress ligands on the regulation of stress responses, anxiety, and feeding behavior; however, urocortin stress ligands also influence cell proliferation. In view of the tumor-promoting capacity of prolonged stress, here we investigated (a) the effect of urocortin on cell proliferative signaling via extracellular signal-regulated kinase 1/2, (b) the expression and cellular distribution of the specific CRF receptor isoforms, and (c) the intracellular localization of phosphorylated ERK1/2 in HeLa cells. Stimulation of cell proliferation was observed in the presence of 10 nM urocortin. Our data also suggest that MAP kinase MEK, the transcription factors E2F-1 and p53, and PKB/Akt are involved in this process. These findings may have therapeutic relevance for the targeted treatment of various malignancies.

Corticotropin-releasing factor (CRF) is a 41-amino acid-long polypeptide that stimulates adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion from the pituitary gland [1] and is an essential regulator of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis [2]. In addition, CRF is a vital regulator of stress reactions and immune responses, and has a positive effect on

the cardiovascular system [3]. CRF and CRF-like peptides, such as urotensin, sauvagine, and urocortins (UCNs) act on class B1 of G protein-coupled receptors (GPCRs) that possess seven-transmembrane domains and are known as CRF1 and CRF2 [4,5]. In humans, members of the GPCRs are encoded by 15 genes and they generally convey autocrine or paracrine

## Abbreviations

A2b, Astressin 2b, a CRF2-specific inhibitor; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; Ant, antalarmin, a CRF1-specific inhibitor; ATCC, American Type Culture Collection; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CBP, CRF-binding protein; Class B1 GPCR, class B1 G protein-coupled receptors; CNS, central nervous system; CRF, corticotropin-releasing factor; CRF1 and CRF2, corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMSO, dimethyl sulfoxide; E2F-1, S-phase-gene-inducing transcription factor family member; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1 and 2; G protein, guanine nucleotide-binding protein; HEK 293, human embryonic kidney cells; HeLa, Henrietta Lacks, human cervical adenocarcinoma cell line; HL-1, cardiac muscle cell line; HRP, horseradish peroxidase; hUCN1, human urocortin 1; MCF7, Michigan Cancer Foundation 7, human breast adenocarcinoma cell line; MEK, mitogen-activated protein kinase/ERK kinase; p53, a tumor suppressor protein, its molecular weight is 53 kDa; PBS, phosphate-buffered saline; pERK1 and pERK2, phosphorylated ERK1 and 2; PI3K, phosphatidylinositol 3 Kinase; PKA, protein kinase A; PKB/Akt, protein kinase B, also known as Akt protein; PKC, protein kinase C; PMSF, phenyl methane sulfonyl fluoride; PVDF, polyvinylidene difluoride; Raf-1, a protein kinase isolated from rapidly proliferating fibrosarcoma; RM-1, mouse prostate cancer cell line; SDS, sodium dodecyl sulfate; TBS, Tris-buffered saline; THP-1, human monocyte-derived from acute monocytic leukemia; U0126, a chemical inhibitor of MEK; UCN, urocortin; Y79, human retinoblastoma cell line.

effects [5]. CRF1 is expressed in the central nervous system (CNS) and the anterior pituitary gland, while CRF2 has three splice variants, CRF2- $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ , the latter being only expressed in the human brain [4] CRF2- $\alpha$  is expressed throughout the CNS, while CRF2- $\beta$  is preferentially expressed in peripheral tissues, such as the heart, skin, and skeletal muscle [6]. CRF receptors are also present in various human cancers, such as melanomas, small-cell lung cancer, and neuroblastoma [3].

In 1995 a new mammalian member of the CRF family was described by Vaughan *et al.* [7]. The peptide named urocortin is related to CRF and urotensin. Three main types of urocortin are known, urocortin1 (UCN1), urocortin2 (UCN2, also known as stresscopin-related peptide), and urocortin3 (UCN3, or stresscopin). These neuropeptides are synthesized in the central nervous system, they have varying distribution patterns and are also detectable in numerous peripheral tissues [8]. The *in vitro* binding affinities of UCN1 to CRF1 and CRF2 are essentially equal and it is up to 10-fold higher to CRF1 than the binding of CRF itself to this receptor isoform [7,9]. In addition, CRF, UCN2, and UCN3 all bind with basically equal affinities to CRF2 the latter two ligands also being selective for this receptor isoform [9,10]. *In vitro* binding affinity, however, cannot be regarded as a direct indicator of *in vivo* efficacy as also demonstrated, for example, by Hasdemir *et al.* [11]. In addition, CRF-binding protein (CBP) is an important regulator of CRF and UCN1 activity. It is commonly regarded as an endogenous buffer for CRF and UCN, regulating ligand availability for CRF receptors [8]. Members of the GPCRs' families can bind to various heterotrimeric G-proteins leading to rather promiscuous signaling patterns [5]. Ligand binding of CRF1 and CRF2 stimulates adenylate cyclase activity, which increases cAMP production that in turn activates Protein Kinase A (PKA) [12,13]. Numerous studies suggest that members of the CRF family exert their effects through Gs $\alpha$  leading to increased cAMP production, but other second messengers and signaling components, such as MAPK pathways are also implicated [14].

In this study, we investigated the effects of human urocortin1 (hUCN1) in culture on the signaling of HeLa cells with special emphasis on the expression and cellular distribution of the CRF receptors, the activating phosphorylation, and intracellular localization of the extracellular signal-regulated kinases (ERK1 and 2). The involvement of Protein Kinase B (PKB)/Akt, and that of p53 was also examined, together with possible biological responses of the cells, like changes in proliferation. In comparison to our

previous observations in MCF7 human breast cancer cells [15] we could detect both similarities and important differences in the signaling patterns induced by hUCN1 in HeLa cells, also accompanied by important differences in the elicited biological responses.

## Materials and methods

### Cell culture

HeLa cervical adenocarcinoma cells (purchased from ATCC and generously gifted by Professor József Szeberényi) were regularly maintained under standard circumstances (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) complemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum for 24 h to achieve sufficient adhesion as described earlier in an article published by our research group [15]. The cells were cultured on plastic Petri dishes or plastic Thermanox (Nalgene Nunc International, Rochester, NY, USA) coverslips. The media were routinely replaced by 0.5% heat-inactivated horse serum-containing DMEM 1 day before the applied treatments to silence serum-stimulated mitogenic signaling.

### Reagents

hUCN1 was dissolved in 10% acetic acid according to the instructions of the manufacturer. The MEK inhibitor U0126 and the CRF1-specific inhibitor Antalarmin were dissolved in DMSO, while the CRF2-specific inhibitor Astressin 2b was in distilled water. We also confirmed that the vehicle of the applied agents had no effect on the examined parameters of the experiments, as published in a former article [15]. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (a member of Merck Group, Budapest, Hungary) unless otherwise stated.

### Western blotting

HeLa cells were treated with 10 nM final concentration of hUCN1 for the indicated times or were left untreated as control. The applied inhibitors were added to the culturing media 30 min before the start of hUCN1 treatments at the following final concentrations: U0126 at 20  $\mu$ M, Antalarmin at 100 nM, Astressin 2b at 100 nM. Upon completion of treatments, the cultures were harvested into ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-base, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EGTA, 1 mM Na-orthovanadate, 5  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 100 mM NaF, 10  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> aprotinin, 1  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> leupeptin, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100) and were frozen for storage. Subsequent processing included thawing and homogenization by vortexing for 20 s, then the samples were centrifuged at 13 500  $\times$  g and at 4 °C for 20 min and

the protein content of the supernatant was measured using a Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Equal amounts of proteins (30  $\mu\text{g}$ ) were mixed with 4 $\times$  Laemmli buffer (25 mL 1 M Tris-HCl, pH 6.8, 40 mL glycerol, 8 g SDS, 10 mL 100 mM EDTA, 10 mL 100 mM EGTA, and 1 mL 1% bromophenol blue brought up to 100 mL with distilled water) and boiled briefly to denature proteins. Protein samples were loaded onto 10% polyacrylamide gels and separated according to molecular weight. The proteins were electro-blotted onto PVDF membranes (Hybond-P, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) by using a Transfer Blot Turbo System (Bio-Rad). After the transfer of the proteins, we blocked the membranes in 5% nonfat dry milk (or in 3% bovine serum albumin in the case of phospho-Akt detection) dissolved in TBS-Tween (10 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20, pH 8.0). The primary antibodies were also diluted in the blocking solution (anti-CRF1, Fine Biotech, PRC; anti-CRF2, Sigma-Aldrich; phospho-ERK1/2, ERK1/2, pAKT, Akt, E2F-1, and beta-actin, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA or p53, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 1 : 1000 and incubated overnight. Methodical controls prepared by the omission of the primary antibodies or the use of nonimmune sera of the appropriate species resulted in no signal production as determined in pilot experiments (latter data not shown). To remove unbound antibodies, we washed the membranes five times in TBS-Tween, then incubation followed with a horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody (Cell Signaling Technology) dissolved 1 : 5000 in the blocking solution. Five washes in TBS-Tween removed the unbound antibodies. Enhanced chemiluminescence detection of the target proteins followed (Immobilon Western, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) using a G-box gel documentation system (SynGene, Cambridge, UK). Then, densitometry was performed using the IMAGEJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

### Data presentation of western blots

As described in detail in an article published earlier by our research group [15], all experiments were repeated at least three times. Data were normalized to the mean of the corresponding control (untreated) group. Significance of differences was determined by GRAPH PAD PRISM 9.5.0 (GraphPad Software, Boston, MA, USA) using one-way (for proteins possessing one isoform) or two-way (for proteins exhibiting two isoforms) ANOVA testing applying the appropriate corrections, as also indicated in the figure legends. *P* values < 0.05 were considered significant. The relevant intensity differences are marked in the graphs and their corresponding *P* values are also written into the figure legends. Presented images are representative of series that produced similar results. Densitometric values are displayed by

box + whiskers plots indicating median (central horizontal line), min/max values, and mean (with '+' within the box).

### Confocal microscopy

HeLa cells were treated in the presence of 10 nM hUCN1 for the indicated times or left untreated as control. As described in our earlier publication [15], treatments were stopped by quickly rinsing in 37 °C PBS (1.37 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) and then fixing in 4% paraformaldehyde dissolved in PBS (pH 7.4) for 1 h followed at room temperature. Three changes of PBS and three changes of TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) removed the excess fixative. Then, the samples were incubated in 5% nonfat dry milk dissolved in TBS-Triton (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100) at 4 °C for 1 h under gentle rocking to block nonspecific binding sites. Commercially available anti-CRF1 (Fine Biotech, Wuhan, China) and anti-CRF2 (Sigma-Aldrich) primary antibodies were diluted 1 : 100. The dilution was 1 : 300 in the case of phospho-ERK1/2 (Cell Signaling Technology). The diluent was always the corresponding blocking solution and incubation with the primary antibodies lasted overnight at 4 °C under gentle rocking. Unbound antibodies were removed by five washes in TBS. Cy3-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Jackson Immuno Research, Cambridgeshire, UK) dissolved in the blocking solution was pipetted onto the samples at 4 °C for an hour at a dilution of 1 : 300 for CRF1 and 2 detections and at 1 : 600 to detect phospho-ERK1/2. The omission of the primary antibody served as methodical control resulting in no detectable signal at the applied microscope settings.

### Data presentation of confocal micrographs

An Olympus FV-1000 laser scanning system was used for confocal imaging, with a 40 $\times$ , long distance, combined phase contrast- and fluorescence objective (NA:0.75) to capture single optical sections. The confocal aperture was set at 130  $\mu\text{m}$ , excitation of the Cy3 dye conjugated to the secondary antibody happened at 543 nm, and the emission wavelength was 567 nm. Signal integration type was line Kalman. The micrographs shown were taken from series with similar results. All experiments have been repeated at least three times.

### MTT assay

Ninety-six-well plates were used to culture HeLa cervical adenocarcinoma cells (as described above) and then treated with 10 nM hUCN1 alone, or also with the CRF1 inhibitor Antalarmin or the CRF2 inhibitor Astressin 2b for 24 h. At the end of the treatments, we added 10  $\mu\text{L}$  of Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Merck) dye solution (5 mg·mL<sup>-1</sup>) dissolved in sterile water to the cells' medium

(100  $\mu$ L per well). Incubation in the cell culture thermostat followed for an additional 4 h. Then, the supernatant was removed and the accumulated formazan product—the amount of which is proportional to the cells' metabolic activity—was eluted by adding a 1 : 1 mixture of 100  $\mu$ L DMSO-ethanol. The absorbance was determined at 595 nm using an ELISA microplate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

### Data presentation of MTT assay

One-way ANOVA testing applying Tukey's corrections was used to determine the significance of differences. All experiments were repeated at least three times with samples prepared in triplicates. *P* values < 0.05 were considered significant, which is also indicated in the figure legends. The results are the mean + SD for experiments performed independently.

## Results

### CRF receptor expression in HeLa cells

We examined the expression of CRF receptors in HeLa cells by western blotting using commercially available antibodies that specifically recognize CRF1 and 2 subtypes. As shown in Fig. 1, we could detect both CRF1- and CRF2-specific immunoreactivities at the expected positions on western blots (Fig. 1).

### Localization of CRF1 and CRF2 in HeLa cells by confocal microscopy

CRFR-specific antisera were also used to detect the intracellular localization of CRF receptor isoforms in HeLa cells. The secondary antibody recognizing the primary was conjugated to Cy3 fluorophore.

Methodical control was prepared by the omission of the primary antibodies. As shown by Fig. 2A,B, both CRFR immunoreactivities were distributed throughout the cytoplasm.

### Time kinetics of hUCN1-induced activating ERK1/2 phosphorylation in HeLa cells

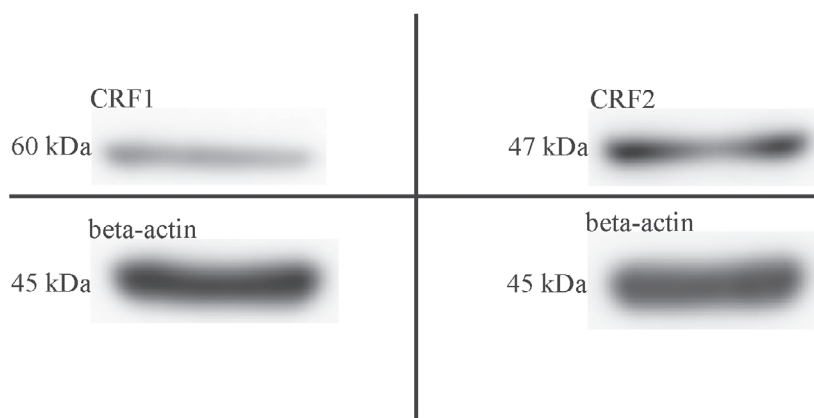
To test the possible cell proliferation-regulating effect of hUCN1, we examined the activating phosphorylation of ERK1/2 in HeLa cells induced by the peptide. Based on our previously published findings [15] the final concentration of hUCN1 was adjusted to 10 nM. In time-course experiments, 10 nM of hUCN1 could induce a marked, transient ERK1/2 phosphorylation peaking 15 min following the start of the treatment. After it, the signal fell back rapidly to around baseline (Fig. 3).

### Dose-dependence of hUCN1-induced ERK1/2 phosphorylation in HeLa cells

To see whether 10 nM of hUCN1 was indeed the most effective concentration for the treatment of HeLa cells, dose-response experiments were performed with various dilutions of hUCN1. Compared with the control group 10 nM of human urocortin1 could induce the most robust ERK1/2 phosphorylation 15 min after the start of the treatment, while other dilutions of hUCN1 proved to be less effective (Fig. 4).

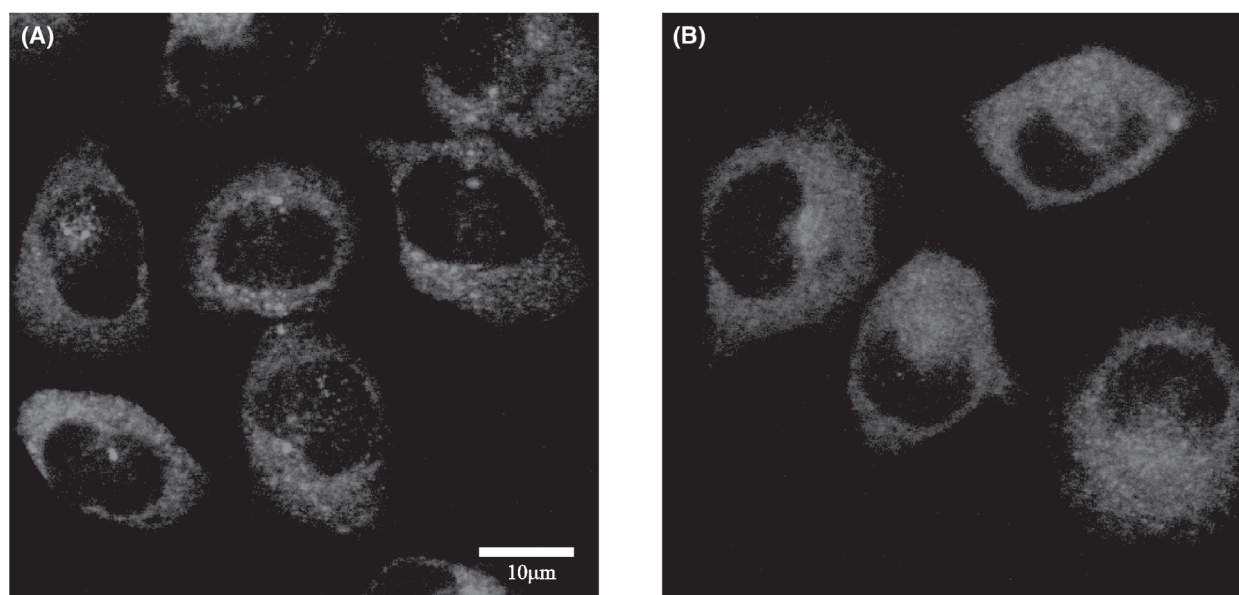
### Inhibition of MEK in hUCN1-treated HeLa cells

In order to examine the role of MEK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase that activates ERK1/2) in hUCN1-induced ERK1/2 phosphorylation, a MEK inhibitor chemical



**Fig. 1.** CRF1 and CRF2 expression in HeLa cells by western blotting. Detection of CRF1 (60 kDa, upper left quadrant) and CRF2 (47 kDa, upper right quadrant) expression using isoform-specific antisera. The beta-actin signal served as loading control (lower two quadrants).





**Fig. 2.** Intracellular localization of CRF receptors in HeLa cells by means of laser scanning confocal microscopy and immunofluorescence. The presence of both CRF1 (A) and CRF2 (B) immunoreactivities was evident in the cytoplasm of HeLa cells. Omission of the primary antibody resulted in the lack of the immune signal (see also the methodical control of Fig. 6D). The scale bar (10  $\mu$ m) in panel 'A' applies to both micrographs.

compound was used in HeLa cells. Pretreatment of the cells with U0126 could completely abolish the ERK1/2-activating effect of hUCN1. Compared with the control group the inhibitor alone could reduce even basal ERK1/2 phosphorylation to below detectable. Based on these results MEK appears to play a pivotal role in hUCN1-induced ERK1/2 phosphorylation in HeLa cells (Fig. 5).

#### Intracellular localization of phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) in hUCN1-treated HeLa cells

We also investigated the intracellular localization of pERK1/2 by immunofluorescence and laser scanning confocal microscopy. In untreated control samples, we could detect a barely noticeable phospho-ERK1/2 signal in the cytoplasm of individual HeLa cells. Fifteen minutes after the start of 10 nM hUCN1 treatment, a stronger pERK1/2 signal was apparent compared with the control group and its localization was also cytoplasmic. By the end of the treatment day, a weaker, cytoplasmic pERK1/2 signal could still be detected matching the kinetics of the pERK1/2 signal detected on western blots (Fig. 6).

#### Selective inhibition of CRF1 and CRF2

The involvement of CRF receptors in hUCN1-induced ERK1/2 phosphorylation was examined by the

addition of selective chemical inhibitors of CRFR isoforms. Pretreatment of the cells with the CRF1-specific inhibitor Antalarmin (Ant) could significantly reduce the activating phosphorylation of ERK1/2 induced by 10 nM hUCN1 (Fig. 7).

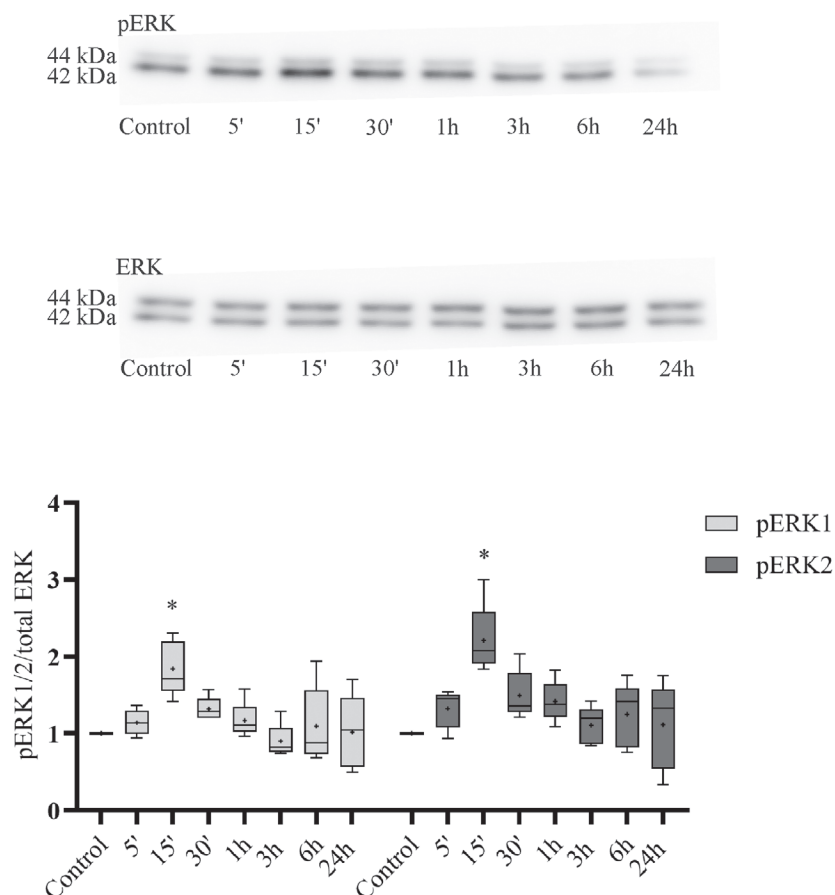
In contrast to the previous observation, the CRF2-specific inhibitor Astressin 2b (A2b) was not able to reduce the ERK1/2 phosphorylating effect of hUCN1 to the degree of measurable significance (Fig. 8).

#### hUCN1 stimulates the expression of E2F-1 protein

Human urocortin could also increase the expression of the E2F-1 transcription factor, a pivotal activator of S-phase genes. Twenty-four hours after the start of hUCN1 treatment, a marked elevation in the level of E2F-1 could be detected by western blotting, while administration of the MEK inhibitor U0126 significantly reduced this effect of hUCN1 (Fig. 9).

#### Increased PKB/Akt phosphorylation by hUCN1

In time-course experiments we also examined the activating phosphorylation of the serine/threonine-specific enzyme PKB/Akt, a central regulator of cell survival. One hour after the start of hUCN1 treatment a significant increase in PKB/Akt phosphorylation was



**Fig. 3.** Western blot analysis of hUCN1-induced, time-dependent ERK1/2 phosphorylation in HeLa cells. The cells were treated with 10 nM hUCN1 for the indicated time points or were left untreated as control. A significantly stronger ERK1/2 phosphorylation (pERK1 and pERK2) was detected 15 min after the start of the treatment compared with the control group. The nonphosphorylated forms of ERK1/2 served as loading control during reprobing of the membrane. Relative ERK phosphorylation was determined by the phosphorylated/total signal ratio. The values shown are presented by box + whiskers plots, indicating median (central horizontal line), min/max values, and mean (with '+' within the box) of five independently performed experiments ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$  vs. Control (two-way ANOVA, Dunnett).

detected, then the signal intensity fell rapidly back to around baseline (Fig. 10).

### hUCN1 decreases the level of p53 in HeLa cells

We examined the possible contribution of the cell cycle regulatory protein p53 in hUCN1-stimulated signaling pathways in lysates of HeLa cells. As indicated in Fig. 11, 10 nM hUCN1 could induce a significant, sustained decrease in the level of p53 at various time points (5'–6 h), then the signal intensity returned to around baseline by the end of the treatment day (Fig. 11).

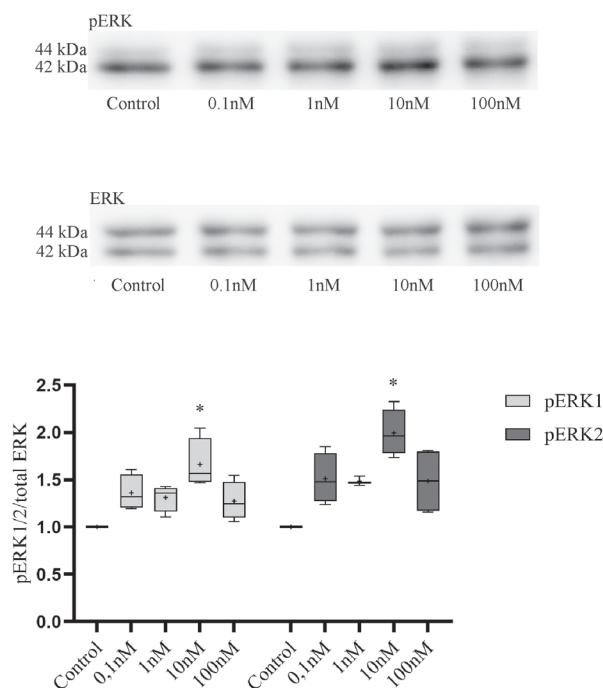
### Increased proliferation of HeLa cells measured by MTT assay

The MTT cell viability and proliferation assay was used to examine whether hUCN1 had any effect on

the proliferation of HeLa cells. The cultures were kept in their regular culturing medium as described above or in a medium supplemented with 10 nM hUCN1. In the presence of the peptide, a significant increase in MTT production was measured 24 h after the start of hUCN1 treatment when compared to values without hUCN1 treatment. This effect of 10 nM hUCN1 could be blocked using the CRF1-specific inhibitor Antalarmin, while Astressin 2b, a chemical inhibitor of CRF2, could not prevent the hUCN1-stimulated increase in cell proliferation (Fig. 12).

### Discussion

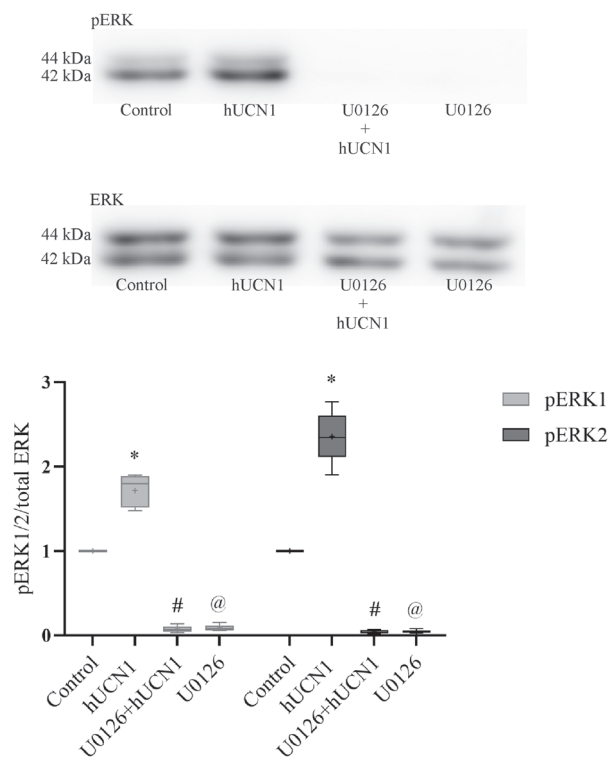
Urocortin members of the CRF ligand family are expressed throughout the CNS and also in peripheral organs, such as the heart, placenta, and gastrointestinal tract [16]. The effects of CRF family neuropeptides



**Fig. 4.** Dose-dependence of hUCN1-induced ERK1/2 phosphorylation by western blotting. HeLa cells were left untreated (Control) or were treated with various concentrations of hUCN1 (0.1–100 nM) for 15 min to induce the maximal phosphorylation of ERK1/2. Compared with the control group, a significant increase in ERK1/2 phosphorylation was apparent using 10 nM of hUCN1. Reprobing of the membrane for total ERK1/2 protein served the purpose of loading control. Relative protein phosphorylation was determined by the phosphorylated/total signal ratio. The values shown are presented by box + whiskers plots, indicating median (central horizontal line), min/max values, and mean (with '+' within the box) of four independently performed experiments ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$  Control vs. 10 nM hUCN1 (two-way ANOVA, Dunnett).

mediated through specific CRF receptors are extremely diverse, ranging from the regulation of stress responses, or anxiety, via influencing feeding behavior, to the modulation of cardiovascular and immune reactions [16,17]. Various actions of CRF neuropeptides and their receptors can also be important regulators of tumor development (see references from [15]). Urocortin, CRF, and their receptors have been detected in various human tumors, such as in breast cancer, glioma cell lines, and others [17,18]. According to Wang and Li [19], urocortin can inhibit the growth of tumor cells by activating CRF1.

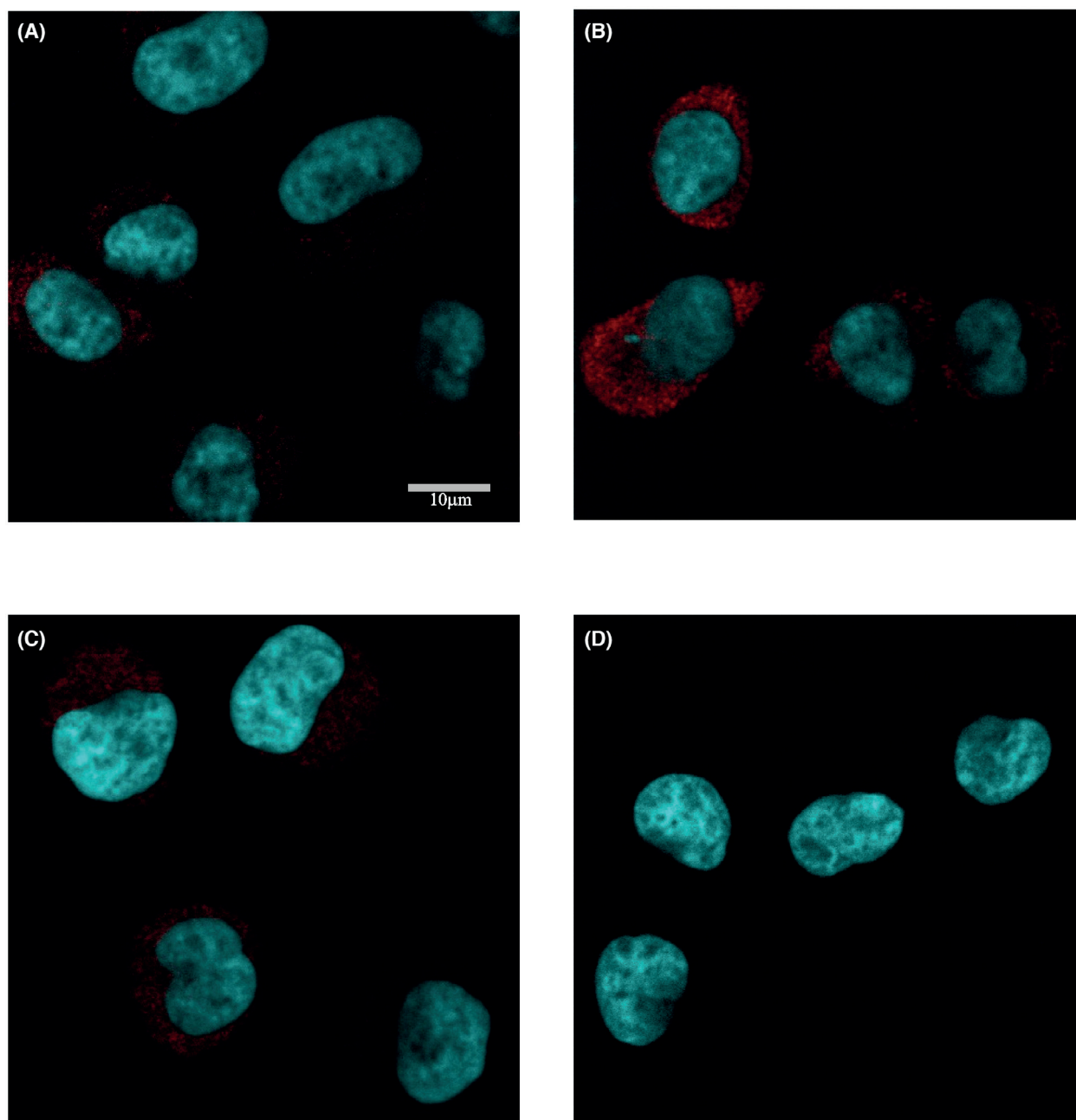
The MAPK isoforms ERK1 and 2 are key regulators of cell proliferation both in healthy and malignant cells. CRF receptors are coupled to  $G\alpha_s$  that can stimulate adenylate cyclase, which in turn increases intracellular cAMP production [20]. In neuronal cells the



**Fig. 5.** The effect of MEK inhibition on hUCN1-induced ERK1/2 phosphorylation in HeLa cells by western blotting. HeLa cells were pretreated with the MEK inhibitor U0126 (at 20  $\mu\text{M}$  final concentration), which can effectively inhibit the kinase activity of MEK. The treatment with the inhibitor started 30 min before and then continued during the last 15 min (altogether 45 min) in the simultaneous presence of 10 nM hUCN1 (to induce maximal ERK1/2 phosphorylation). The inhibitor could significantly reduce both baseline and hUCN1-induced ERK1/2 phosphorylation. Reprobing of the membrane for total ERK1/2 served as loading control. The phosphorylated/total signal ratio was used to determine relative protein phosphorylation. The values shown are presented by box + whiskers plots, indicating median (central horizontal line), min/max values, and mean (with '+' within the box) of five independently performed experiments ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$  Control vs. hUCN1 (10 nM); # $P < 0.05$  hUCN1 (10 nM) vs. U0126 + hUCN1 (10 nM); @ $P < 0.05$  Control vs. U0126 (two-way ANOVA, Tukey).

activating phosphorylation of the MAP kinase cascade through CRF receptors occurs by the stimulation of the cAMP/PKA pathway [21], while in mouse cardiomyocytes and Chinese hamster ovary cells MAPK activation is PKA-independent [20], indicating a cell-type-specific process. Other proteins could also be involved in the activation of ERK1/2 MAPK, such as PKB/Akt, PKC, and Raf-1 [22]. In human pregnant myometrial cells, urocortin stimulates the phosphorylation of ERK1/2 MAP kinase, but the activating phosphorylation can be prevented in the presence of the MEK inhibitor U0126 [23]. A similar pattern was also

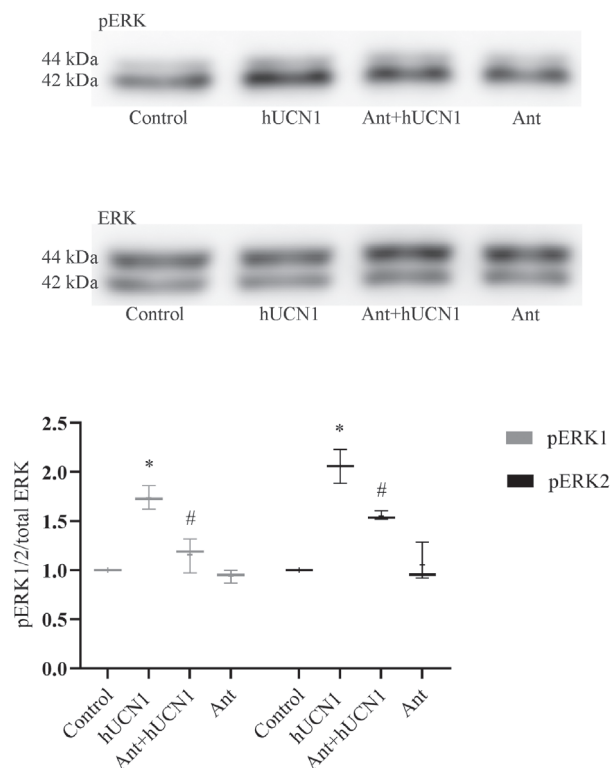




**Fig. 6.** Intracellular distribution of phospho-ERK1/2 in HeLa cells by means of immunofluorescence and laser scanning confocal microscopy. (A) barely detectable phospho-ERK1/2 signal in the cytoplasm of untreated HeLa cells. (B) Elevated pERK1/2 signal (red) 15 min after the start of hUCN1 treatment, predominantly in the cytoplasm of HeLa cells. (C) Weaker cytoplasmic pERK1/2 signal in the presence of 10 nM hUCN1 for 24 h. (D) Methodical control prepared by the omission of the primary antibody showed no noticeable immune signal at the applied microscope settings. The scale bar (10  $\mu$ m) in Panel (A) applies to all micrographs. Nuclei were counterstained using Hoechst 33342 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA).

described in our previous work [15] in MCF7 breast cancer cells and is supported by the present study likewise. Urocortin also protects the isolated rat heart against ischaemic and reperfusion injury in a

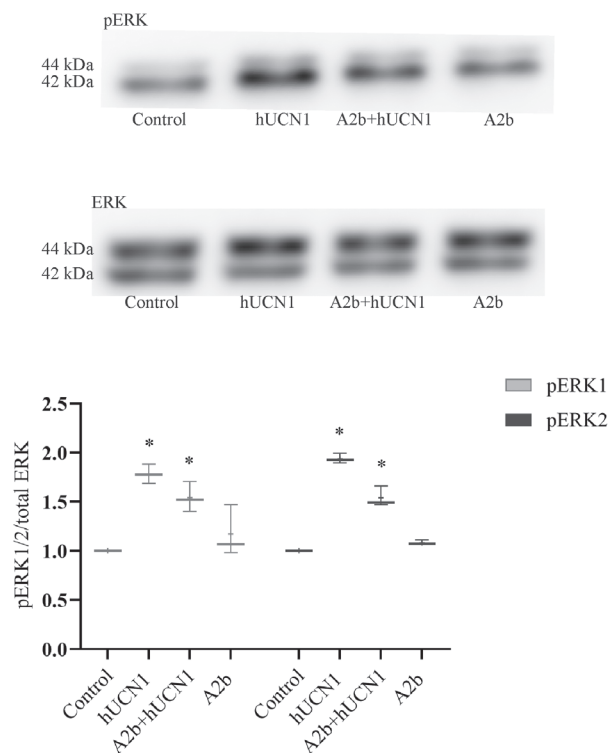
MAPK-dependent manner [21] by activating the phosphorylation of ERK1/2 [22]. Others have reported that urocortins (1, 2, and 3) can protect the rat heart from reperfusion injury not only *in vitro* but also *in vivo* via



**Fig. 7.** The effect of CRF1 inhibition on hUCN1-induced ERK1/2 phosphorylation by western blotting. HeLa cells were pretreated with the CRF1-specific antagonist Antalarmin at 100 nM final concentration. Inhibition was started 30 min before the urocortin treatment and was continued during the last 15 min (altogether 45 min) in the simultaneous presence of 10 nM hUCN1 (to induce maximal ERK1/2 phosphorylation). Compared with the hUCN1-treated group Ant could markedly reduce hUCN1-stimulated ERK1/2-activating phosphorylation. Reprobing of the membrane for total ERK1/2 served as loading control. The phosphorylated/total signal ratio was used to determine relative protein phosphorylation. The values shown are presented by box + whiskers plots, indicating median (central horizontal line), min/max values, and mean (with '+' within the box) of three independently performed experiments ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$  Control vs. hUCN1 (10 nM), # $P < 0.05$  hUCN1 (10 nM) vs. Ant + hUCN1 (10 nM; two-way ANOVA, Tukey).

upregulation of the MAPK ERK1/2 signaling pathway [24,25].

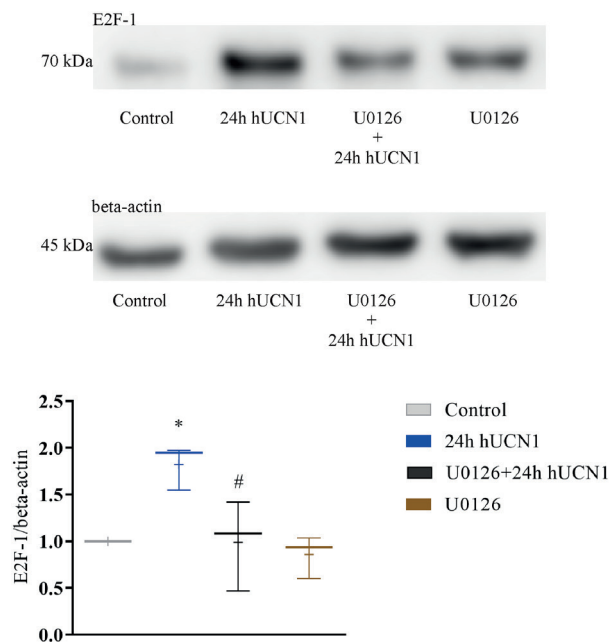
MAPKs are central regulatory elements of cell division signaling. In our current experiments, hUCN1 could maximally stimulate the activating phosphorylation of the MAPK ERK1/2 at a concentration as low as 10 nM 15 min after the start of the treatment, then the signal rapidly fell back to baseline. Active, phosphorylated ERK1/2 immunoreactivity could be detected predominantly in the cytoplasm by means of fluorescence microscopy. Transient cytoplasmic ERK1/2 activation is correlated with increased cell



**Fig. 8.** The effect of CRF2-inhibition onto hUCN1-induced ERK1/2 phosphorylation by western blotting. Pretreatment of cells with the CRF2-selective antagonist A2b at 100 nM final concentration was started 30 min before the hUCN1 treatment and continued during the last 15 min (altogether 45 min) in the simultaneous presence of 10 nM hUCN1 (to induce maximal ERK1/2 phosphorylation). A2b could not markedly reduce the ERK1/2-phosphorylating effect of 10 nM hUCN1, significantly increased ERK1/2 phosphorylation by hUCN1 was observable even in the presence of the inhibitor. Reprobing of the membrane for total ERK1/2 served as loading control. Relative protein phosphorylation was determined by the phosphorylated/total signal ratio. The values shown are presented by box + whiskers plots, indicating median (central horizontal line), min/max values, and mean (with '+' within the box) of three independently performed experiments ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$  vs. Control (two-way ANOVA, Tukey).

proliferation in PC12 rat pheochromocytoma tumor cells (for references see [15]). Pretreatment of HeLa cells with the MEK inhibitor U0126 could completely abolish the ERK1/2-phosphorylating effect of the peptide, pointing to a central role of MEK in hUCN1-induced ERK1/2 activation of HeLa cells.

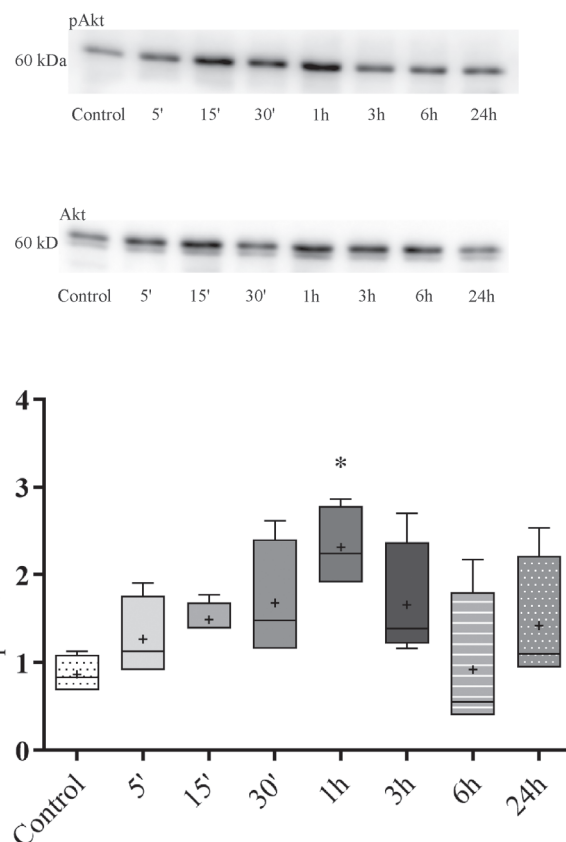
In the Ishikawa endometrial cell line, CRF1 mediates antiproliferative actions, while in peripheral blood lymphocytes, it supports apoptosis [18]. In CRF receptor-expressing HL-1 cardiac cells urocortin-induced ERK1/2 phosphorylation can be inhibited either by the CRF1-specific chemical inhibitor Antalarmin or by the specific CRF2 antagonist antisauvagine-30 [26]. The ERK1/2-



**Fig. 9.** hUCN1-induced E2F-1 protein expression measured by western blotting. Compared with the untreated control an increased expression of E2F-1 transcription factor was detected after 24 h in the presence of 10 nM hUCN1. This effect of hUCN1 was blocked by U0126, the selective inhibitor of MEK. Reprobing of the membranes for beta-actin served as loading control. The values shown are presented by box + whiskers plots, indicating median (central horizontal line), min/max values, and mean (with '+' within the box) of three independently performed experiments ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$  vs. Control, # $P < 0.05$  24 h hUCN1 (10 nM) vs. U0126 + 24 h hUCN1 (10 nM; one-way ANOVA, Tukey).

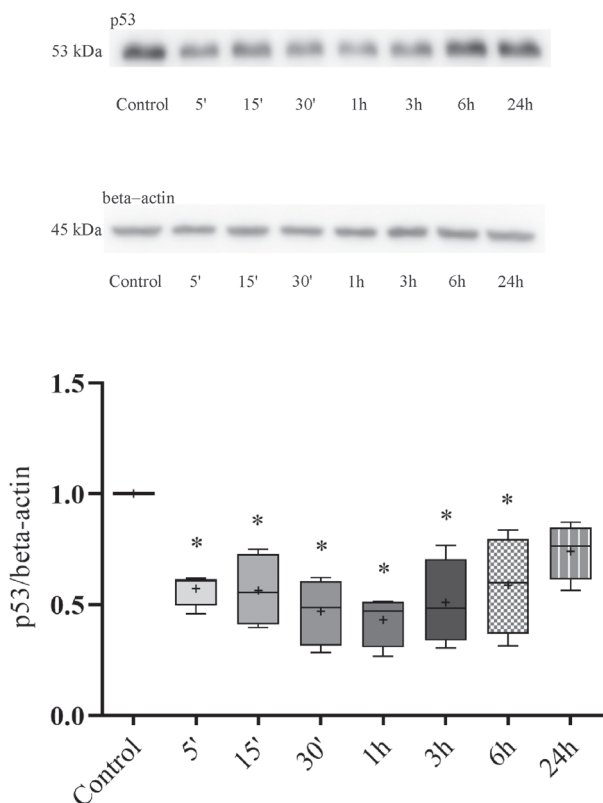
phosphorylating effect of urocortin can also be blocked by Astressin 2b, a chemical inhibitor of CRF2, as it was experienced in rat esophageal cells [27].

Stimulation of CRF1 by its ligands CRF or UCN1 is an important initial step in stress conditions like anxiety, depression, or inflammatory diseases of the intestinal tract. Hence, the inhibition of the receptor's activity is often favorable in experimental models of these conditions, and deciphering the cellular and molecular reactions in the background is of potential medical relevance. We could detect the presence of CRF1 and 2 by western blotting and immunofluorescence microscopy in HeLa cells using commercially available CRFR isoform-specific antibodies. In our earlier study with MCF7 human breast carcinoma cells [15], like in the work of others [10,11] CRF1 immunoreactivity was localized mostly to and along the plasma membrane. The CRF2 immune signal, on the contrary, had a broader distribution pattern with a more granular appearance and not only along the cell



**Fig. 10.** Time dependence of hUCN1-induced PKB/Akt phosphorylation by western blotting. A marked increase in PKB/Akt phosphorylation was measured in the presence of 10 nM hUCN1 that peaked 1 h after the start of the treatment. The membrane was reprobed for total Akt, which served as loading control. Relative protein phosphorylation was determined by the phosphorylated/total signal ratio. The values shown are presented by box + whiskers plots, indicating median (central horizontal line), min/max values, and mean (with '+' within the box) of four independently performed experiments ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$  vs. Control (one-way ANOVA, Dunnett).

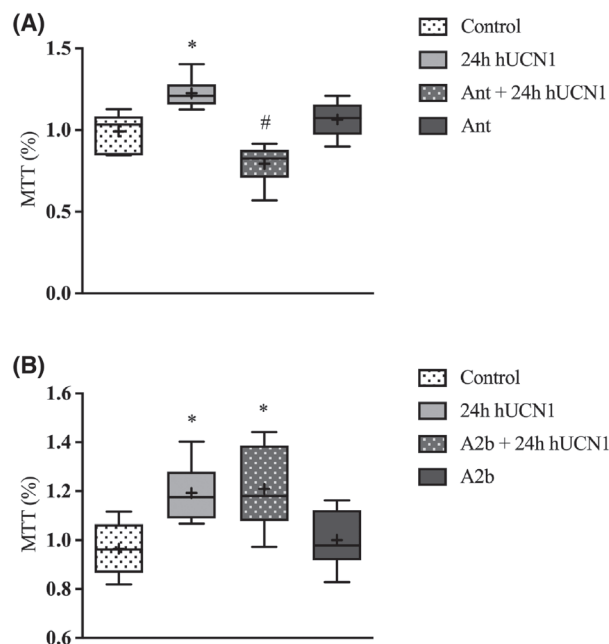
surface but reaching deeper into the cytoplasm as well. In HeLa cells, at the same time, the immune signal of both CRF1 and 2 was detectable not just along the cell surface but also reaching deeper into the cytoplasm. In this cell type, the signal pattern contained bigger granules in the case of CRF1 and finer ones for CRF2. Since the culturing conditions and all steps of the methodology were identical during the fluorescence microscopic work with both cell lines (MCF7 and HeLa), the observed differences in signal distribution (CRF1 in MCF7 closer to the membrane while CRF1 in HeLa and CRF2 also deeper in the cytoplasm of both cell lines)—we attribute to cell-type-specific features. We have not examined the potential



**Fig. 11.** The expression of p53 protein in hUCN1-stimulated HeLa cells by western blotting. A significant decrease in p53 expression was detected in the presence of 10 nM hUCN1 for the indicated time points (5 min to 6 h), then the signal intensity rose to around baseline. The beta-actin signal served as loading control. Relative p53 protein level was determined by the p53/beta-actin ratio. The values shown are presented by box + whiskers plots, indicating median (central horizontal line), min/max values, and mean (with '+' within the box) of four independently performed experiments ( $n = 4$ ). \* $P < 0.05$  vs. Control (one-way ANOVA, Dunnett).

heterodimerization of CRF1 and 2 receptors, which can also have a serious effect on their subcellular localization [10].

The general experience in stress signaling is that CRF1 mediates mainly stress-adaptive responses, while signals originating from CRF2 mostly dampen the effects of CRF1 receptor and that way ameliorate stress reactions of biological systems [28,29]. Pretreatment of HeLa cells with the CRF1 inhibitor Antalarmin could significantly decrease the ERK1/2-phosphorylating effect of hUCN1, indicating the importance of CRF1 receptor in hUCN1-induced ERK1/2 phosphorylation in this cell type. On the contrary, we could not detect a statistically significant inhibitory effect in the presence of the CRF2 inhibitor Astressin 2b during hUCN1 treatment of HeLa cells.



**Fig. 12.** Increased MTT production of HeLa cells in the presence of 10 nM hUCN1. A significant increase in cell proliferation was measured by the applied MTT assay in the presence of 10 nM hUCN1 for 24 h compared with the untreated (Control) group. This effect of hUCN1 could be prevented in the presence of Antalarmin, a chemical inhibitor of CRF1 (Panel A). On the contrary, Astressin 2b, a specific inhibitor of CRF2 was not able to abolish the cell proliferation-stimulating effect of hUCN1 (Panel B). The values shown are presented by box + whiskers plots, indicating median (central horizontal line), min/max values, and mean (with '+' within the box) of six independently performed experiments ( $n = 6$ , Panel A and B). Panel A: \* $P < 0.05$  Control vs. 24 h hUCN1 (10 nM), # $P < 0.05$  24 h hUCN1 (10 nM) vs. Ant + 24 h hUCN1 (10 nM); Panel B: \* $P < 0.05$  vs. Control (one-way ANOVA, Tukey).

Furthermore, we examined the effect of 10 nM hUCN1 treatment on the proliferation of HeLa cells by MTT assay. Our results showed a significant increase in MTT production 24 h after the start of hUCN1 treatment. The cell proliferation-stimulating effect of hUCN1 could also be inhibited using Antalarmin, a specific inhibitor of CRF1, while pretreatment with CRF2 inhibitor Astressin 2b did not show such an effect—a striking difference compared with that seen earlier with MCF7 cells, where both receptor inhibitors could reduce MTT production [15]. The observed differences are pointing to important cell-type-specific deviations in urocortin's signaling mechanism of action. The converted MTT tetrazolium compound is used to determine the number of healthy, viable cells. Based on our results we can conclude that 24 h of 10 nM hUCN1 treatment increased the number of live HeLa cells, which could be inhibited by

Antalarmin, indicating the significance of CRF1 in this signaling process induced by urocortin in HeLa cells.

We tried to decipher the molecular background of the observed increase in cell proliferation by measuring the expression of E2F-1, the pivotal activator of S-phase genes. We could detect a significant increase in the level of E2F-1 24 h after the start of hUCN1 treatment by western blotting. Meanwhile, the MEK inhibitor U0126 could inhibit the E2F-1-stimulating effect of hUCN1, suggesting the involvement of MEK in these urocortin-stimulated signaling steps.

Apoptosis is another phenomenon that is frequently mediated via CRF receptors. According to Tsatsanis *et al.* [30], urocortin can induce apoptosis in macrophages via CRF2, including the activation of central pro-apoptotic proteins, like Bad and Bax. On the contrary, in the RM-1 mouse prostate cancer cell line, the presence of urocortin did not support apoptosis, while CRF had the opposite effect [31]. The cardioprotective actions of urocortin2 against ischemia–reperfusion (I/R) are well known, and at the same time, it decreases apoptosis in Wistar rats [32]. CRF also suppressed apoptosis in Y79 human retinoblastoma cells by inhibiting the proteolytic cleavage and activation of pro-caspase 3 [33].

Based on the above data, we tried to determine the contribution of the cell cycle- and cell survival-/apoptosis-regulator protein p53 to hUCN1-stimulated signaling events in HeLa cells. Data generated by western blots showed a significant decrease in p53 expression in the presence of 10 nM hUCN1, then the signal intensity rose back to around baseline 24 h after the start of the treatment. In an earlier study [15] treatment of MCF7 cells resulted in significantly increased expression of p53. The differing effects of hUCN1 on p53 expression again underline the importance of cell-type-specific differences in urocortin signaling under the applied settings.

Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) activation by urocortin was reported by Chandras *et al.* [34] in human monocytic THP-1 cells, an effect mediated by CRF2, while in human embryonic kidney (HEK) 293 cells the enzyme is activated via CRF1 [35]. UCN2 can regulate glucose metabolism by inhibiting the insulin-induced phosphorylation of ERK1/2 and Akt in C2C12 myotubes [36], and a similarly decreased Akt phosphorylation at Ser-473 was also described in L6 myotubes by Gao *et al.* [37].

In this direction, we could also detect the activating phosphorylation of the key cell survival-regulator PKB/Akt 1 h after the start of hUCN1 treatment. hUCN1-induced activation of the enzyme and the decreased p53 level may both contribute to the

increased survival of HeLa cells. An additional important factor worth considering is that HeLa human cervical carcinoma cells used in the current study similar to the MCF7 human ductal breast carcinoma cell line used in our previously published work [15] are both of female origin. Furthermore, in HeLa cells of cervical cancer origin, the E6 and E7 early proteins of human papilloma viruses interfere with the normal function of key signaling and cell cycle-controlling proteins like that of retinoblastoma and p53 [38–41]. Therefore we should keep sex [42] and the presence of potent signal-distorting components of viral origin as important possible factors in mind when interpreting our data and their potential pathological and therapeutic relevance.

## Conclusions

Our results showed the presence of both CRF1 and 2 immunoreactivities in the cytoplasm of HeLa cells using isoform-specific antisera and laser scanning confocal microscopy. We could detect transient ERK1/2 phosphorylation peaking at 15 min in the presence of 10 nM hUCN1. This effect of hUCN1 could be prevented by the MEK inhibitor U0126 suggesting the pivotal role of the MAPK kinase in hUCN1-induced ERK1/2 activation. We also demonstrated that the ERK1/2 phosphorylating effect of 10 nM hUCN1 was initiated via CRF1, while the participation of CRF2 in this process is not confirmed by our data. hUCN1 treatment increased the expression of the E2F-1 transcription factor, a key regulator of S-phase genes supporting cell proliferation. This phenomenon could be blocked by U0126, the chemical inhibitor of MEK emphasizing the importance of the enzyme in hUCN1-stimulated signaling pathways. At the same time, urocortin increased the overall production of MTT formazan crystals in HeLa cells, which could be inhibited by the CRF1-specific inhibitor Antalarmin, but not by Astressin 2b the inhibitor of the other main CRF receptor isoform. Interestingly, in MCF7 cells [15] both receptor isoform-specific inhibitors could reduce MTT production to a significant degree. The elevated expression of E2F-1 and the increased production of formazan dye in the presence of urocortin are both suggestive of increased HeLa cell proliferation. While the activating phosphorylation of PKB/Akt and the decreased expression of p53 upon hUCN1 treatment support increased cell survival in the same cell type. In view of our data, we can conclude that the effect of hUCN1 in HeLa cells is mediated via CRF1 and MEK towards ERK1/2 while MEK is also critical for the induction of increased E2F-1 expression, supporting



increased cell proliferation. We believe that our results can help a better understanding of how urocortins exert their cell proliferation-regulating effects in a cell-type-specific manner and it also sheds light onto their potential role in cancer formation. The above-revealed cell-type-specific aspects of urocortins' signaling may also have therapeutic relevance to targeted treatments of various malignancies in the future.

## Acknowledgements

This work was supported by grants ÁOK KA-2021-31 to G. Sétáló, Jr., and project no. TKP2020-IKA-08, the latter financed under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme and also Project No. TKP2021-EGA-16 has been implemented with the support provided by the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the TKP2021-EGA funding scheme. The purchase of the Olympus FV-1000 laser scanning confocal system was supported by grant GVOP-3.2.1-2004-04-0172/3.0 to the University of Pécs, Hungary. The funding sources were not involved in the study design, collection, analysis, and interpretation of data relevant to the present study, in the writing of the report, and in the decision to submit the article for publication.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Data accessibility

All data are presented in the manuscript.

## Author contributions

BB performed experiments (cell culturing and treatments, investigation using western blots, MTT assay, confocal microscopy), analyzed and visualized data, and wrote the original manuscript; GB conducted confocal imaging; MV performed experiments (cell culturing and treatments, investigation using western blots, visualization); OT and AS-H reviewed the manuscript; GS Jr engaged in conceptualization, supervision, project administration, funding acquisition, and investigation using confocal microscopy, and also reviewed and edited the text.

## References

- 1 Spiess J, Rivier J, Rivier C and Vale W (1981) Primary structure of corticotropin-releasing factor

- from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 6517–6521.
- 2 Chen R, Lewis KA, Perrin MH and Vale WW (1993) Expression cloning of a human corticotropin-releasing factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 8967–8971.
- 3 Reubi JC, Waser B, Vale W and Rivier J (2003) Expression of CRF1 and CRF2 receptors in human cancers. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 3312–3320.
- 4 Takahashi LK (2001) Role of CRF1 and CRF2 receptors in fear and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* **25**, 627–636.
- 5 Grammatopoulos DK (2012) Insights into mechanisms of corticotropin-releasing hormone receptor signal transduction. *Br J Pharmacol* **166**, 85–97.
- 6 Potter E, Sutton S, Donaldson C, Chen R, Perrin M, Lewis K, Sawchenko PE and Vale W (1994) Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 8777–8781.
- 7 Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C *et al.* (1995) Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* **378**, 287–292.
- 8 Dedic N, Chen A and Deussing JM (2017) The CRF family of neuropeptides and their receptors – mediators of the central stress response. *Curr Mol Pharmacol* **11**, 4–31.
- 9 Pal K, Swaminathan K, Xu HE and Pioszak AA (2010) Structural basis for hormone recognition by the human CRFR2 $\alpha$  G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* **285**, 40351–40361.
- 10 Hasdemir B, Mahajan S, Osés-Prieto J, Chand S, Woolley M, Burlingame A, Grammatopoulos DK and Bhargava A (2017) Actin cytoskeleton-dependent regulation of corticotropin-releasing factor receptor heteromers. *Mol Biol Cell* **28**, 2386–2399.
- 11 Hasdemir B, Mahajan S, Bunnnett NW, Liao M and Bhargava A (2012) Endothelin-converting enzyme-1 actions determine differential trafficking and signaling of corticotropin-releasing factor receptor 1 at high agonist concentrations. *Mol Endocrinol* **26**, 681–695.
- 12 Battaglia G, Webster EL and De Souza EB (1987) Characterization of corticotropin-releasing factor receptor-mediated adenylate cyclase activity in the rat central nervous system. *Synapse* **1**, 572–581.
- 13 Mia Chen F, Bilezikjian LM, Perrin MH, Rivier J and Vale W (1986) Corticotropin releasing factor receptor-mediated stimulation of adenylate cyclase activity in the rat brain. *Brain Res* **381**, 49–57.
- 14 Karteris E, Grammatopoulos D, Randeva H and Hillhouse EW (2000) Signal transduction characteristics of the corticotropin-releasing hormone receptors in the fetoplacental unit. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 1989–1996.

- 15 Balogh B, Vecsernyés M, Veres-Székely A, Berta G, Stayer-Harci A, Tarjányi O and Sétáló G (2022) Urocortin stimulates ERK1/2 phosphorylation and proliferation but reduces ATP production of MCF7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* **547**, 111610.
- 16 Kaprara A, Pazaitou-Panayiotou K, Kortsaris A and Chatzaki E (2010) The corticotropin releasing factor system in cancer: expression and pathophysiological implications. *Cell Mol Life Sci* **67**, 1293–1306.
- 17 Arcuri F, Cintorino M, Florio P, Floccari F, Pergola L, Romagnoli R, Petraglia F, Tosi P and Del Vecchio MT (2002) Expression of urocortin mRNA and peptide in the human prostate and in prostatic adenocarcinoma. *Prostate* **52**, 167–172.
- 18 Kaprara A, Pazaitou-Panayiotou K, Chemonidou MC, Constantinidis TC, Lambropoulou M, Koffa M, Kiziridou A, Kakolyris S, Kortsaris A and Chatzaki E (2010) Distinct distribution of corticotropin releasing factor receptors in human breast cancer. *Neuropeptides* **44**, 355–361.
- 19 Wang J and Li S (2007) Corticotropin-releasing factor family and its receptors: tumor therapeutic targets? *Biochem Biophys Res Commun* **362**, 785–788.
- 20 Brar BK, Chen A, Perrin MH and Vale W (2004) Specificity and regulation of extracellularly regulated kinase1/2 phosphorylation through corticotropin-releasing factor (CRF) receptors 1 and 2 $\beta$  by the CRF/urocortin family of peptides. *Endocrinology* **145**, 1718–1729.
- 21 Elliott-Hunt CR, Kazlauskaitė J, Wilde GJC, Grammatopoulos DK and Hillhouse EW (2002) Potential signalling pathways underlying corticotrophin-releasing hormone-mediated neuroprotection from excitotoxicity in rat hippocampus. *J Neurochem* **80**, 416–425.
- 22 Brar BK, Jonassen AK, Egorina EM, Chen A, Negro A, Perrin MH, Mjøs OD, Latchman DS, Lee KF and Vale W (2004) Urocortin-II and Urocortin-III are cardioprotective against ischemia reperfusion injury: an essential endogenous cardioprotective role for corticotropin releasing factor receptor type 2 in the murine heart. *Endocrinology* **145**, 24–35.
- 23 Karteris E, Hillhouse EW and Grammatopoulos D (2004) Urocortin II is expressed in human pregnant myometrial cells and regulates myosin light chain phosphorylation: potential role of the Type-2 corticotropin-releasing hormone receptor in the control of myometrial contractility. *Endocrinology* **145**, 890–900.
- 24 Schulman D, Latchman DS and Yellon DM (2002) Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, 1481–1488.
- 25 Davidson SM, Rybka AE and Townsend PA (2009) The powerful cardioprotective effects of urocortin and the corticotropin releasing hormone (CRH) family. *Biochem Pharmacol* **77**, 141–150.
- 26 Yuan Z, McCauley R, Chen-Scarabelli C, Abounit K, Stephanou A, Barry SP, Knight R, Saravolatz SF, Saravolatz LD, Ulgen BO *et al.* (2010) Activation of Src protein tyrosine kinase plays an essential role in urocortin-mediated cardioprotection. *Mol Cell Endocrinol* **325**, 1–7.
- 27 Wu SV, Yuan PQ, Wang L, Peng YL, Chen CY and Taché Y (2007) Identification and characterization of multiple corticotropin-releasing factor type 2 receptor isoforms in the rat esophagus. *Endocrinology* **148**, 1675–1687.
- 28 Hotta M, Shibasaki T, Aral K and Demura H (1999) Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates emotional stress-induced inhibition of food intake and behavioral changes in rats. *Brain Res* **823**, 221–225.
- 29 Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, Rivier J, Vale WW *et al.* (2001) Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 2843–2848.
- 30 Tsatsanis C, Androulidaki A, Dermizaki E, Charalampopoulos I, Spiess J, Gravanis A and Margioris AN (2005) Urocortin 1 and Urocortin 2 induce macrophage apoptosis via CRFR 2. *FEBS Lett* **579**, 4259–4264.
- 31 Jin L, Zhang Q, Guo R, Wang L, Wang J, Wan R, Zhang R, Xu Y and Li S (2011) Different effects of corticotropin-releasing factor and urocortin 2 on apoptosis of prostate cancer cells in vitro. *J Mol Endocrinol* **47**, 219–227.
- 32 Mayoral-González I, Calderón-Sánchez EM, Galeano-Otero I, Martín-Bórnez M, Gutiérrez-Carretero E, Fernández-Velasco M, Domenech N, Crespo-Leiro MG, Gómez AM, Ordóñez-Fernández A *et al.* (2022) Cardiac protection induced by urocortin-2 enables the regulation of apoptosis and fibrosis after ischemia and reperfusion involving miR-29a modulation. *Mol Ther Nucleic Acids* **27**, 838–853.
- 33 Radulovic M, Hippel C and Spiess J (2003) Corticotropin-releasing factor (CRF) rapidly suppresses apoptosis by acting upstream of the activation of caspases. *J Neurochem* **84**, 1074–1085.
- 34 Chandras C, Koutmani Y, Kokkotou E, Pothoulakis C and Karalis KP (2009) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B by corticotropin-releasing factor in human monocytes. *Endocrinology* **150**, 4606–4614.
- 35 Punn A, Levine MA and Grammatopoulos DK (2006) Identification of signaling molecules mediating corticotropin-releasing hormone-R1 $\alpha$ -mitogen-activated protein kinase (MAPK) interactions: the critical role of phosphatidylinositol 3-kinase in regulating ERK1/2 but not p38 MAPK activation. *Mol Endocrinol* **20**, 3179–3195.

- 36 Chen A, Brar B, Choi CS, Rousso D, Vaughan J, Kuperman Y, Kim SN, Donaldson C, Smith SM, Jamieson P *et al.* (2006) Urocortin 2 modulates glucose utilization and insulin sensitivity in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 16580–16585.
- 37 Gao MH, Giamouridis D, Lai NC, Walenta E, Paschoal VA, Kim YC, Miyahara A, Guo T, Liao M, Liu L *et al.* (2016) One-time injection of AAV8 encoding urocortin 2 provides long-term resolution of insulin resistance. *JCI Insight* **1**, e88322.
- 38 Zur Hausen H (1999) Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin Cancer Biol* **9**, 405–411.
- 39 Mantovani F and Banks L (2001) The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **20**, 7874–7887.
- 40 Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B and Galloway DA (1997) Inhibition of CDK activity and pcna-dependent DNA replication p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* **11**, 2090–2100.
- 41 Jones DL, Alani RM and Münger K (1997) The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21(Cip1)-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* **11**, 2101–2111.
- 42 Bangasser DA, Curtis A, Reyes BAS, Bethea TT, Parastatidis I, Ischiropoulos H, Van Bockstaele EJ and Valentino RJ (2010) Sex differences in corticotropin-releasing factor receptor signaling and trafficking: potential role in female vulnerability to stress-related psychopathology. *Mol Psychiatry* **15**, 896–904.





## Urocortin stimulates ERK1/2 phosphorylation and proliferation but reduces ATP production of MCF7 breast cancer cells

Bálint Balogh<sup>a</sup>, Mónika Vecsernyés<sup>a,b</sup>, Apor Veres-Székely<sup>c,d</sup>, Gergely Berta<sup>a,b</sup>,  
Alexandra Stayer-Harci<sup>a,b</sup>, Oktávia Tarjányi<sup>a,b</sup>, György Sétáló Jr.<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Medical Biology and Central Electron Microscope Laboratory, University of Pécs, Medical School, Pécs, H-7643, Pécs, Szigeti út 12, Hungary

<sup>b</sup> Signal Transduction Research Group, János Szentágotthai Research Centre, Pécs, H-7624, Pécs, Ifjúság útja 20, Hungary

<sup>c</sup> 1st Department of Pediatrics, Semmelweis University, Budapest, H-1083, Budapest, 53-54. Bókay Street, Hungary

<sup>d</sup> ELKH-SE Pediatrics and Nephrology Research Group, Budapest, Hungary

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

MCF7  
Cell proliferation  
Urocortin  
ERK1/2  
Retinoblastoma  
E2F

### ABSTRACT

Urocortins are members of the stress-related corticotropin-releasing factor family. Small amounts of them are present in the circulation and they are produced locally in various tissues of higher vertebrates. Aside from regulating circulation, or food uptake they also influence, via auto- and paracrine mechanisms, cell proliferation. In the present study we investigated in MCF7 human breast cancer cells the effect of urocortin onto mitogenic signaling via ERK1/2. Our results revealed that already 10 nM urocortin could stimulate the phosphorylation of these kinases and cell proliferation of MCF7 cells while ATP production was reduced when kept in the presence of the peptide up to two days. We examined the expression and contribution of the specific receptors of urocortin to the activation of ERK1/2 and to cell proliferation, the intracellular distribution of phosphorylated ERK1/2, and the involvement of additional proteins like PKA, PKB/Akt, MEK, p53, Rb and E2F-1 behind the observed phenomena.

### 1. Introduction

Isoforms of urocortin (UCN) belong to the corticotropin-releasing factor (CRF) or hormone (CRH) family of stress-related neuropeptides. They act complementary to or contrasting the effects of CRF (Vaughan et al., 1995; Wang and Li, 2007) when mediating stress reactions (Dunn and Berridge, 1990; Vale et al., 1981). This family of ligands includes in higher vertebrates CRF, and related UCN1, UCN2 - the latter also known as stresscopin-related peptide - and UCN3 or stresscopin. In mammals, all three types of UCN are coded by their own genes (Hauger et al., 2003; Hsu and Hsueh, 2001; Vaughan et al., 1995). In humans the above ligands can be found in peripheral tissues as well as in the central nervous system (Boorse and Denver, 2006).

Class B1 (secretin-like) G protein-coupled CRF (or CRH) Receptor isoforms (CRFR1 and 2 or CRHR1 and 2) of these peptides are present in various healthy or cancerous tissue and cell types. The receptor isoforms are encoded by separate genes and their RNA transcripts are subject to

extensive splicing (Chang et al., 1993; Hauger et al., 2003; Kishimoto et al., 1995; Lovenberg et al., 1995; Perrin and Vale, 1999). CRFR expression was reported in MCF7 cells at the mRNA level (Androulidaki et al., 2009; Graziani et al., 2007) with CRFR1 mRNA in much higher amounts than that of CRFR2. Recently Koureta et al. (2020) have also detected CRFR2 immunoreactivity in MCF7 cells using polyclonal antisera. In addition, the activities of CRF and UCN are regulated by the CRF-binding protein (CRF-BP). It is regarded as an endogenous buffer or pseudo-receptor for CRF and UCN, controlling ligand availability for the receptors (Behan et al., 1996; Dautzenberg and Hauger, 2002; Seasholtz et al., 2002).

UCNs may convey varying effects depending on interacting ligand and receptor isoform, the type of the cell exposed or even the species (Rademaker and Richards, 2017). CRFR1 binds CRF and UCN1, while CRFR2 preferentially binds UCNs with much higher affinity compared to that towards CRF. From the ligand's perspective UCN1 binds to both CRFR1 and 2 (Chen et al., 1993; Hsu and Hsueh, 2001; Lewis et al., 2001; Lovenberg et al., 1995; Reyes et al., 2001; Vaughan et al., 1995)

\* Corresponding author. Department of Medical Biology and Central Electron Microscope Laboratory, University of Pécs, Medical School, Pécs, H-7643, Pécs, Szigeti út 12, Hungary.

E-mail addresses: [balint.balogh@aok.pte.hu](mailto:balint.balogh@aok.pte.hu) (B. Balogh), [monika.hengl@aok.pte.hu](mailto:monika.hengl@aok.pte.hu) (M. Vecsernyés), [veres-szekely.apor@med.semmelweis-univ.hu](mailto:veres-szekely.apor@med.semmelweis-univ.hu) (A. Veres-Székely), [gergely.bertha@aok.pte.hu](mailto:gergely.bertha@aok.pte.hu) (G. Berta), [harcialex@gmail.com](mailto:harcialex@gmail.com) (A. Stayer-Harci), [oktavia.tarjanyi@aok.pte.hu](mailto:oktavia.tarjanyi@aok.pte.hu) (O. Tarjányi), [gyorgy.setalo.jr@gmail.com](mailto:gyorgy.setalo.jr@gmail.com), [gyorgy.setalo.jr@aok.pte.hu](mailto:gyorgy.setalo.jr@aok.pte.hu) (G. Sétáló).

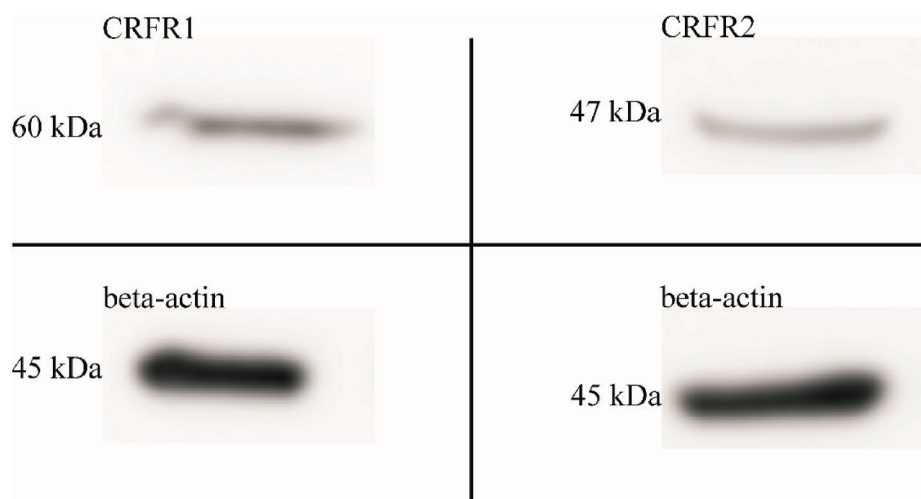
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111610>

Received 23 June 2021; Received in revised form 15 December 2021; Accepted 22 February 2022

Available online 24 February 2022

0303-7207/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abbreviations	
ATCC	American Type Culture Collection
Ant	Antalarmin, a CRFR1-inhibiting compound
A2B	Astressin 2B, a CRFR2-inhibiting compound
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
Class B1 GPCR	Class B1 ('brain-gut' neuropeptides B/secretin-like hormone) G protein-coupled receptor
CHO	Chinese hamster ovary cells
CRF	corticotropin-releasing factor
CRF-BP	CRF-binding protein
CRH	corticotropin-releasing hormone
CRFR1 and CRFR2	corticotropin-releasing factor receptor 1 and 2
Cy3	a fluorophor cyanine dye
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
E2F	a cell cycle regulating transcription factor family
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
EPAC	Exchange Protein directly Activated by cAMP
ERK1/2	Extracellular signal-Regulated Kinase 1 and 2
G-proteins	Guanine nucleotide-binding proteins
HEK293	Human Embryonic Kidney cell line
HRP	horseradish-peroxidase
H89	H-8 (N-[2-(methylamino)ethyl]-5-isoquinoline-sulfonamide), an inhibitor of PKA
HU	Human Urocortin1
HU10	10 nM of HU
MAP Kinase	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCF7	Michigan Cancer Foundation 7, human breast adenocarcinoma cell line
MEK	Mitogen-activated protein kinase/ERK Kinase
p38MAPK	a MAP Kinase with the molecular weight of 38 kDa
PBS	phosphate buffered saline
PC12	rat pheochromocytoma cell line
pERK 1 and 2	phosphorylated ERK1 and 2
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PMSF	Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride
PKB/Akt	Protein Kinase B/also known as Akt protein (the latter isolated from a thymoma cell line of AKR-type mice)
pRb	phosphorylated Retinoblastoma protein
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
p53	a tumor suppressor protein with the molecular weight of 53 kDa
Raf-1	a kinase isolated from rapidly proliferating fibrosarcoma
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBS	Tris-Buffered Saline
UCN	Urocortin
U0126	a chemical compound that inhibits MEK



**Fig. 1.** CRF receptor immunoreactivities in MCF7 cells by Western blotting. Upper left and right quadrants: CRFR1 and CRFR2 immunoreactivities in lysates of MCF7 cells. Lower two quadrants: The beta-actin signal was the loading reference across the lanes.

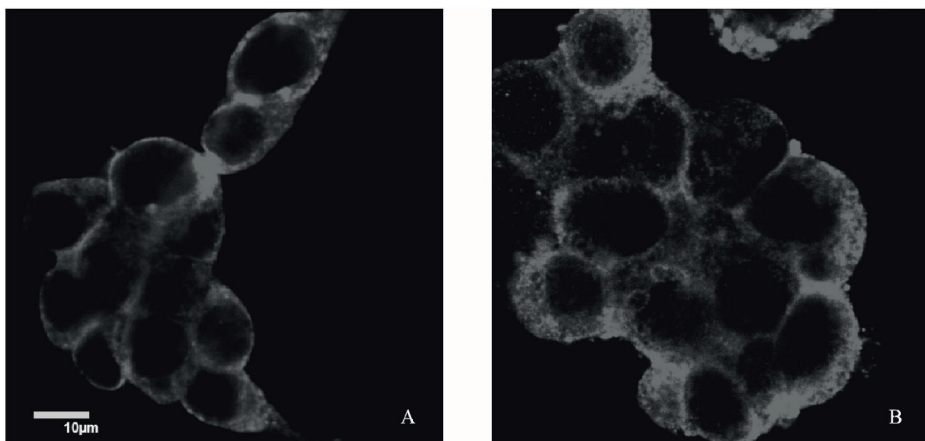
but UCN2 and UCN3 appear to be selective partners of CRFR2 (Dautzenberg and Hauger, 2002).

Ligand binding of CRFR1 and 2 leads to increased cAMP production followed by the activation of PKA (Battaglia et al., 1987; Chen et al., 1986). Although most studies reflect that CRF receptors couple primarily to G $\alpha$  which, in turn activates adenylyl-cyclase, other second messenger systems and the activation of MAPK pathways (Grammatopoulos and Ourailidou, 2017; Karteris et al., 2000; Ulisse et al., 1989) have also been implicated. This signaling promiscuity reflects CRFRs' ability to bind to various G-proteins, hence stimulating several pathways, often in a tissue- or cell type-specific manner. (Grammatopoulos, 2012 and references therein).

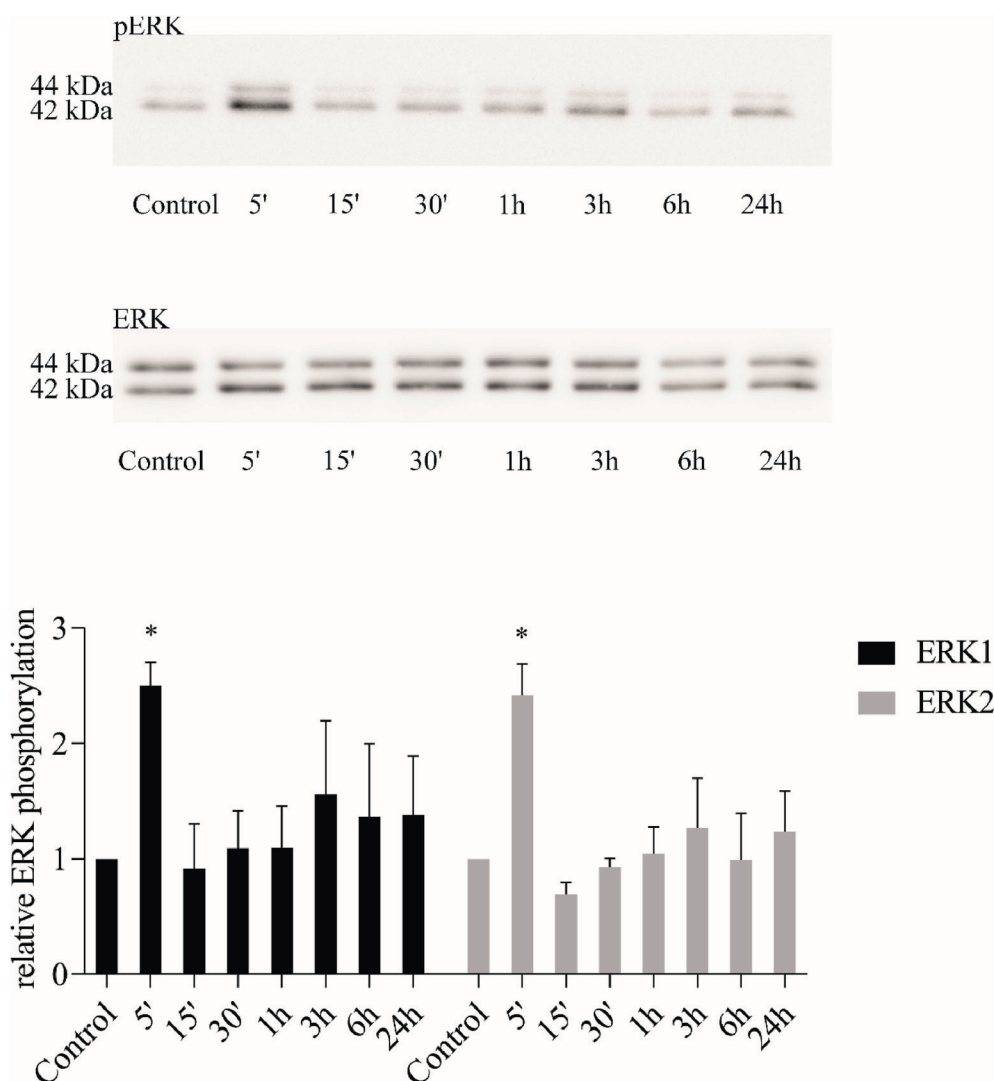
Aside from its physiological functions like the regulation of stress, circulation and food uptake (Deussing and Chen, 2018) the CRF-system

has also been proposed to play an important role in the development of tumors (Kaprra et al., 2010a, 2010b). Originally cloned from the pleural effusion of an invasive breast ductal carcinoma (Soule et al., 1973) and named after Michigan Cancer Foundation, MCF7 adenocarcinoma cells are among the best-studied adherent human tumor cell lines. Breast cancer is one of the most frequently occurring human tumors, whereas stress and obesity are both risk factors of cancer formation.

In the current study, we set out to examine possible direct effects of human UCN1 (HU) onto the proliferation of MCF7 cells with special emphasis on the identity of the involved receptors, the activity and intracellular localization of the mitogenic signaling proteins ERK1 and 2 and their activator MEK. Our observations also shed light onto the involvement of the pRb-E2F pathway behind the cell proliferation-



**Fig. 2.** Intracellular localization of CRF receptor immunoreactivities in MCF7 cells by means of immunofluorescence and laser scanning confocal microscopy. CRFR1 (A) and CRFR2 (B) immunoreactivity in the cytoplasm of MCF7 cells with maximal signal intensities towards the plasma membrane. Omission of the primary antibody or the use of non-immune IgG resulted in the complete lack of immune signal (not shown) at the applied microscope settings. The scale bar (in panel A) applies to both micrographs.



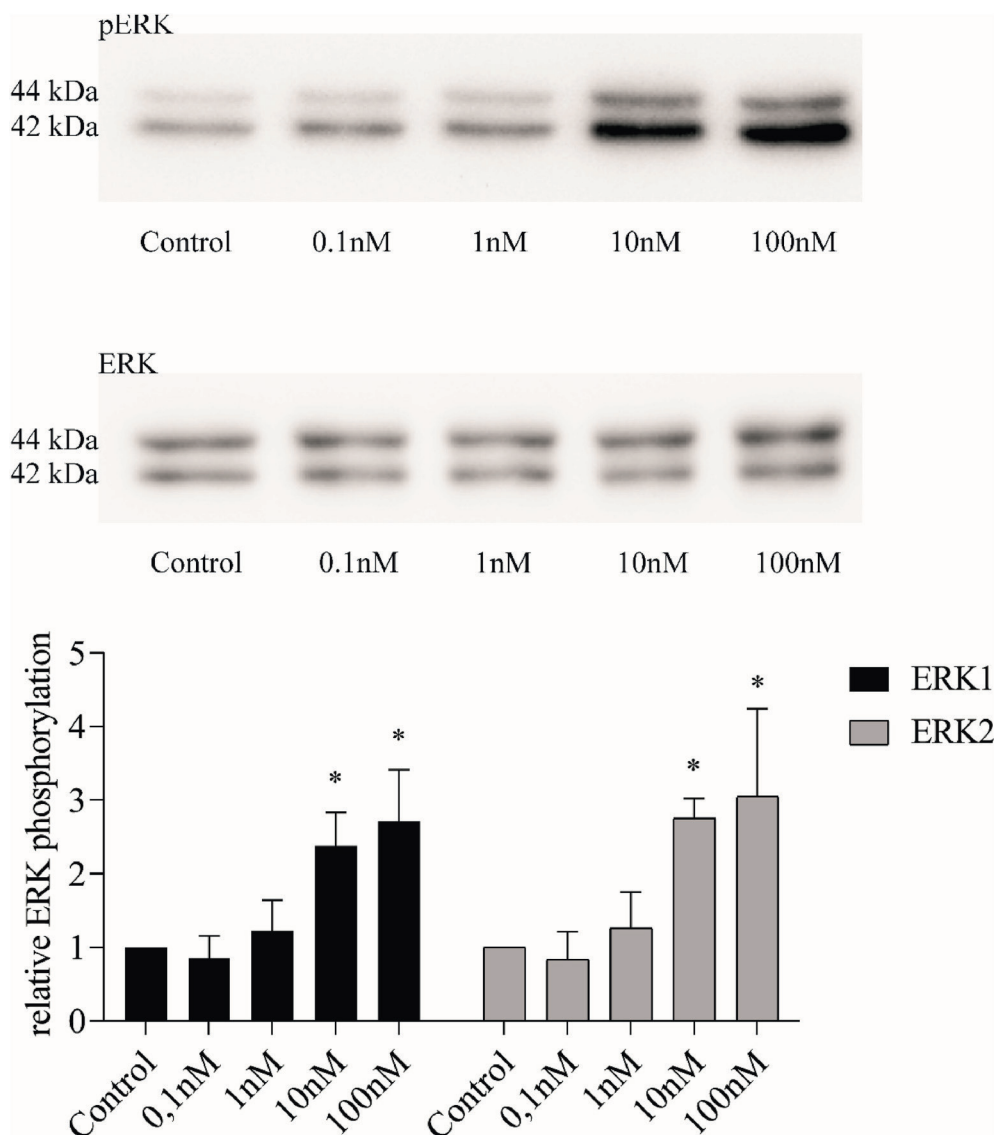
**Fig. 3.** Time kinetics of HU-induced, activating ERK1/2 phosphorylation (pERK1 and 2) in MCF7 cells by Western blotting. (The molecular weights of ERK 1 and ERK 2 isoforms are 44 and 42 kDa, respectively.) MCF7 cells were left untreated (Control) or were treated with 10 nM HU for the indicated durations (5'-24h). Compared to the untreated control pronounced ERK1/2 phosphorylation was apparent after 5 min (upper panel) that proved to be statistically significant (see ERK1 and ERK2 phosphorylation on the left and right eight columns of the bar diagram, respectively). Reprobing of the membrane for total ERK1/2 served as loading control. Relative protein phosphorylation was determined by the phosphorylated/total ratio. The values shown are mean + S.D. of three independent experiments. \*p < 0.05 vs. Control (two-way ANOVA, Dunnett).

regulating effect of HU in MCF7 cells.

**2. Materials and methods**

*2.1. Reagents*

All chemicals used were purchased from Sigma-Aldrich (a member of Merck Group, Budapest, Hungary) unless otherwise stated. HU was



**Fig. 4.** Dose-dependence of HU-induced ERK phosphorylation by Western blotting. MCF7 cells were left untreated (Control) or treated with the indicated amounts of HU (0.1nM–100nM) for 5 min in an attempt to induce maximal ERK1/2 phosphorylation. The use of both 10 nM and 100 nM final concentrations resulted in robust ERK1 (44 kDa) and ERK2 (42 kDa) phosphorylation (upper panel), also supported by the bar diagram. (see ERK1 and ERK2 phosphorylation on the left and right five columns of the bar diagram, respectively). Subsequent reprobing of the membrane for total ERK1/2 verified the relative amounts of loaded sample across the lanes. Relative protein phosphorylation was determined by the phosphorylated/total ratio. The values shown are mean + S.D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. Control (two-way ANOVA, Dunnett).

dissolved according to the manufacturer's instructions in 10% acetic acid, most applied inhibitors (H89 from Cell Signaling Technology, U0126 and Antalarmin) in DMSO, Astressin 2b in distilled water. In pilot experiments we confirmed that the vehicle of the applied agents had no effect on the examined parameters of the experiments at the high dilutions (DMSO 4000-fold or higher, 10% acetic acid 10 000-fold) used during treatments (not shown).

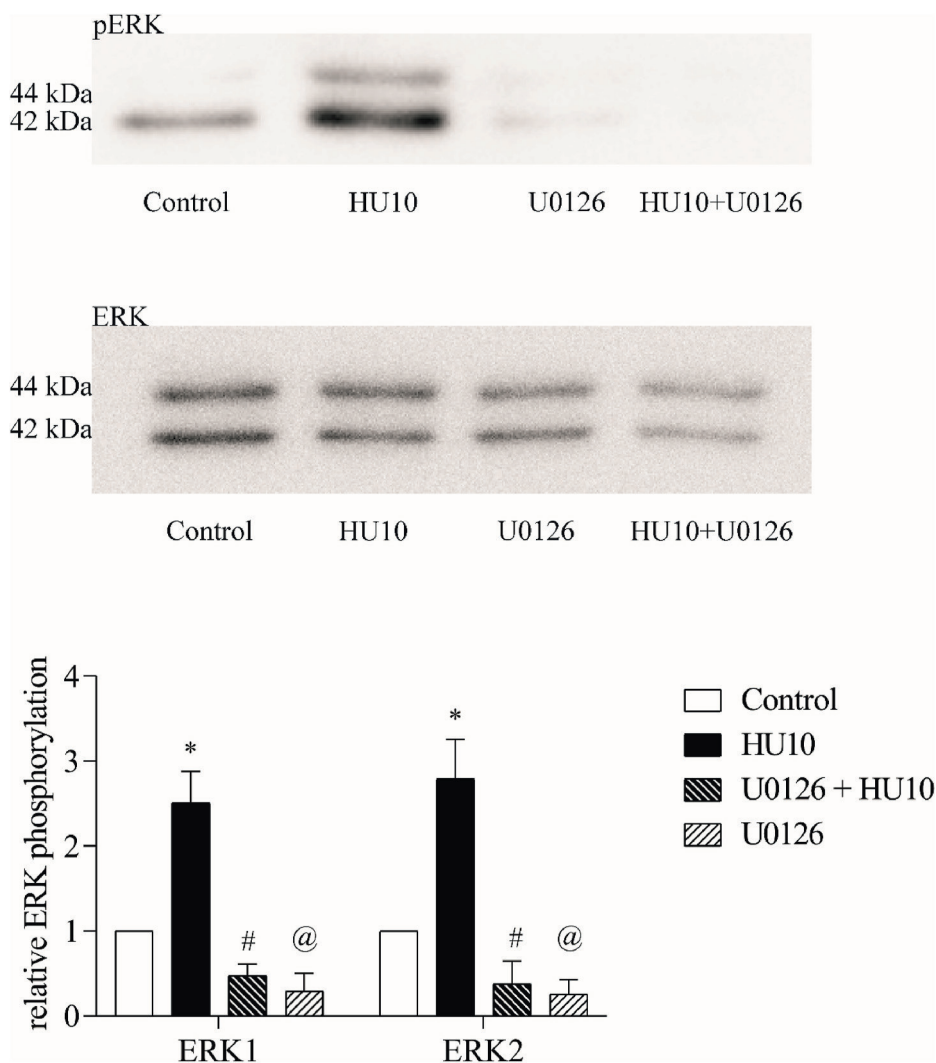
## 2.2. Cell culture

MCF7 human breast carcinoma cells (purchased from ATCC, Virginia, USA and kindly provided by Prof. József Szeberényi at the University of Pécs, Medical School) were regularly cultured on plastic Petri dishes or plastic Thermanox (Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA) coverslips (up to a confluence rate of approximately 50%) in phenol red-containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) complemented with 10% fetal bovine serum for 24 h after plating to achieve sufficient adhesion. The cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. One day before treatments the media were replaced by 0.5% horse serum-containing DMEM in order to silence serum-stimulated mitogenic signaling pathways.

## 2.3. Western blotting

Cultures were treated with 10 nM final concentration of HU for the indicated times or were left untreated as control. Inhibitors were applied were added to culturing media 30 min before the planned termination of treatments at the following final concentrations: U0126 at 20 μM, H89 at 10 μM, Antalarmin at 100 nM, Astressin 2B at 100 nM. Upon completion of treatments the cultures were harvested into ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-base, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EGTA, 1 mM Na-orthovanadate, 5 μM ZnCl<sub>2</sub>, 100 mM NaF, 10 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100) and were frozen for storage. Subsequent processing included thawing and homogenization by vortexing for 20 s, then centrifugation at 13 500×g and at 4 °C followed for 20 min and the protein content of the supernatant was determined (Protein Assay Dye Reagent Concentrate Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Equal amounts of proteins (50 μg) were mixed with 4x Laemmli buffer (25 ml 1M Tris-HCl, pH 6.8, 40 ml glycerol, 8 g SDS, 10 ml 100 mM EDTA, 10 ml 100 mM EGTA and 1 ml 1% bromophenol blue brought up to 100 ml with distilled water), and boiled briefly to denature proteins. The samples were loaded onto 10% polyacrylamide gels and separated according to molecular weight. Electro-blotting onto PVDF membranes (Hybond-P, GE Healthcare, United Kingdom) preceded the immunodetection of proteins. For this





**Fig. 5.** The effect of MEK inhibition onto HU-induced maximal ERK1/2 phosphorylation by Western blotting. Pretreatment of MCF7 cells with the MEK-inhibitor U0126 (at 20  $\mu$ M final concentration started 30 min before and then continued during the last 5 min in the presence of HU10) reduced both untreated baseline (Control) and HU10-induced ERK1 (44 kDa) and ERK2 (42 kDa) phosphorylation (upper panel). Reprobing of the membrane for total ERK1/2 served as loading control. Statistical analysis of the data is shown by the bar charts (ERK1 = left four columns, ERK2 = right four columns). Relative protein phosphorylation was determined by the phosphorylated/total ratio. The values shown are mean + S.D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$  Control vs. HU10, # $p < 0.05$  HU10 vs. U0126 + HU10, @ $p < 0.05$  Control vs. U0126 (two-way ANOVA, Tukey).

purpose we blocked the membrane in 5% nonfat dry milk (or in 3% bovine serum albumin in case of phospho-Akt detection) dissolved in TBS-Tween (10 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20, pH 8.0). The primary antibodies were also diluted in the blocking solution (anti-CRFR1, Fine Biotech, PRC; anti-CRFR2, Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary; phospho-ERK1/2, ERK1/2, pAKT, pRB, E2F-1, Akt and beta-Actin, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA or p53, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 1:1000 and incubated overnight. Methodical controls prepared by the omission of the primary antibodies or the use of non-immune sera of the appropriate species resulted in no signal production as determined in pilot experiments (not shown). Removal of unbound antisera happened by washing five times in TBS-Tween, then incubation of the membranes followed with a horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) dissolved 1:5000 in the blocking solution. Five washes in TBS-Tween removed the unbound antibodies before enhanced chemiluminescence detection of the specific signals (Immobilon Western, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) using a G-box gel documentation system (Syngene, Cambridge, UK). Densitometry was performed with the ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

#### 2.4. Data presentation of Western blots

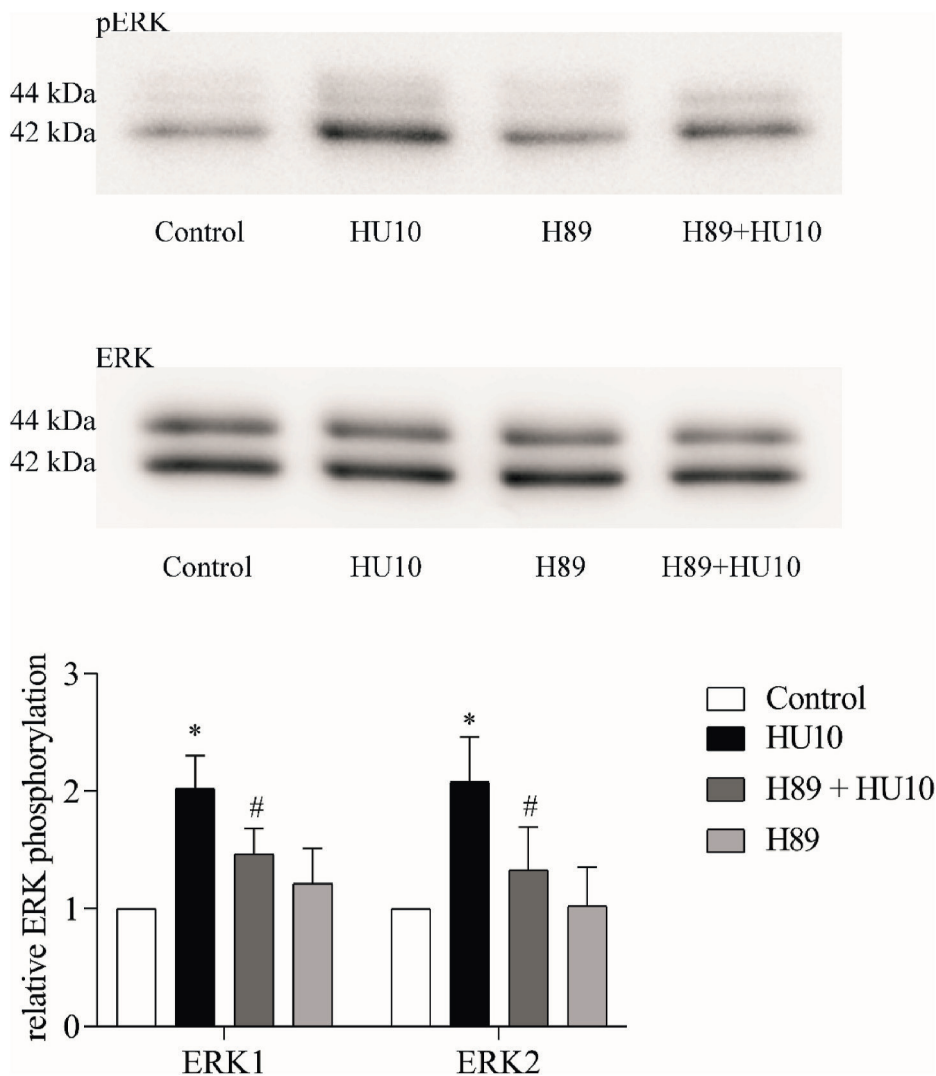
Presented images are representative of series that produced similar

results. Densitometric values are the mean + S.D. for the indicated number of repeats performed

independently. Data were normalized to the mean of the corresponding control group. Significance of differences was determined using one-way (for proteins exhibiting only one isoform and with data that passed the Shapiro-Wilk normality test) or two-way (for proteins exhibiting two isoforms) ANOVA testing applying Tukey (for time-kinetic and dose-response analyses) or Dunnett (in case of treatments with multiple agents at the same time) corrections for multiple samples, as indicated in the figure legends. P values < 0.05 were considered generally as significant. Intensity differences judged as relevant to major findings are marked in the graphs and their corresponding P values are also indicated in the figure legends. All experiments have been repeated at least three times.

#### 2.5. Fluorescence microscopy

Cultures were treated with 10 nM final concentration of HU for the indicated times or were left untreated as control. Treatments were stopped by quickly rinsing in 37  $^{\circ}$ C PBS (1.37 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.43 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.14 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) and then fixing in 4% paraformaldehyde dissolved in PBS, pH 7.4 for 1 h at room temperature. Excess fixative was removed by three changes of PBS followed by three changes of TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl). In order to block nonspecific binding sites the samples were incubated in



**Fig. 6.** The effect of PKA inhibition onto HU-induced maximal ERK1/2 phosphorylation by Western blotting. Pretreatment of MCF7 cells with the PKA-inhibitor H89 (at 10  $\mu$ M final concentration started 30 min before and then continued during the last 5 min in the presence of HU10) reduced HU10-induced ERK1 (44 kDa) and ERK2 (42 kDa) phosphorylation (upper panel). Reprobing of the membrane for total ERK1/2 served as loading control. Statistical analysis of the data is presented by the bar charts (ERK1 = left four columns, ERK2 = right four columns). Relative protein phosphorylation was determined by the phosphorylated/total ratio. The values shown are mean + S.D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$  Control vs. HU10, # $p < 0.05$  HU10 vs. H89 + HU10 (two-way ANOVA, Tukey).

5% nonfat dry milk solubilized in TBS-Triton (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100), at 4 °C for 1 h under continuous gentle rocking. The primary antibodies were diluted in case of anti-CRFR1 (Fine Biotech, PRC) and anti-CRFR2 (Sigma-Aldrich, Hungary) 1:100, in case of phospho-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, USA) 1:300, in the blocking solution and left on the specimens overnight at 4 °C under gentle rocking. After five washes in TBS-Triton the Cy3-conjugated anti-rabbit secondary antibody from Jackson Immuno Research (Cambridgeshire, UK) was pipetted onto the samples at 4 °C for an hour at a dilution of 1:300 for CRFR detection and 1:600 to detect phospho-ERK1/2 in the blocking solution. Using these antibody concentrations the methodical control samples prepared by the omission of the primary antibody or by using nonimmune serum of the appropriate species gave no detectable signal at the applied microscope settings. Nuclei were regularly counterstained using Hoechst 33 342 (Calbiochem, La Jolla, CA).

## 2.6. Data presentation of confocal micrographs

All experiments have been repeated at least three times. Representative micrographs were taken from series with similar results. Confocal imaging was carried out using an Olympus FV-1000 laser scanning system. Single optical sections were captured with a 40 $\times$ , long distance, combined phase contrast and fluorescence objective. Densitometry was performed with the ImageJ software. Raw intensity density

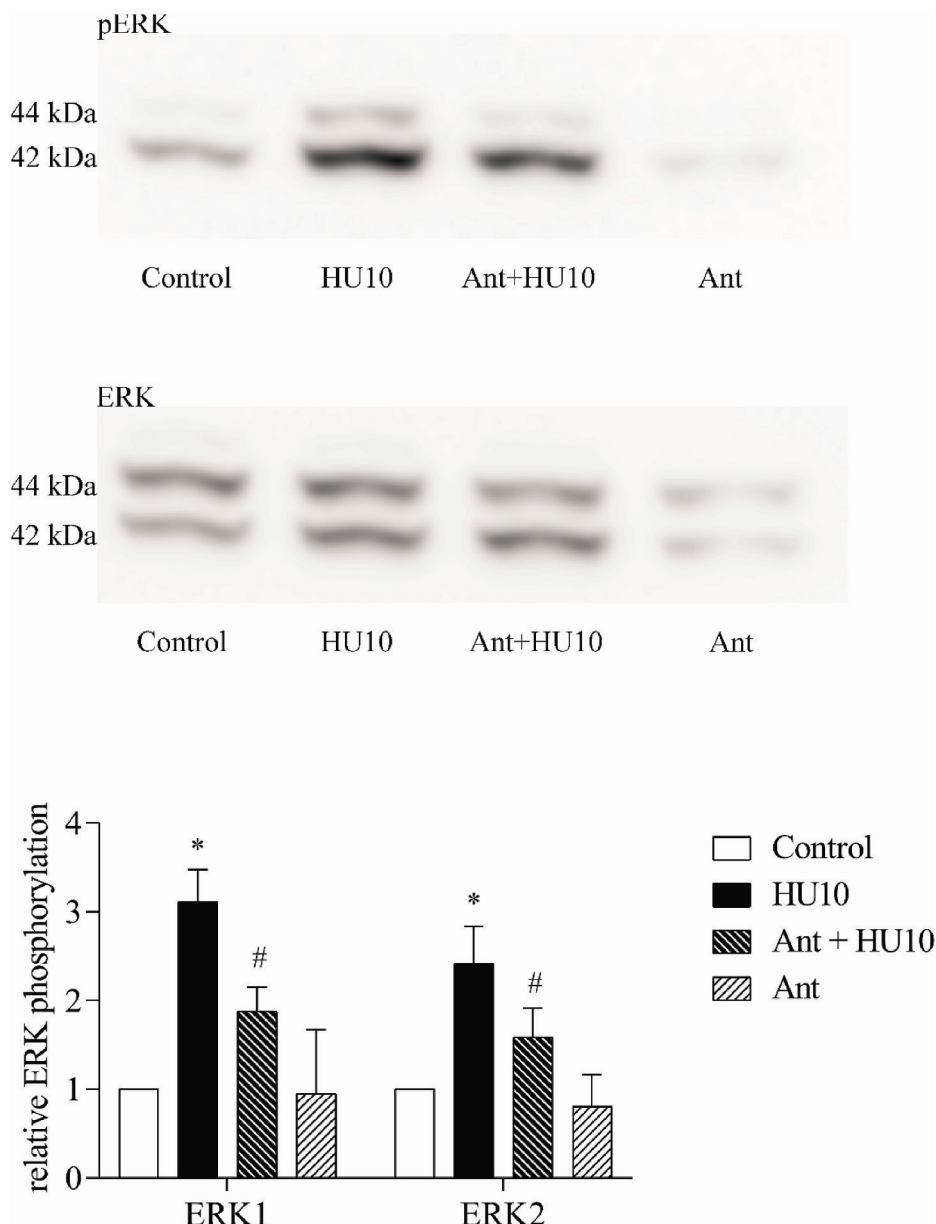
(RawIntDen) of nuclear phospho-ERK1/2 was determined by the sum of pixel intensities in nuclei of the cells. Significance of differences was calculated using Kruskal-Wallis testing applying Dunn correction. P values < 0.05 were considered as statistically significant (as indicated in the figure legend).

## 2.7. CellTiter-Glo 2.0 ATP measurement assay

To determine the number of viable cells in culture based on quantitation of ATP present we used the CellTiter-Glo 2.0 assay (Promega, Madison, Wis., USA). MCF7 cells ( $5 \times 10^2$ ) per well of 96-well plates were cultured as described above and treated with 10 nM final concentration of HU for 24- or 48 h or were left untreated as control. The luminescent signal that is proportional to the amount of ATP present was determined using an ELISA microplate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) following the instructions of the manufacturer.

## 2.8. Data presentation of ATP measurement assay

Experiments were performed in triplicates and repeated at least three times. The results are the mean + S.D. for the independent repeats. Data were normalized to the mean of the corresponding control group. Significance of differences was determined using two-way ANOVA testing applying Tukey corrections. P values < 0.05 were considered as



**Fig. 7.** The effect of CRF receptor inhibitors onto HU-induced ERK1/2 phosphorylation by Western blotting. Pretreatment of MCF7 cells with the specific CRFR1 inhibitor Antalarmin (Ant, at 100 nM final concentration started 30 min before and then continued during the last 5 min in the presence of HU10) reduced HU-induced ERK1 (44 kDa) and ERK2 (42 kDa) phosphorylation (upper panel). Reprobing of the membrane for total ERK1/2 served as loading control. Statistical analysis of the data is demonstrated by the bar charts (ERK1 = left four columns, ERK2 = right four columns). Relative protein phosphorylation was determined by the phosphorylated/total ratio. The values shown are mean + S.D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$  Control vs. HU10, # $p < 0.05$  HU10 vs. Ant + HU10 (two-way ANOVA, Tukey).

statistically significant (as indicated in the figure).

#### 2.9. MTT cell proliferation and viability assay

MCF7 cells were cultured on 96-well plates as described above and treated with 10 nM HU alone, or also with Antalarmin or Astressin 2B for 24 or 48 h. Then 10  $\mu$ l of Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (purchased from Merck) dye solution (5 mg/ml) dissolved in sterile water was pipetted to the cells' medium (100  $\mu$ l/well) and their thermostat incubation continued for an additional 4 h. The supernatant of cells was removed thereafter and the MTT product that accumulated proportional to the cells' metabolic activity was eluted with a 1:1 mixture of 100  $\mu$ l DMSO-ethanol. Absorbance measurement followed at 570 nm using an ELISA microplate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Germany).

#### 2.10. Data presentation of MTT measurement assay

All experiments were performed in triplicates and repeated at least three times. The results are the mean + S.D. for independent repeats.

Significance of differences was determined using one-way ANOVA testing applying Sidak corrections. P values  $< 0.05$  were considered as statistically significant (as indicated in the figure).

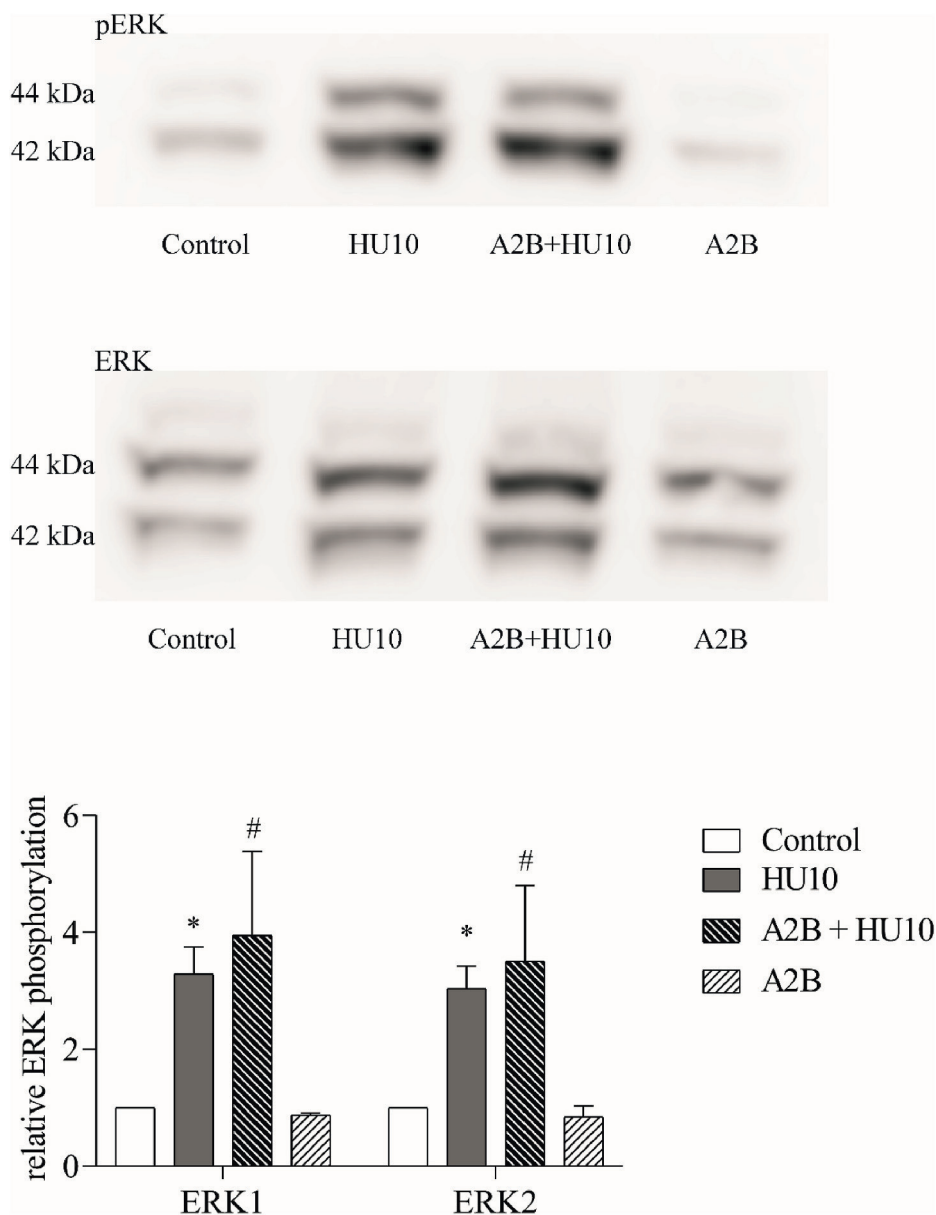
### 3. Results

#### 3.1. Expression of CRF receptors in MCF7 cells

In order to determine the CRFR expression profile of MCF7 cells we performed Western blotting from cell lysates using antisera recognizing the 1 or 2 subtype of CRFR. As shown by Fig. 1, immunoreactivities of both CRFR1 (60 kDa) and CRFR2 (47 kDa) could be detected on Western blots (Fig. 1).

#### 3.2. Localization of CRFR1 and CRFR2 in MCF7 cells

We also examined the cellular localization of CRFR1 and 2 using the same isoform-specific antisera as above and fluorescence labeling of the secondary antibody. As revealed by laser scanning confocal microscopy the distribution of both CRFR immunoreactivities was cytoplasmic with



**Fig. 8.** The effect of CRF receptor inhibitors onto HU-induced ERK1/2 phosphorylation by Western blotting. Pretreatment of MCF7 cells with the specific CRFR2 inhibitor Astressin 2B (A2B, at 100 nM final concentration started 30 min before and then continued during the last 5 min in the presence of HU10) had no effect onto HU10-induced ERK1 (44 kDa) and ERK2 (42 kDa) phosphorylation (upper panel). Reprobing of the membrane for total ERK1/2 served as loading control. Statistical analysis of the data is demonstrated by the bar charts (ERK1 = left four columns, ERK2 = right four columns). Relative protein phosphorylation was determined by the phosphorylated/total ratio. The values shown are mean + S.D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$  Control vs. HU10, # $p < 0.05$  Control vs. A2B + HU10 (two-way ANOVA, Tukey).

maximal intensities towards the periphery and, especially in case of CRFR1, along the plasma membrane (Fig. 2A and B).

### 3.3. The kinetics of ERK1/2 phosphorylation upon HU-treatment of MCF7 cells

In view of its known proliferation-regulating effect, we tested the activating phosphorylation of ERK1/2 by HU in MCF7 cells. Based on experiments, running parallel in other culture systems in our laboratory we adjusted the concentration of HU to 10 nM during treatments. In time-course experiments, HU could induce at this concentration the strongest increase in ERK1/2 phosphorylation 5 min after the start of the treatment. The effect was transient and the signal intensity fell back to around baseline minutes afterwards (Fig. 3).

### 3.4. Dose-dependence of ERK1/2 phosphorylation in MCF7 cells treated with HU

In order to confirm that 10 nM HU was indeed the best choice for the treatment of MCF7 cells we performed dose-response experiments as

well. After 5 min, both 10 and 100 nM concentrations of the ligand could elicit comparably strong increases in ERK1/2 phosphorylation (Fig. 4). Since there was no statistically significant difference between the measured signals induced by 10 nM or 100 nM HU, we applied the lower concentration of the peptide in all subsequent experiments (HU10).

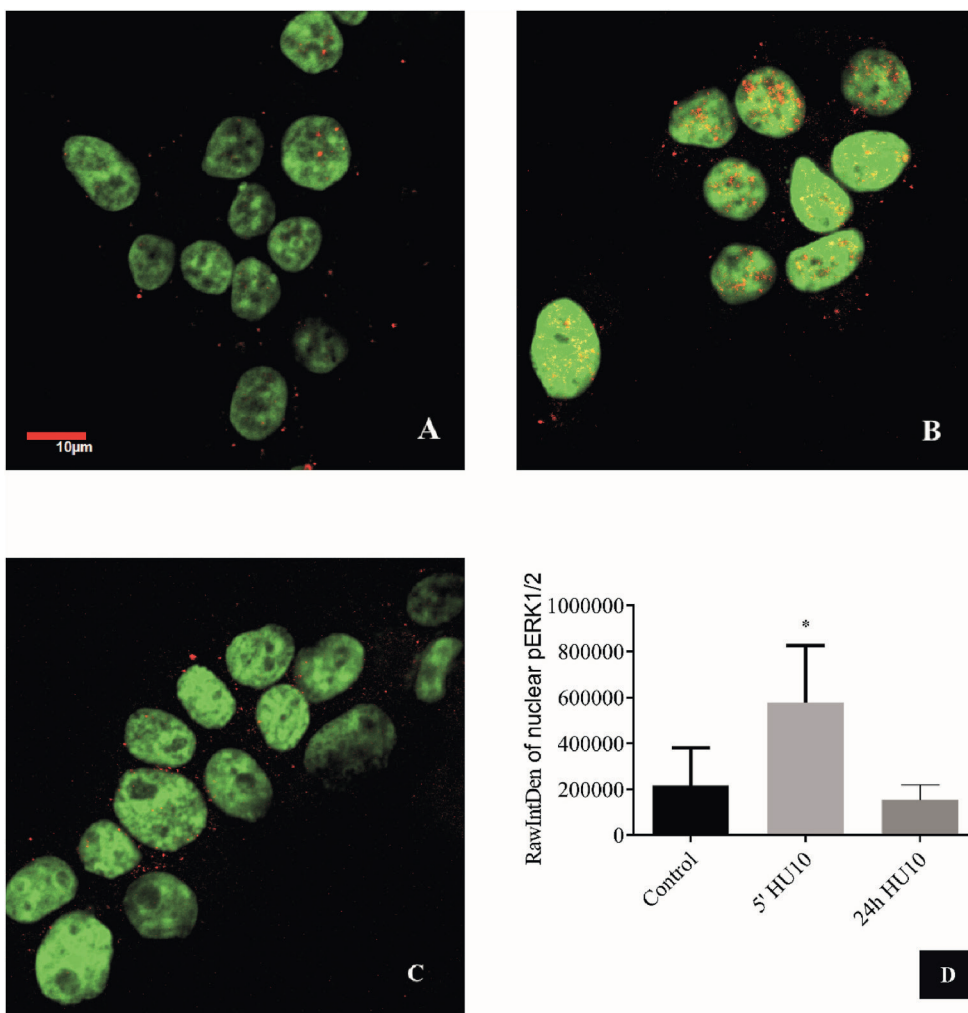
### 3.5. The effect of MEK-inhibition in MCF7 cells treated with HU

Pretreatment of the cultures with U0126 a trusted chemical inhibitor of MEK, the kinase activating ERK1/2, could completely abolish the ERK1/2-phosphorylating effect of HU (Fig. 5). The inhibitor alone could reduce baseline ERK1/2 phosphorylation to below detectable. These observations indicate that MEK plays a pivotal role in HU-induced ERK1/2 phosphorylation in MCF7 cells.

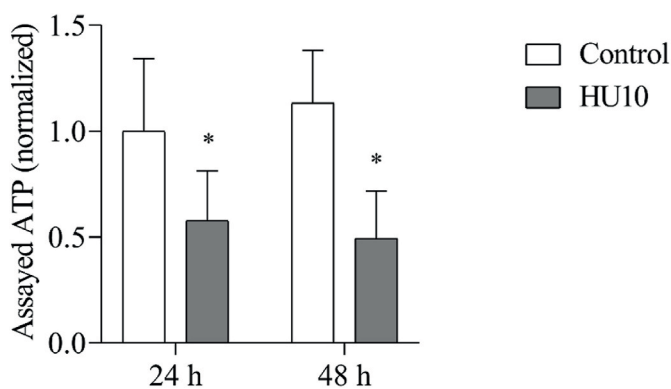
### 3.6. The effect of PKA inhibition on HU-induced ERK1/2 phosphorylation

In order to examine if PKA has a role in HU-induced ERK1/2 activation we chemically inhibited PKA using the compound H89. In





**Fig. 9.** Intracellular localization of phosphorylated ERK1/2 by immunofluorescence and laser scanning confocal microscopy in MCF7 cells. Hoechst-stained nuclei appear via the green channel. **A:** weak baseline phospho-ERK1/2 (pERK1/2) signal (red) mostly in the cytoplasm of untreated control MCF7 cells. **B:** elevated pERK1/2 signal in the cytoplasm (red) and also in nuclei (red or red over green = yellow) after 5 min in the presence of 10 nM HU. **C:** pERK1/2 signal with cytoplasmic predominance after 24 h of 10 nM HU-treatment. Omission of the primary antibody or the use of non-immune IgG resulted in the complete lack of the immune signal (not shown) at the applied microscope settings. The scale bar (in panel A) applies to all three micrographs. The images are representative of three independently repeated experiments. **D:** Statistical evaluation of nuclear pERK1/2 intensities comparing samples A, B and C. RawIntDen = Raw Intensity Density. \* $p < 0.05$  vs. Control (Kruskal-Wallis test + Dunn). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)



**Fig. 10.** The effect of HU onto ATP production of MCF7 cells. The presence of HU10 could markedly reduce the ATP production of MCF7 cells during the time between regular changes of culturing media (up to 48 h) as measured by the CellTiter-Glo 2.0 ATP assay. The values shown are mean + S.D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. Control at indicated times (two-way ANOVA, Tukey).

presence of the PKA-inhibitor HU-induced phosphorylation of ERK1/2 was markedly reduced compared to that induced with HU alone (Fig. 6) and showed no statistically significant difference compared to the untreated control.

### 3.7. Selective inhibition of CRF receptors 1 and 2

In order to examine the contribution of the two CRF receptor isoforms to HU-induced ERK1/2 phosphorylation we used selective chemical inhibitors. The CRFR1-specific inhibitor Antalarmin (Ant) could markedly reduce ERK1/2 activation by HU (Fig. 7).

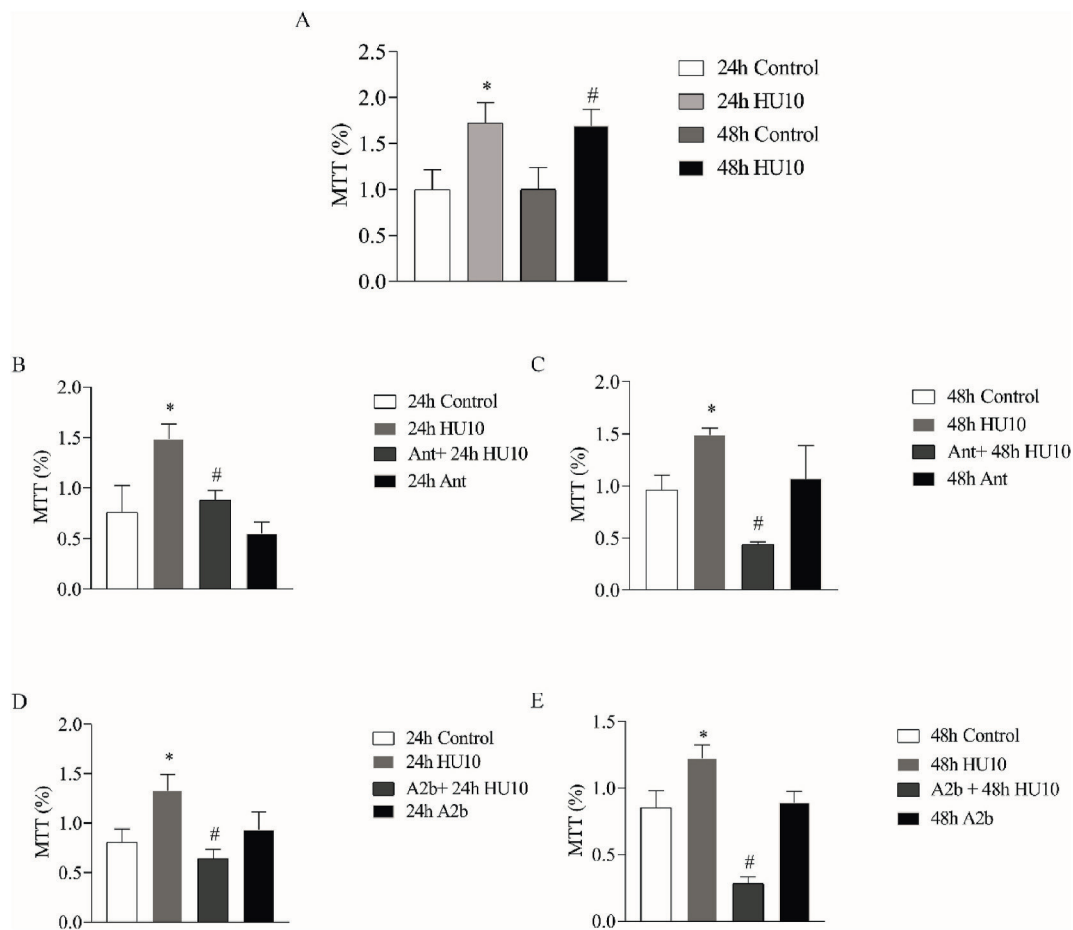
At the same time, HU could induce ERK1/2 phosphorylation just as well in the presence of Astressin2B (A2B) – a selective CRFR2 inhibitor – as without receptor inhibition (Fig. 8).

### 3.8. Intracellular localization of phosphorylated ERK1/2 in MCF7 cells treated with HU

By means of immunofluorescence and laser scanning confocal microscopy, we investigated the intracellular localization of phosphorylated ERK1/2. In untreated MCF7 cells, weak phospho-ERK signal was detected in the cytoplasm (Fig. 9A). Five minutes after the start of HU10-treatment the signal intensity became noticeably stronger and it appeared in nuclei as well (Fig. 9B). By the end of the treatment day, just like on Western blots, ERK1/2 phosphorylation has fallen back to around baseline and its localization was again cytoplasmic (Fig. 9C).

### 3.9. ATP measurement of MCF7 cells in the presence and absence of HU

In order to examine whether HU had any effect onto the ATP production of MCF7 cells we kept cultures between changes of media - up to 48 h that is - in their regular culturing medium or in medium



**Fig. 11.** Elevated MTT measurements of MCF7 cells in the presence of HU10 and its blockade with specific CRFR1 and 2 inhibitors. Significant increases of MTT production of MCF7 cells was detected in the presence of HU10 after both 24 and 48 h in the presence of the peptide compared to the untreated control (panel A). This effect of HU10 could be antagonized with Antalarmin (Ant) and Astressin 2B (A2b), chemical inhibitors of CRFR1 and 2, respectively, at both time settings (after 24 h with Antalarmin (panel B) or Astressin 2B (panel D) and after 48 h with Antalarmin (panel C) or Astressin 2B (panel E)). The values shown are mean + S.D. of three independent experiments. Panel A: \* $p < 0.05$  24h Control vs. 24h HU10, # $p < 0.05$  48h Control vs. 48h HU10; Panel B: \* $p < 0.05$  24h Control vs. 24h HU10, # $p < 0.05$  24h HU10 vs. Ant+24h HU10; Panel C: \* $p < 0.05$  48h Control vs. 48h HU10, # $p < 0.05$  48h HU10 vs. Ant+48h HU10; Panel D: \* $p < 0.05$  24h Control vs. 24h HU10; # $p < 0.05$  24h HU10 vs. A2b+24h HU10; Panel E: \* $p < 0.05$  48h Control vs. 48h HU10; # $p < 0.05$  48h HU10 vs. A2b+48h HU10 (one-way ANOVA, Sidak).

supplemented with HU10. In presence of the peptide at the indicated concentration, a significant reduction in ATP production was measured by the applied assay when compared to values without HU-treatment (Fig. 10). Addition of Antalarmin or Astressin 2B, specific inhibitors of CRFR1 and 2, respectively, didn't have an effect onto urocortin's ability to inhibit ATP production of MCF7 cells (not shown).

### 3.10. HU increases MTT measurement in MCF7 cells

Additional assessing of cell viability was performed using MTT assay. Statistically significant elevations of MTT production by MCF7 cells was measured in the presence of HU10 both after 24 and 48 h of culturing when compared to the values of untreated MCF7 cells. Moreover, this effect of HU10 could be effectively prevented at both time points using either Antalarmin or Astressin 2B, chemical inhibitors of CRFR1 and 2, respectively (Fig. 11.)

### 3.11. HU increases the level of p53 in MCF7 cells

In an attempt to relate the observed metabolic activity changes of the cultures to possible changes in cell proliferation, next we examined cell cycle regulatory proteins like the expression of p53 as a function of HU-treatment in MCF7 cells. 10 nM HU has elicited a significant increase in

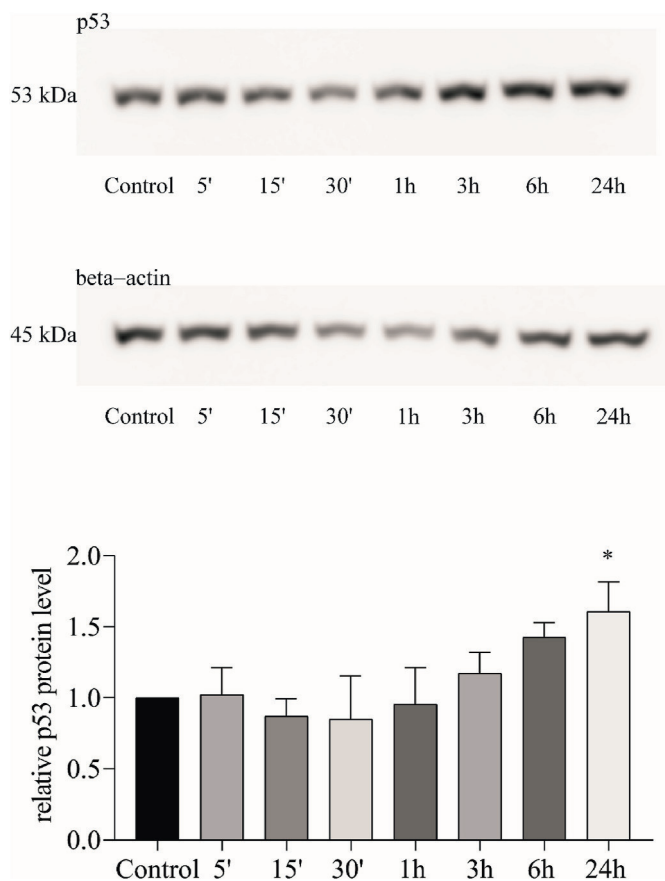
the level of p53 protein by the end of the treatment day (Fig. 12). An effect of the CRH receptor inhibitors Antalarmin and Astressin 2B onto urocortin-induced p53 expression, however, we could not detect (data not shown).

### 3.12. HU induces phosphorylation of the retinoblastoma protein

Phosphorylation (at Serine 795) of the other key cell cycle regulatory protein retinoblastoma (Rb) was also significantly increased in the presence of HU10 by the end of the 48 h long culturing period of MCF7 cells compared to the untreated control. This effect of HU10 could be blocked with the MEK inhibitor U0126 or after inhibiting PKA with H89 (Fig. 13.).

### 3.13. HU induces expression of E2F-1

Expression of the S-phase gene-activating transcription factor E2F-1 was also increased by HU10 after 48 h in the presence of the peptide. The MEK inhibitor U0126 and also H89 - the latter inhibiting PKA - could both block this effect of HU10 (Fig. 14.).



**Fig. 12.** The effect of HU at the indicated times onto the expression of p53 protein by Western blotting. A marked increase in p53 protein expression was apparent in the presence of HU10 by the end of the first day. Relative p53 protein level was determined as the ratio of beta-actin. The values shown are mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. Control (one-way ANOVA, Dunnett).

### 3.14. HU doesn't increase the apoptosis of MCF7 cells

To check the possible involvement of increased apoptosis behind reduced ATP production of cultures in the presence of HU10 we tested several potential candidate proteins (eg. caspases 3 and 8, Bax, Bad) by Western blotting and also the nuclear morphology of MCF7 cells by laser scanning confocal microscopy following the fluorescent staining of nuclei. In none of these experiments could we reveal any statistically significant difference in the expression or activity of the listed proteins or in the morphology of cell nuclei in the presence of HU10 versus the untreated controls (data not shown).

### 3.15. HU increases the phosphorylation of PKB/Akt in MCF7 cells

We also examined the activating phosphorylation of the key cell survival-signaling component PKB/Akt. HU10 induced the prolonged phosphorylation of PKB/Akt that peaked at 3 h and returned only gradually to baseline afterwards (Fig. 15).

## 4. Discussion

UCNs are central regulators of food uptake and stress-coping (Reul and Holsboer, 2002), while being overweight and overstressed are both known risk factors in human tumorigenesis, including the development of breast cancer. Peptides of the CRF-family are present in all major organs of higher vertebrates where they can exert local effects. After the discovery of UCNs and their receptors' expression in various tumors, the

possible role of this peptide as a tumor regulator has become the interest of several laboratories (Arcuri et al., 2002; Florio et al., 2006; Kaprara et al., 2010a, 2010b; Wang and Li, 2007).

The effects of CRF on tumor cells depend on cell and tissue type, which in turn determines the expression of specific CRF receptor isoforms. CRF receptor signaling via MAP kinase cascades involving ERK1/2 was observed in neuronal, cardiac, and myometrial cells, as well as in recombinant expression systems (Brar et al., 2004a; 2004b). G $\alpha$ i- and G $\alpha$ o-proteins, PI3-K and PKB/Akt and Raf-1 can all participate in ERK1/2 activation (Brar et al., 2004a; 2004b; Punnett et al., 2006) that might also involve cAMP-activated EPAC signaling (Markovic et al., 2011; Van Kolen et al., 2010).

Regarding UCN signaling, the activation of MAPK isoforms, including ERK1/2 and p38 MAPK was detected upon stimulation of CRFRs in connection with cardio-protection (Brar et al., 2004a). Similar effects were described during adaptation to stress (Sananbenesi et al., 2003) or as part of mechanisms serving neuroprotection (Elliott-Hunt et al., 2002; Pedersen et al., 2002), and in the regulation of apoptosis (Dermitzaki et al., 2002; Radulovic et al., 2003). Upon receptor overexpression in HEK293 cells (Markovic et al., 2008; Punnett et al., 2006) sustained ERK1/2 phosphorylation was measured via CRFR1 activation, but downstream of CRFR2 the kinases' activation was transient and the enzymes accumulated both in the nucleus and the cytoplasm. Activation of ERK1/2 could also be elicited by treatments with saquinavir in CHO cells transfected with CRF-Receptor expressing constructs (Rossant et al., 1999) or in pregnant human myometrium following UCN treatment (Papadopoulou et al., 2004).

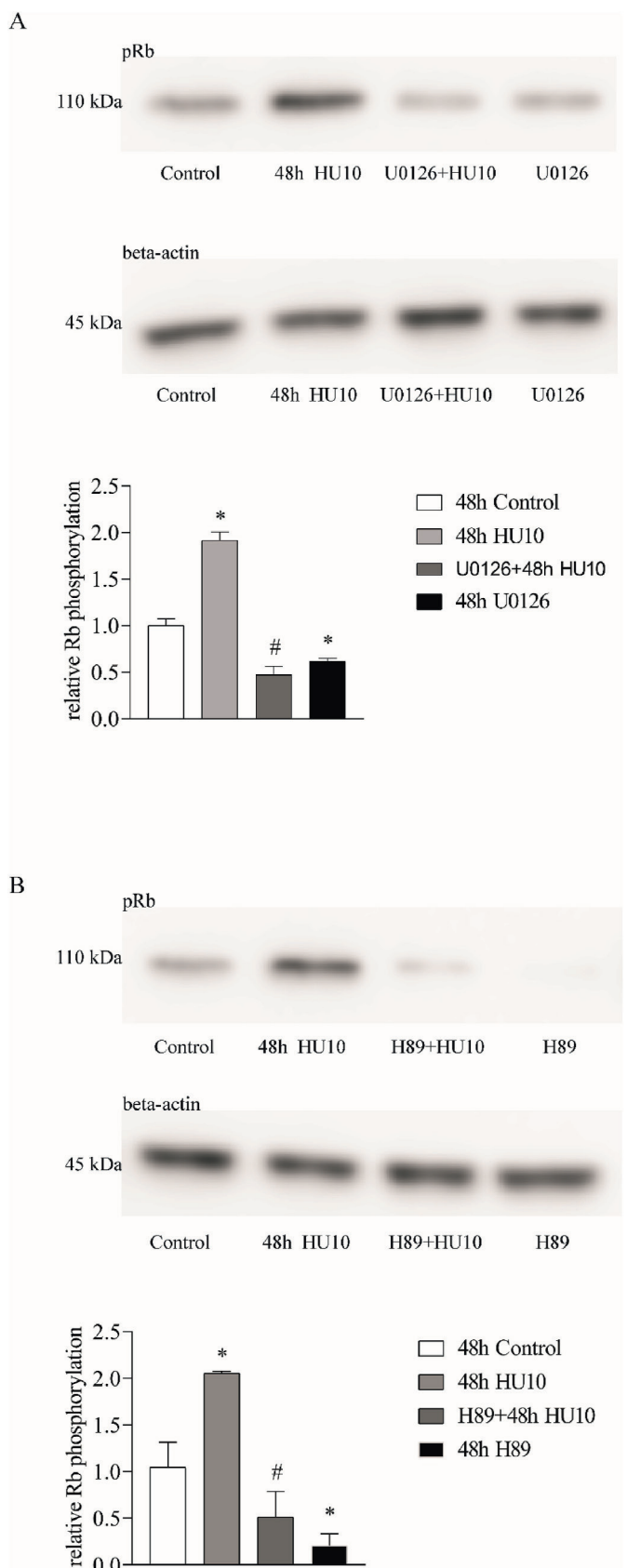
In our experiments HU could elicit a fairly rapid and transient activation of the mitogen-activated protein kinases ERK1/2 peaking at 5 min. Pretreatment with U0126 could completely abolish the ERK1/2-phosphorylating effect of HU and it reduced baseline ERK1/2 phosphorylation too, indicating the central role of MEK in HU-induced ERK1/2 activation.

Transient ERK1/2 activation is related to increased cell proliferation in PC12 cells, for example (Marshall, 1995).

Graziani and colleagues have reported the inhibition of cell growth in human endometrial adenocarcinoma cells (Graziani et al., 2002) (via activation of cAMP-PKA) and that of estradiol-induced cell proliferation in MCF7 cells (Graziani et al., 2007) both upon CRF administration and under the mediation of CRFR1. In the work of Carlson and colleagues (Carlson et al., 2001) CRH and various analogs of it, inhibited the proliferation of cultured Cloudman melanoma cells, and the growth of B16 melanoma tumor *in vivo*, apparently by the activation of CRH1 receptors and altered Ca<sup>2+</sup> signaling. Androulidaki and co-workers found that CRF inhibited both MCF7 cell proliferation and apoptosis (Androulidaki et al., 2009). According to the studies of Jin et al. (2015) urocortin, by activating CRFR1 and -2, may inhibit breast cancer progression stimulated by TGF $\beta$ 1, while inhibited growth and vascular permeability together with antiproliferative and differentiative effects of CRF mediated by the CRFR was found in W256 rat mammary carcinoma (Tjuvajev et al., 1998). On the other hand, the promotion of tumor cell proliferation by CRF and CRFR1 was reported by Minas et al. (2007), a trend also observed earlier in melanoma by Sato and colleagues (Sato et al., 2002).

In our current study HU induced transient ERK1/2 activation in MCF7 cells. Fluorescence microscopic detection of phosphorylated ERK1/2 revealed the nuclear translocation of ERK1/2 during peak activation of the enzyme by HU. Cytoplasmic ERK1/2 localization is related to increased cell proliferation while nuclear translocated ERK1/2 induces differentiation and slows cell division down in PC12 cells (Marshall, 1995).

The involvement of PKA in UCN signaling is diverse. While in some cellular systems ERK1/2 phosphorylation initiated from CRFRs requires the activity of the cAMP/PKA cascade (Elliott-Hunt et al., 2002; Kovalovsky et al., 2002), in others PKA inhibits ERK1/2 activation (Grammatopoulos et al., 2000; Graziani et al., 2002, 2007; Papadopoulou



(caption on next column)

**Fig. 13.** Phosphorylation (at Serine 795) of the retinoblastoma protein (pRb) in the presence of HU10 by Western blotting. Increased phosphorylation of the Rb-protein (upper blots of panels A and B) could be detected at the end of the 48-h long culturing period in MCF7 cells kept in media supplemented with HU10 compared to untreated controls. The effect of HU10 could be blocked with the MEK inhibitor compound U0126 (panel A) or after inhibiting PKA with its chemical blocker H89 (panel B). Relative intensities are presented by the bar charts. Reprobing of the membranes for beta actin served as loading control. The values shown are mean + S.D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  48h HU10 vs. U0126 + 48h HU10, vs. H89 + 48h HU10 (one-way ANOVA, Tukey).

et al., 2004). Cells that express beta-adrenergic receptors also require its phosphorylation by PKA in order to couple the receptor to its G-protein and then activate ERK (Daaka et al., 1997).

In our experiments chemical inhibition of PKA with H89 could significantly reduce the ability of HU to stimulate ERK1/2 phosphorylation in MCF7 cells indicating the requirement of PKA activity behind the observed induction of ERK1/2 phosphorylation.

The expression of both CRF and CRFR1 mRNA together with the antiproliferative effect of the ligand was documented in MCF7 cells (Graziani et al., 2007). UCN and CRF can inhibit directly the growth of tumor cells via CRFR1, as also summarized in the review article of Wang and Li (2007). Using polyclonal antibodies Koureta et al. (2020) could demonstrate the presence of CRFR2 in MCF7 cells. By means of Western blotting and immunofluorescence confocal microscopy, we could detect both CRFR1 and 2 immunoreactivities in MCF7 cells using commercially available polyclonal antisera.

Pretreating MCF7 cells with Antalarmin, a selective inhibitor of CRFR1 has led to a significant decrease in ERK1/2 phosphorylation elicited by HU-treatment. After similar inhibition of CRFR2 using Astressin 2B we could experience no such effect. These data underline the importance of CRFR1 in the ERK1/2 phosphorylation-inducing effect of HU in MCF7 cells.

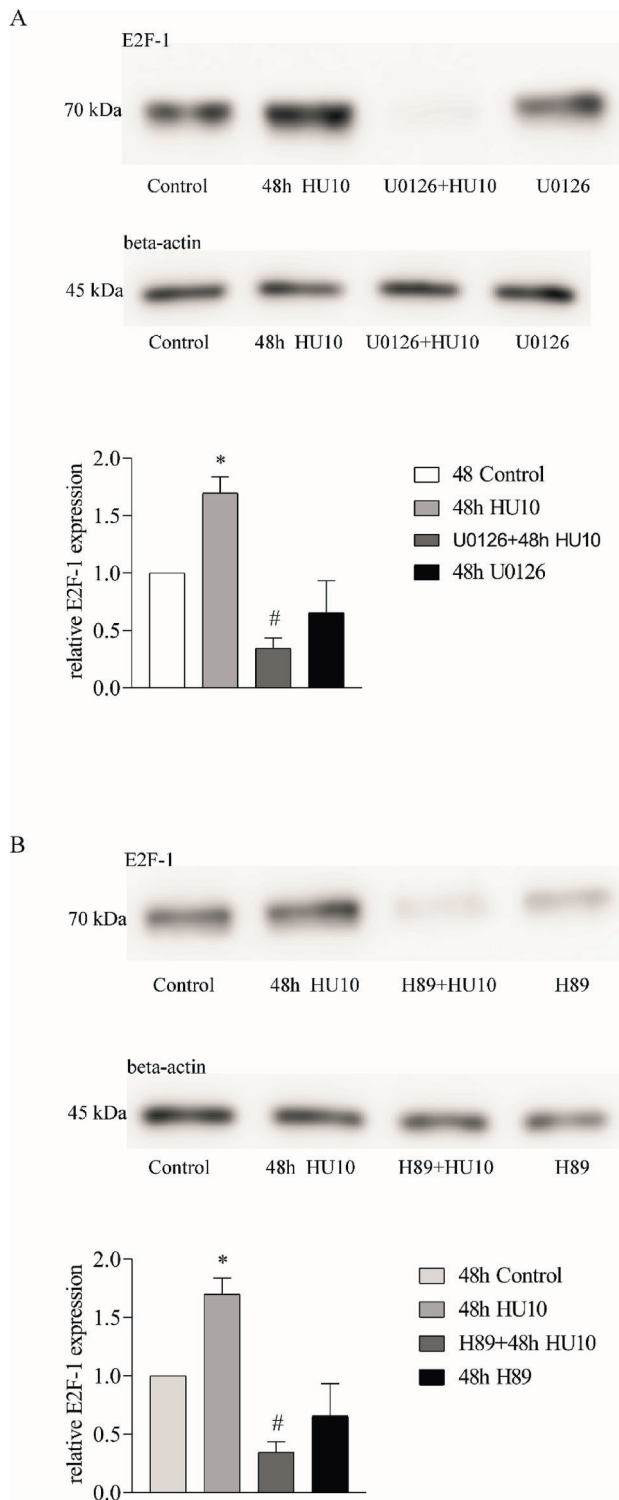
We examined the effect of HU10 treatment onto the number of live cells via two different approaches, by ATP measurement or using the MTT tetrazolium compound. When measuring ATP with the CellTiter-Glo 2.0 ATP assay HU10 could significantly reduce the formation of the nucleotide, either after 24 or after 48 h of MCF7 cell culturing. This effect of HU10, however, wasn't blocked by Antalarmin or Astressin 2B, chemical antagonists of CRFR1 and 2, respectively. The CRFR inhibitors' lacking effect is arguing in this regard against a specific, receptor-mediated mechanism.

Measuring the production of the MTT tetrazolium compound, on the other hand, showed significant increases in the presence of HU10 after 24 and 48 h and could be inhibited with Antalarmin or Astressin 2B, specific chemical inhibitors of CRFR1 and 2, respectively. MTT production of cells is regarded as an indicator of the number of healthy, live cells. Based on our MTT measurement and its dependence on intact CRFR1 and 2 function we conclude that the presence of HU10 increased the number of live MCF7 cells at the assayed 24 and 48 h time points via CRFR1 and 2.

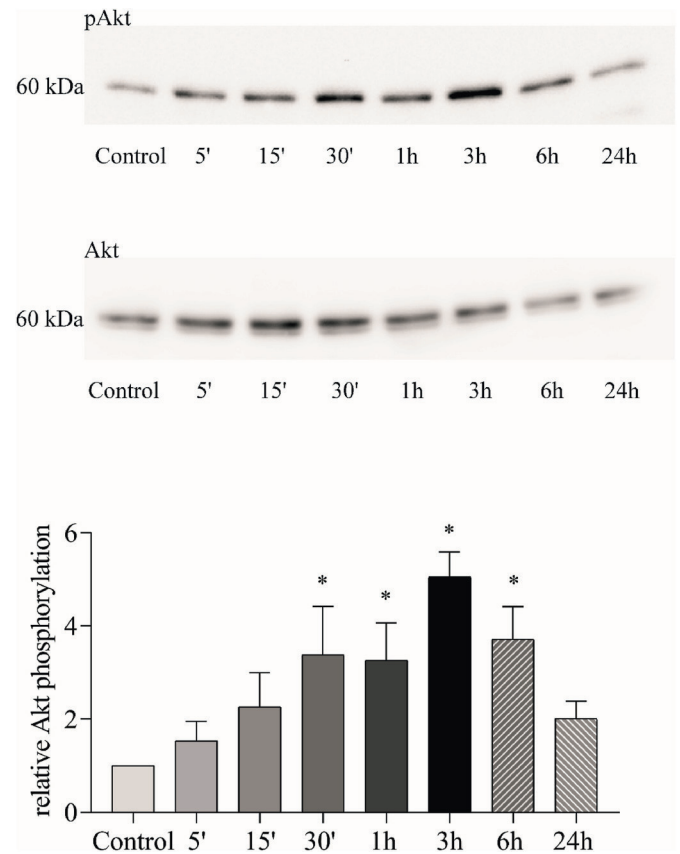
In an attempt to identify molecular components that could lead to the increased number of MCF7 cells in the presence of urocortin we performed Western blotting of cell cycle regulatory proteins. Along this line of experiments we could identify increased phosphorylation of the retinoblastoma protein and an elevated expression of the S-phase gene transcription factor E2F-1. Both phenomena could be blocked with the MEK inhibitor U0126 or with H89 a chemical inhibitor of PKA suggesting the involvement of these enzymes in the signaling process elicited by urocortin.

Reducing the amount of serum is routine procedure during studies addressing cell signaling but it also raises the possibility of increased cell death. In addition, the work of Dermitzaki and colleagues reported that CRF exposure favored apoptosis in rat pheochromocytoma PC12 cells (Dermitzaki et al., 2002) and it acted similarly in macrophages too





**Fig. 14.** Increased expression of E2F-1 protein upon HU10 treatment detected by Western blotting. Enhanced expression of E2F-1 protein (panel A and B, upper blots) was measured in MCF7 cells after 48 h in the presence of HU10 compared to the untreated control. This effect of HU10 was circumvented by the MEK inhibitor compound U0126 (panel A) or by blocking PKA with its chemical inhibitor H89 (panel B). Relative intensities are presented by the bar charts. Reprobing of the membranes for beta actin served as loading control. The values shown are mean + S.D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. Control, # $p < 0.05$  48h HU10 vs. U0126 + 48h HU10, vs. H89 + 48h HU10 (one-way ANOVA, Tukey).



**Fig. 15.** Time kinetics of HU-induced PKB/Akt phosphorylation in MCF7 cells by Western blotting. Prolonged phosphorylation of the kinase reaching its maximum at 3 h then decreasing gradually was apparent in the presence of 10 nM HU (upper panel). Relative intensities are shown by the bar chart. Statistical analyses gave evidence of significant PKB/Akt activation compared to the untreated control (Control) between 30 min and 6 h. Reprobing of the membrane for total Akt served as loading control. Relative protein phosphorylation was determined by the phosphorylated/total ratio. The values shown are mean + S. D. of three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. Control (one-way ANOVA, Dunnett).

(Tsatsanis et al., 2005). In experiments of Jin and colleagues CRF, the main ligand of CRFR1 similarly induced apoptosis in the RM-1 mouse prostate cancer cell line and in LNCaP human prostate cancer cells by regulating critical Bax and Bad protein levels while UCN2 acting preferentially via CRFR2 had the opposite effect (Jin et al., 2011). UCNs can also exert a protective effect in the human stomach by inhibiting apoptosis, as suggested by Chatzaki and colleagues (Chatzaki et al., 2006). Other studies have given account of only transient inhibition of programmed cell death by CRF (Androulidaki et al., 2009). In the human gastric cancer AGS cell line CRF and UCNs all worked against programmed cell death (Chatzaki et al., 2006). In Y79 retinoblastoma cells CRF suppressed apoptosis by the downregulation of pro-caspase-3 cleavage and activation and it also inhibited programmed cell death in neuroblastoma (Radulovic et al., 2003).

In view of the available literature data, we decided to assess the expression of p53 protein, the pivotal regulator of cell proliferation and survival in HU-treated MCF7 cells. Western blots showed significantly increased p53 protein levels after 24 h in the presence of HU. An effect of the specific CRFR antagonists Antalarmin or Astressin 2B onto increased p53 expression in the presence of urocortin, nevertheless, couldn't be detected (data not shown) questioning again a specific, CRF receptor-mediated mechanism. At the same time, none of the examined caspases (3 and 8) and other pro-apoptotic proteins (eg. Bax and Bad) showed significantly altered activity or expression levels when

measured by means of Western immunoblotting in lysates of HU-treated MCF7 cells. The proportion of cells displaying apoptotic morphology did not change either when examined by nuclear staining and fluorescence confocal microscopy (the latter Western blot and confocal fluorescence microscopic data without statistically significant alterations are not shown).

The activating phosphorylation of cell survival-promoting PKB/Akt, at the same time, was elevated reaching its maximum 3 h after the addition of HU to MCF7 cultures. Activation of PI3K - the kinase upstream of PKB/Akt - was reported earlier in various cell systems via either CRFR1 (Punn et al., 2006) or 2 (Chandras et al., 2009). Increased PKB/Akt phosphorylation in the presence of urocortin is in support of better MCF7 cell survival with urocortin in the culturing medium.

## 5. Conclusions

In summary our data show the presence of both CRFR1 and CRFR2 immunoreactivities in MCF7 cells' cytoplasm with maximal signal intensities towards the plasma membrane when detected with isoform-specific antisera. We demonstrated that HU-treatment of MCF7 cells induced transient phosphorylation of ERK1/2 accompanied by nuclear translocation of the enzyme. This effect of HU was initiated via CRFR1 - depended also on the activity of PKA - and was mediated by MEK towards ERK1/2. The same HU-treatment increased the overall expression of p53 and reduced ATP production of MCF7 cells. CRF receptor dependence of these latter alterations, however, couldn't be supported experimentally. Increased MTT production of MCF7 cells, the stimulation of Rb phosphorylation and E2F-1 expression by urocortin, on the other hand are all in support of increased cell proliferation in the presence of the peptide. The reduction of urocortin-induced Rb phosphorylation and that of E2F-1 expression by the MEK inhibitor compound indicates the participation of the ERK1/2 pathway in these processes while the inhibitory effect of H89 is suggestive of the involvement of PKA. Stimulated phosphorylation of PKB/Akt is in favor of increased cell survival while the induction of p53 might be indicative of increased cellular stress eventually leading to reduced ATP production. Elevated measurements with the MTT assay in the presence of HU10, however, are supportive of overall increased MCF7 cell proliferation, an effect that could be prevented by CRFR1- or 2-specific inhibitors, which in turn indicates the involvement of both receptors in this action of urocortin. As for the detailed signaling mechanism in the background, our data support the role of a pathway via CRFR1 and MEK-ERK1/2 but we can't exclude the possibility of additional signaling routes initiated by CRFR1. Moreover, in view of Astressin 2B's effect onto the urocortin-induced MTT production we must assume the participation of signals originating from CRFR2 in this process as well. Finally, elevated phosphorylation of PKB/Akt in the presence of urocortin is also in favor of increased cell survival.

In view of the possible involvement of UCNs at so many levels of human cancer regulation, it is tempting to entertain the possible development of agonists and/or antagonists that could selectively interfere at specific points with the cancer promoting or anti-cancer properties of UCNs. We believe that our experimental data contribute to the better understanding of how UCNs exert their signaling and cell cycle-regulating effects.

## Funding support

This work was supported by project no. TKP2020-IKA-08 that has been implemented with the support provided from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme. Additional funding support was provided by AOK-KA-2021-31 to György Sétáló, Jr. The purchase of the Olympus FV-1000 laser scanning confocal system was supported by grant GVOP-3.2.1-2004-04-0172/3.0 to the University of Pécs. The funding sources had no involvement in study design; in the

collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

## Declaration of competing interest

The authors have no conflict of interest to declare.

## CRediT authorship contribution statement

**Bálint Balogh:** cell culturing and treatments, Investigation, using Western blots, ATP and MTT assay, confocal microscopy, Methodology, Validation, Formal analysis, Visualization, reviewing and editing text. **Mónika Vecsernyés:** cell culturing and treatments, Investigation, using Western blots, Visualization. **Apor Veres-Székely:** Formal analysis, reviewing and editing text. **Gergely Berta:** Validation, and formal analysis of confocal data, Visualization. **Alexandra Stayer-Harci:** Methodology, of inhibitors, reviewing and editing text. **Oktávia Tarjányi:** reviewing and editing text. **György Sétáló:** Conceptualization, Resources, Methodology, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Investigation, using confocal microscopy, Writing – original draft, reviewing and editing text.

## References

- Androulidaki, A., Dermizaki, E., Venihaki, M., Karagianni, E., Rassouli, O., Andrekou, E., Stournaras, C., Margioris, A.N., Tsatsanis, C., 2009. Corticotropin Releasing Factor promotes breast cancer cell motility and invasiveness. *Mol. Cancer Jun 2 (8)*, 30. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-30>.
- Arcuri, F., Cintonino, M., Florio, P., Floccari, F., Pergola, L., Romagnoli, R., Petraglia, F., Tosi, P., Teresa Del Vecchio, M., 2002. Expression of urocortin mRNA and peptide in the human prostate and in prostatic adenocarcinoma. *Prostate 52*, 167–172. <https://doi.org/10.1002/pros.10094>.
- Battaglia, G., Webster, E.L., De Souza, E.B., 1987. Characterization of corticotropin-releasing factor receptor-mediated adenylate cyclase activity in the rat central nervous system. *Synapse 1 (6)*, 572–581. <https://doi.org/10.1002/syn.890010610>.
- Behan, D.P., De Souza, E.B., Potter, E., Sawchenko, P., Lowry, P.J., Vale, W.W., 1996. Modulatory actions of corticotropin-releasing factor-binding protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci. Mar 22 (780)*, 81–95. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb15113.x>. Review.
- Boorse, G.C., Denver, R.J., 2006. Widespread tissue distribution and diverse functions of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Gen. Comp. Endocrinol. Mar 146 (1)*, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.11.014>. Epub 2006 Jan 18.
- Brar, B.K., Jonassen, A.K., Egorina, E.M., Chen, A., Negro, A., Perrin, M.H., Mjøs, O.D., Latchman, D.S., Lee, K.F., Vale, W., 2004a. Urocortin-II and urocortin-III are cardioprotective against ischemia reperfusion injury: an essential endogenous cardioprotective role for corticotropin releasing factor receptor type 2 in the murine heart. *discussion 21-3 Endocrinology. Jan 145 (1)*, 24–35. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0689>. Epub 2003 Sep 11. PMID: 12970163.
- Brar, B.K., Chen, A., Perrin, M.H., Vale, W., 2004b. Specificity and regulation of extracellularly regulated kinase1/2 phosphorylation through corticotropin-releasing factor (CRF) receptors 1 and 2beta by the CRF/urocortin family of peptides. *Endocrinology. Apr 145 (4)*, 1718–1729. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1023>. Epub 2003 Dec 11.
- Carlson, K.W., Nawy, S.S., Wei, E.T., Sadée, W., Filov, V.A., Rezsova, V.V., Slominski, A., Quillan, J.M., 2001. Inhibition of mouse melanoma cell proliferation by corticotropin-releasing hormone and its analogs. *Anticancer Res. Mar-Apr 21 (2A)*, 1173–1179.
- Chandras, C., Koutmani, Y., Kokkotou, E., Pothoulakis, C., Karalis, K.P., 2009. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B by corticotropin-releasing factor in human monocytes. *Endocrinology. Oct 150 (10)*, 4606–4614. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1810>. Epub 2009 Jul 23.
- Chang, C.P., Pearce, R.V., O'Connell, S., Rosenfeld, M.G., 1993. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron. Dec 11 (6)*, 1187–1195. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90230-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90230-0).
- Chatzaki, E., Lambropoulou, M., Constantinidis, T.C., Papadopoulos, N., Taché, Y., Minopoulos, G., Grigoriadis, D.E., 2006. Corticotropin-releasing factor (CRF) receptor type 2 in the human stomach: protective biological role by inhibition of apoptosis. *J. Cell Physiol. Dec 209 (3)*, 905–911. <https://doi.org/10.1002/jcp.20792>.
- Chen, F.M., Bilezikjian, L.M., Perrin, M.H., Rivier, J., Vale, W., 1986. Corticotropin releasing factor receptor-mediated stimulation of adenylate cyclase activity in the rat brain. *Brain Res. 381 (1)*, 49–57. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90688-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90688-8). Aug 27.
- Chen, R., Lewis, K.A., Perrin, M.H., Vale, W.W., 1993. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90*, 8967–8971. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.8967>.

- Daaka, Y., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J., 1997. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*. Nov 6 390 (6655), 88–91. <https://doi.org/10.1038/36362>.
- Dautzenberg, F.M., Hauger, R.L., 2002. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol. Sci.* Feb 23 (2), 71–77. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.19.8967>.
- Dermitzaki, E., Tsatsanis, C., Gravanis, A., Margioris, A.N., 2002. Corticotropin-releasing hormone (CRH) induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* 277, 12280–12287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111236200>.
- Deussing, J.M., Chen, A., 2018. The corticotropin-releasing factor family: physiology of the stress response. *Physiol. Rev.* 98 (4), 2225–2286. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2017>. Oct 1.
- Dunn, A.J., Berridge, C.W., 1990. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res. Brain Res. Rev.* 15 (2), 71–100. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(90\)90012-d](https://doi.org/10.1016/0165-0173(90)90012-d). May-Aug.
- Elliott-Hunt, C.R., Kazlauskaitė, J., Wilde, G.J.C., Grammatopoulos, D., Hillhouse, E.W., 2002. Potential signalling pathways underlying corticotropin-releasing hormone's mediated neuroprotection from excitotoxicity in rat hippocampus. *J. Neurochem.* 80, 416–425. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00712.x>.
- Florio, P., De Falco, G., Leucci, E., Torricelli, M., Torres, P.B., Toti, P., Dell'Anna, A., Tiso, E., Santopietro, R., Leoncini, L., Petraglia, F., 2006. Urocortin expression is downregulated in human endometrial carcinoma. *J. Endocrinol.* 190, 99–105. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06726>.
- Grammatopoulos, D.K., 2012. Insights into mechanisms of corticotropin-releasing hormone receptor signal transduction. *Br. J. Pharmacol.* May 166 (1), 85–97. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01631.x>.
- Grammatopoulos, D.K., Ourailidou, S., 2017. CRH receptor signalling: potential roles in pathophysiology. *Curr. Mol. Pharmacol.* 10 (4), 296–310. <https://doi.org/10.2174/1874467210666170110125747>.
- Grammatopoulos, D.K., Randeve, H.S., Levine, M.A., Katsanou, E.S., Hillhouse, E.W., 2000. Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: an effect mediated via R1alpha and R2beta CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins. *Mol. Endocrinol.* 14, 2076–2091. <https://doi.org/10.1210/mend.14.12.0574>.
- Graziani, G., Tentori, L., Portarena, I., Barbarino, M., Tringali, G., Pozzoli, G., Navarra, P., 2002. CRH inhibits cell growth of human endometrial adenocarcinoma cells via CRH-receptor 1-mediated activation of cAMP-PKA pathway. *Endocrinology*. Mar 143 (3), 807–813. <https://doi.org/10.1210/endo.143.3.8694>.
- Graziani, G., Tentori, L., Muzi, A., Vergati, M., Tringali, G., Pozzoli, G., Navarra, P., 2002. Evidence that corticotropin-releasing hormone inhibits cell growth of human breast cancer cells via the activation of CRH-R1 receptor subtype, 264 *Mol. Cell. Endocrinol.* Jan 29 (1–2), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.10.006>. Epub 2006 Nov 9.
- Hauger, R.L., Grigoriadis, D.E., Dallman, M.F., Plotsky, P.M., Vale, W.W., Dautzenberg, F.M., 2003. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol. Rev.* Mar 55 (1), 21–26. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.3>. Review.
- Hsu, S.Y., Hsueh, A.J., 2001. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat. Med.* 7, 605–611. <https://doi.org/10.1038/87936>.
- Jin, L., Zhang, Q., Guo, R., Wang, L., Wang, J., Wan, R., Zhang, R., Xu, Y., Li, S., 2011. Different effects of corticotropin-releasing factor and urocortin 2 on apoptosis of prostate cancer cells in vitro. *J. Mol. Endocrinol.* Sep 7 47 (2), 219–227. <https://doi.org/10.1530/JME-11-0048>. Print 2011 Oct.
- Jin, L., Zhu, C., Wang, X., Li, C., Cao, C., Yuan, J., Li, S., 2015. Urocortin attenuates TGFβ1-induced Snail and slug expressions: inhibitory role of Smad7 in Smad2/3 signaling in breast cancer cells. *J. Cell Biochem.* Nov 116 (11), 2494–2503. <https://doi.org/10.1002/jcb.25194>.
- Kaprara, A., Pazaitou-Panayiotou, K., Kortsaris, A., Chatzaki, E., 2010a. The corticotropin releasing factor system in cancer: expression and pathophysiological implications. *Cell. Mol. Life Sci.* Apr 67 (8), 1293–1306. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0265-2>. Epub 2010 Feb 9.
- Kaprara, A., Pazaitou-Panayiotou, K., Chemonidou, M.C., Constantinidis, T.C., Lambropoulou, M., Koffa, M., Kiziridou, A., Kakolyris, S., Kortsaris, A., Chatzaki, E., 2010b. Distinct distribution of corticotropin releasing factor receptors in human breast cancer. *Neuropeptides* 44 (5), 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2010.06.005>. Epub 2010 Jul 13.
- Karteris, E., Grammatopoulos, D., Randeve, H., Hillhouse, E.W., 2000. Signal transduction characteristics of the corticotropin-releasing hormone receptors in the fetoplacental unit. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 1989–1996. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.5.6590>.
- Kishimoto, T., Pearce, R.V., Lin, C.R., Rosenfeld, M.G., 1995. A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Feb 14 92 (4), 1108–1112. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1108>.
- Koureta, M., Karaglani, M., Panagopoulou, M., Balgkouranidou, I., Papadaki-Anastasopoulou, A., Zarouchlioti, C., Dekavallas, S., Kolios, G., Lambropoulou, M., Baritaki, S., Chatzaki, E., 2020. Corticotropin Releasing Factor Receptors in breast cancer: expression and activity in hormone-dependent growth in vitro. *Peptides*. Jul 129, 170316. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170316>.
- Kovalovsky, D., Refojo, D., Liberman, A.C., Hochbaum, D., Pereda, M.P., Coso, O.A., 2002. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol. Endocrinol.* 16, 1638–1651. <https://doi.org/10.1210/mend.16.7.0863>.
- Lewis, K., Li, C., Perrin, M.H., Blount, A., Kunitake, K., Donaldson, C., 2001. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7570–7555. <https://doi.org/10.1073/pnas.121165198>.
- Lovenberg, T.W., Liaw, C.W., Grigoriadis, D.E., Clevenger, W., Chalmers, D.T., De Souza, E.B., Oltersdorf, T., 1995. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Jan 31 92 (3), 836–840. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.3.836>.
- Markovic, D., Punn, A., Lehnert, H., Grammatopoulos, D.K., 2008. Intracellular mechanisms regulating corticotropin-releasing hormone receptor-2beta endocytosis and interaction with extracellularly regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol. Endocrinol.* 22, 689–706. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0136>.
- Markovic, D., Punn, A., Lehnert, H., Grammatopoulos, D.K., 2011. Molecular determinants and feedback circuits regulating type 2 CRH receptor signal integration. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 896–907. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.02.005>.
- Marshall, C.J., 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. Jan 27 80 (2), 179–185. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90401-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90401-8).
- Minas, V., Rolaki, A., Kalantaridou, S.N., Sidiropoulos, J., Mitrou, S., Petsas, G., Jeschke, U., Paraskevaidis, E.A., Fountzilas, G., Chrousos, G.P., Pavlidis, N., Makriganakis, A., 2007. Intratumoral CRH modulates immuno-escape of ovarian cancer cells through FasL regulation. *Br. J. Cancer*. Sep 3 97 (5), 637–645. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603918>. Epub 2007 Jul 31.
- Papadopoulou, N., Chen, J., Randeve, H., Levine, M.A., Hillhouse, E.W., Grammatopoulos, D., 2004. Protein kinase A-induced negative regulation of the corticotropin-releasing hormone (CRH) R1a receptor-ERK signal transduction pathway: the critical role of Ser301 for signalling switch and selectivity. *Mol. Endocrinol.* 18, 624–639. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0365>.
- Pedersen, W.A., Wan, R., Zhang, P., Mattson, M.P., 2002. Urocortin, but not urocortin II, protects cultured hippocampal neurons from oxidative and excitotoxic cell death via corticotropin-releasing hormone receptor type I. *J. Neurosci.* 22, 404–412. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-02-00404.2002>.
- Perrin, M.H., Vale, W.W., 1999. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Oct 20 (885), 312–328. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08687.x>. Review.
- Punn, A., Levine, M.A., Grammatopoulos, D.K., 2006. Identification of signaling molecules mediating corticotropin-releasing hormone-R1alpha-mitogen-activated protein kinase (MAPK) interactions: the critical role of phosphatidylinositol 3-kinase in regulating ERK1/2 but not p38 MAPK activation. *Mol. Endocrinol.* Dec 20 (12), 3179–3195. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0255>. Epub 2006 Sep. 7.
- Rademaker, M.T., Richards, A.M., 2017. Urocortins: actions in health and heart failure. *Clin. Chim. Acta.* Nov 474, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.09.003>. Epub 2017 Sep. 6.
- Radulovic, M., Hoppel, C., Spiess, J., 2003. Corticotropin-releasing factor (CRF) rapidly suppresses apoptosis by acting upstream of the activation of caspases. *J. Neurochem.* 84, 1074–1085. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01594.x>.
- Reul, J.M., Holboer, F., 2002. On the role of corticotropin-releasing hormone receptors in anxiety and depression. *Dialogues Clin. Neurosci.* Mar 4 (1), 31–46. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2002.4.1/jreul>.
- Reyes, T.M., Lewis, K., Perrin, M.H., Kunitake, K.S., Vaughan, J., Arias, C.A., 2001. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 2843–2848. <https://doi.org/10.1073/pnas.051626398>.
- Rossant, C.J., Pinnock, R.D., Hughes, J., Hall, M.D., McNulty, S., 1999. Corticotropin-releasing factor type 1 and type 2alpha receptors regulate phosphorylation of calcium/cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 140, 1525–1536. <https://doi.org/10.1210/endo.140.4.6656>, 10098484.
- Sananbenesi, F., Fischer, A., Schrick, C., Spiess, J., Radulovic, J., 2003. Mitogen-activated protein kinase signaling in the hippocampus and its modulation by corticotropin-releasing factor receptor 2: a possible link between stress and fear memory. *J. Neurosci.* 23, 11436–11443. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-36-11436.2003>.
- Sato, H., Nagashima, Y., Chrousos, G.P., Ichihashi, M., Funasak, Y., 2002. The expression of corticotropin-releasing hormone in melanoma. *Pigment Cell Res.* Apr 15 (2), 98–103. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.1o063.x>.
- Seasholtz, A.F., Valverde, R.A., Denver, R.J., 2002. Corticotropin-releasing hormone-binding protein: biochemistry and function from fishes to mammals. *J. Endocrinol.* Oct 175 (1), 89–97. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1750089>. Review.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M., 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51 (5), 1409–1416. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>.
- Tjuvajev, J., Kolesnikov, Y., Joshi, R., Sherinski, J., Koutcher, L., Zhou, Y., Matei, C., Koutcher, J., Kreek, M.J., Blasberg, R., 1998. Anti-neoplastic properties of human corticotropin releasing factor: involvement of the nitric oxide pathway. *Vivo* 12 (1), 1–10. Jan-Feb.
- Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Charalampopoulos, I., Spiess, J., Gravanis, A., Margioris, A.N., 2005. Urocortin 1 and Urocortin 2 induce macrophage apoptosis via cAMP. *FEBS Lett.* 579 (20), 4259–4264. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.06.057>. Aug 15.
- Ulisse, S., Fabbri, A., Dufau, M.L., 1989. Corticotropin-releasing factor receptors and actions in rat Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 264, 2156–2163.

- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., Rivier, J., 1981. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213 (4514), 1394–1397. <https://doi.org/10.1126/science.6267699>. Sep. 18.
- Van Kolen, K., Dautzenberg, F.M., Verstraeten, K., Royaux, I., De Hoogt, R., Gutknecht, E., 2010. Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. *Neuropharmacology* 58, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.022>.
- Vaughan, J., Donaldson, C., Bittencourt, J., Perrin, M.H., Lewis, K., Sutton, S., Chan, R., Turnbull, A.V., Lovejoy, D., Rivier, C., 1995. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378 (6554), 287–292. <https://doi.org/10.1038/378287a0>. Nov 16.
- Wang, J., Li, S., 2007. Corticotropin-releasing factor family and its receptors: tumor therapeutic targets? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 785–788. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.014>.