

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

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

## BEVEZETÉS

A sejtek környezetükkel folytonos kölcsönhatásban élnek, onnan számos extracelluláris inger éri őket, melyek 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. A szignáltranszdukció 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 génextpressziós változás történhet. A kiváltott jelek eredőjeként a sejt biológiai választ ad az őt ért hatásokra.

### *1. A CRF család neuropeptidjei*

A kortikotropin-felszabadító faktor (angolból: CRF) ligand család tagjai a CRF, az urokortinok (UCN), az urotensin I és a sauvagine. Maga a CRF egy 41 aminosavból álló peptid, mely serkenti az agyalapi mirigy elülső részének kortikotropin szekrécióját. A CRF család neuropeptidjei 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, valamint a gyulladási folyamatokat emlősökben. A CRF család ligandjai és receptoraik expresszálódnak a központi idegrendszerben, valamint perifériás szövetekben is megtalálhatóak úgy, mint a szívben, bőrben és a vázizomban. Ez a széleskörű expresszió tükrözi, hogy a CRF és rokon peptidjei milyen fontos szerepet játszanak a szervezet stresszre adott válaszában kialakításában, valamint olyan patofiziológias állapotokban, mint a depresszió, a szorongás és az anorexia. A CRF és az urokortinok aktivitását egy szekretált fehérje, a CRF-kötő fehérje (CRF-BP, azaz CRF-binding protein) is szabályozza, mely a család peptidjeinek CRF receptorokhoz való kötődését regulálja.

## 2. Urokortinok

*Vaughan* és munkacsoportja 1995-ben számoltak be újfajta CRFR (CRF receptor) ligandokról, az urokortinokról. Az urokortinoknak három fő típusa ismert, az urokortin1 (UCN1), UCN2 (vagy angolul stresscopin-related peptide) és az UCN3 (vagy stresscopin). Génjeik más-más kromoszómán helyezkednek el, expressziójuk prekursor fehérjéket eredményez, melyek N-terminális vége szignál peptidet tartalmaz, ami végül proteolitikus hasítás áldozatául esik. Az érett fehérjék hossza 38-43 aminosav között változik. A 40 aminosav hosszú UCN1 túlnyomórészt az agyi Edinger Westphal magok sejtjeiben expresszálódik, de perifériás szövetekben is megtalálható, mint a gyomor-bél rendszer, a szívizom, a herék, a csecsemőmirigy, a bőr és a lépben. Az UCN2 expresszálódik a hipotalamuszban, az agytörzsben és a gerincvelőben. Ezenkívül a vérsejtekben, a szívben és a mellékvesében fejeződik még ki a peptid a periférián. Az UCN3 a hipotalamuszban és az amygdalában termelődik, míg a perifériás szövetek közül a gyomor-bél rendszer és a hasnyálmirigy sejtjei szintetizálják. Az urokortinok 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. Az UCN2 és UCN3 a CRFR2 felé mutatnak kötődési preferenciát, nagyjából hasonló affinitással, mint a CRF. Magasabb koncentrációban azonban az UCN2 a CRFR1 aktiválására is képes.

## 3. CRF receptorok

A CRF ligand család peptidjei B1-típusú, G-protein kapcsolt receptorokat (GPCR) használnak jel továbbításra. A CRF receptorokat egyetlen peptidlánc hét transzmembrán  $\alpha$ -hélixe horgonyozza ki a sejtmembránba, vagyis heptahelikális szerkezetűek. A receptorok két fő típusát különböztetjük meg, melyeket két különböző gén kódol, és a 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 hatásukat. Heterotrimer G-fehérjéket használnak a jel továbbításra. Szerkezetileg a CRFR1 és CRFR2 receptorok aminosav szekvenciája nagyjából 70%-ban azonos, az N-terminális extracelluláris doménjükben azonban nagyobb eltérést mutatnak. Ez összhangban van a receptor izoformák egymástól különböző farmakológiai tulajdonságaival és szelektivitásukkal, amit agonistákkal szemben mutatnak. Ezek a tulajdonságok pedig fontos szerepet játszanak a receptorok által közvetített fiziológiai hatások szabályozásában. Mindkét típusú receptor jelen van a központi idegrendszerben, a CRFR1 azonban dominánsabb, elterjedt

az agykéregben, a kisagyban, a hippokampuszban, az amygdalában és az agyalapi mirigyben. Ezzel szemben a CRFR2 túlnyomórészt a laterális septumra és a hipotalamusz területeire korlátozódik, de perifériás szövetekben is expresszálódik úgy, mint a szív, bőr, tüdő, gyomor-bél rendszer, érrendszer és a vázizom területén. A CRF receptorok expresszióját számos humán daganat típusban megfigyelték, így melanómában, kissejtes tüdőrákban és neuroblasztóma esetében.

#### **4. A cAMP/PKA és az ERK1/2 jelátviteli utak CRF receptorok általi aktivációja**

A ligand CRF receptorhoz kötődésének hatására általában stimuláló G fehérje (Gs) jön működésbe. Ez a receptorról leválva aktiválja effektorát, az adenilát-cikláz, ami ATP-ből cAMP-t hoz létre. A cAMP beindítja a protein kináz A-t (PKA), ami számos célfehérjét foszforilál úgy, mint pl. a CREB (CRE-kötő fehérje) transzkripciós faktort. Azonban más típusú G fehérjék is részt vehetnek a receptor és az effektor közötti jelátvitelben. Ilyen például a Gq által közvetített foszfolipáz C (PLC) stimuláció és inozitol-foszfátok képződése a here Leydig sejtjeiben és a placentában.

Az ERK1/2 (extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2) fehérje aktivációja is megtörténhet CRF receptorok közvetítésével. Az ERK1 44 kDa molekula tömegű, míg az ERK2 egy 42 kDa-os szerin/treonin specifikus proteinkináz. A szakirodalom alapján a CRF család neuropeptidjei által indukált ERK1/2 aktiváló foszforiláció mechanizmusa nagymértékben sejtípus függő folyamat. Ebben szerepet játszhat a MEK1/2 (mitogén-aktivált protein kináz/extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2), továbbá a cAMP-függő PKA is. Az ERK1/2 cAMP/PKA-függő aktivációját számos sejt rendszerben megfigyelték, így például a hippokampusz neuronjaiban, bizonyos esetekben azonban a PKA gátolja az ERK1/2 aktivációját. CRFR1-el transzfektált CHO sejtekben az UCN1 indukált CREB foszforiláció PKA inhibitor H89 kezeléssel gátolható, az ERK1/2 foszforiláció viszont nem. Ez arra utal, hogy ebben a sejtípusban a CRFR1 által közvetített MAPK jelátvitel PKA független. Az urokortin és CRF-indukált ERK1/2 aktivációt számos sejtípusban leírták úgy, mint patkány szívizomsejtben, agykérgi (kortikális) neuronokban, humán myometrium sejtekben, vagy CRFR1-et expresszáló HEK293 sejtekben. Az is ismert a szakirodalomból, hogy a CRFR2-t expresszáló CHO sejtekben a CRF ligandok által indukált ERK1/2 foszforiláció MEK inhibitor PD98059 jelenlétében gátolható, ami arra utal, hogy a MAPK kaszkád CRFR2 közvetített aktivációja MEK függő. Továbbá a CRF receptorokon keresztüli MAP kináz foszforilációban

fontos szerepet játszhat a PI3K (Foszfatidilinozitol 3-Kináz) enzim, hiszen a PI3K inhibitor Ly294002 előkezelés csökkenti a sauvagine-indukált ERK1/2 foszforilációt.

## 5. *Humán sejtvonalak*

Ahogy azt már korábban említettük, a CRF család neuropeptidjei fontos szabályozói számos biológiai folyamatnak, úgy, mint a stresszválasz és az immunválasz kialakítása, a gyulladási 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. Ha ezen rendszerek 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 sejtek).

## 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 az alkalmazott 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 ERK foszforiláció indukálódik számos sejttypusban, 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 összeköttetésekének 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.

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

Kísérleteinkhez ATCC (American Type Culture Collection) eredetű humán MCF7 emlőkarcinóma és HeLa adenokarcinóma sejteket használtunk, melyeket Prof. Dr. Szeberényi József biztosított számunkra. 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. Az aktivált fehérje kimutatása Western blot analízissel történt. A vizsgált fehérje sejten belüli lokalizációját lézer pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkóppal detektáltuk. A sejtszám meghatározása CellTiter-Glo 2.0 ATP-esszé és MTT festék használatával történt.

## **EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS**

### ***CRF receptorok expressziójának vizsgálata***

Western immunoblot módszer és a CRF receptor izoformákat specifikusan felismerő antitestek használatával detektáltuk a CRFR1 és CRFR2 expresszióját mindkét általunk vizsgált humán sejtvonalban (MCF7 és HeLa). A CRFR1 és CRFR2 sokféle biológiai hatás közvetítésében játszanak szerepet, ami nagymértékben ligandtól és sejttypustól függő folyamat. Cloudman melanómasejtekben a CRFR1 például sejtosztódását gátló hatását közvetít, míg más tumorsejtek esetében fokozza a sejtproliferációt.

### ***CRFR1 és CRFR2 lokalizációjának vizsgálata***

Lézer pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkópia és a CRF receptorokat specifikusan felismerő antitestek használatával detektáltuk a CRFR1 és a CRFR2 sejten belüli lokalizációját. MCF7 sejtekben az immunreaktivitás mindkét CRF receptor esetében citoplazmatikus eloszlású, a CRFR1 esetében maximális jelintenzitással a citoplazma perifériája felé, illetve helyenként kifejezetten a plazmamembrán mentén halmozódik. A CRFR1 sejtmembrán menti lokalizációját korábban már mások is leírták. A CRFR2 immun-jel szélesebb eloszlási mintázatot mutat, granuláris megjelenésű és a citoplazma mélyebb rétegeibe is benyúlik. HeLa sejtekben mindkét CRFR izoforma jelen van a sejtmembránok mentén, erős citoplazmatikus immunreaktivitást mutatva. Ebben a sejttypusban a CRFR1 immun-jel durvább, míg a CRFR2 finomabb szemcséket tartalmaz. A CRFR1 mRNS szintű expresszióját Graziani és munkatársai is közzétették korábbi tanulmányukban. Koureta és munkatársai pedig CRFR2 immunreaktivitást detektáltak MCF7 sejtek membránjában. 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. Ezek az eltérések sejttypustól függő, specifikus tulajdonságoknak tudhatók be.

### ***HU-indukált ERK1/2 foszforiláció időkinetikája Western blottal***

MCF7 sejtek kezelése 10 nM végkoncentrációjú humán urokortinnal (HU10) ERK1/2 foszforilációt indukált 5 perccel a peptid hozzáadása után, majd a jelintenzitás visszaesett a kezeletlen kontroll körüli szintre. HeLa sejtekben a 15 perces HU10 kezelés indukált markáns ERK1/2 foszforilációt, majd a jelintenzitás gyorsan visszaesett az alapszint körüli értékre. Az urokortin-indukált ERK1/2 aktiváció védi az izolált patkány szívet ischaemiás és reperfüziós sérülésekkel szemben, de stresszhez való adaptáció, neuroprotekciónak, és az apoptózis szabályozása kapcsán is leírták már szerepét. Továbbá az is ismert, hogy PC12 sejtekben az átmeneti ERK1/2 aktiváció fokozza a sejtek osztódási képességét.

### ***HU-indukált ERK1/2 foszforiláció dózisfüggése***

A Western blottal kapott felvételek azt mutatják, hogy MCF7 sejtekben a 10 nM és a 100 nM koncentrációjú HU kezelés markáns ERK1/2 foszforilációt indukált. Azonban mivel nincs szignifikáns különbség a két kezelési koncentráció által indukált hatás között, így nem tartottuk indokoltnak a töményebb koncentráció alkalmazását. HeLa sejtek esetében is a 10 nM-

os kezelési koncentráció bizonyult a leghatékonyabbnak, ami az irodalmi adatok alapján is ideális dózis.

### ***MEK gátlás hatása a HU-indukált ERK1/2 aktivációra***

Az MCF7 és HeLa sejtek előkezelése MEK inhibitor U0126-tal teljesen megszüntette a HU ERK1/2-t foszforiláló hatását, sőt az alap ERK1/2 foszforiláció mértékét is jelentős mértékben csökkentette. Western blottal nyert eredményeink alapján a MEK fehérje kulcsszerepet játszik a HU-indukált ERK1/2 aktivációban MCF7 és HeLa sejtekben is. Hasonló, urokortin indukált ERK1/2 foszforilációt gátló hatást tapasztaltak Karteris és munkatársai is, U0126 jelenlétében tenyésztve humán méhizomzat sejteket.

### ***PKA gátlás HU-kezelt sejtekben***

Western blottal vizsgálva MCF7 sejtekben a HU-indukált maximális (5 perc) ERK1/2 foszforiláció szignifikánsan gátolható volt PKA inhibitor H89-cel. HeLa sejtekben nem tapasztaltunk hasonló gátlást az inhibitor jelenlétében. Eredményeink alapján MCF7 sejtekben a HU által indukált ERK1/2 foszforiláció PKA függő folyamat. A szakirodalom alapján a CRF receptor izoformákon keresztül indukált ERK1/2 aktiváció PKA függése sejttípusonként változik. Idegsejtekben az ERK1/2 foszforilációt a cAMP/PKA jelátviteli út közvetíti, míg egér szívizomsejtekben a MAPK aktiváció PKA független folyamat.

### ***A CRFR1 és a CRFR2 szelektív gátlása***

Az MCF7 és HeLa sejtek előkezelése a CRFR1 antagonista Antalarminnal szignifikánsan csökkentette a HU ERK1/2-t foszforiláló képességét mindkét humán sejtvonalban, Western blottal vizsgálva. Ezzel szemben a CRFR2 inhibitor Astressin2b jelenlétében nem tudtunk hasonló, az urokortin ERK1/2-t foszforiláló gátló hatását kimutatni egyik általunk használt humán sejtvonalban sem. Eredményeink hangsúlyozzák a CRFR1 fontosságát a HU által stimulált ERK1/2 aktiváló foszforilációban ennél a két sejttípusnál. 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 Antalarminnal. Patkányból származó nyelvcső sejtekben a CRFR2-specifikus gátló Astressin2b blokkolja az urokortint az ERK1/2 foszforiláció vonatkozásában.



### ***Foszforilált ERK1/2 intracelluláris lokalizációja immunfluoreszcenciával***

A lézer pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkóppal készített felvételek alapján kezeletlen MCF7 sejtekben gyenge pERK1/2 jelet detektáltunk a sejtek citoplazmájában. 5 perces HU10 kezelés hatására a citoplazmában fokozódott a jelintenzitás, és a sejtmagokban is megjelent az immunreaktivitás. 24 órával a kezelések megkezdése után a HU-indukált ERK1/2 foszforiláció lecsengett. HeLa sejtekben a kezeletlen kontrollhoz képest markánsabb pERK1/2 jel volt látható a sejtek citoplazmájában 15 perccel a HU kezelés megkezdését követően. 24 órás HU10 kezelés hatására ismét gyengébb, citoplazmatikus jelet detektáltunk a HeLa sejtekben. A szakirodalom alapján a citoplazmatikus lokalizációjú ERK1/2 fokozza a PC12 sejtek proliferációját, míg a nukleáris elhelyezkedésű ERK1/2 lassítja a sejtciklust és differenciációt indukál ugyanebben a sejt típusban.

### ***Sejtproliferáció vizsgálata MTT-esszével***

Az urokortinok és az ERK1/2 sejtproliferációt szabályozó hatása tekintetében vizsgáltuk a sejtek HU10 kezelésre adott biológiai válaszát MTT-esszét 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 és HeLa sejteket HU10 jelenlétében tenyésztve jelentős mértékben emelkedett a formazán kristályokká átalakított MTT festék mérhető mennyisége mindkét sejtvonalban. Ebből arra következtethettünk, hogy a HU10 kezelés fokozza az MCF7 és a HeLa sejtek osztódási képességét. MCF7 sejtekben ez a hatás gátolható volt CRFR1 inhibitor Antalarmin, és CRFR2 antagonistá A stressin2b jelenlétében is. HeLa sejtekben a HU sejtosztódást serkentő hatása CRFR1 inhibitor Antalarmin jelenlétében gátolható volt, ezzel szemben a CRFR2 antagonistá A stressin2b nem akadályozta az urokortin ennek a biológiai hatásának a kifejezésében. Ezek a különbségek ismét az urokortin jelátvitelének specifikus, sejtípustól függő jellegzetességeire utalnak.

### ***HU-indukált Rb fehérje foszforiláció***

Az Rb egyike a sejtciklust szabályozó legfontosabb fehérjéknek. Western blottal vizsgálva MCF7 sejtekben HU10 kezelés hatására szignifikáns Rb fehérje foszforiláció indukálódott. Ez a hatás MEK inhibitor U0126 és PKA inhibitor H89 jelenlétében gátolható volt. 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.

### ***E2F-1 expresszió vizsgálata Western blottal***

Az E2F-1 fehérje egy transzkripció faktor, mely serkenti az S-fázis gének expresszióját, így fokozva a sejtosztódást. HU10 kezelés hatására szignifikánsan emelkedett az E2F-1 fehérje szintje mindkét általunk vizsgált humán sejt vonalban, és ez a hatás blokkolható volt a MEK inhibitor U0126 jelenlétében. Vagyis a MEK enzim fontos szerepet játszik a HU sejtosztódást szabályozó jelátvitelében MCF7 és HeLa sejtekben egyaránt. Továbbá MCF7 sejtekben az urokortin által indukált E2F-1 fehérje szint emelkedése gátolható volt a PKA inhibitor H89 jelenlétében is, ami alapján ez az enzim is része a HU jelátviteli útjainak ebben a sejt típusban.

### ***ATP-szint mérés***

MCF7 sejtekben CellTiter-Glo 2.0 ATP-esszével vizsgáltuk az urokortin sejtekre gyakorolt hatását. HU10 jelenlétében szignifikánsan csökkent a fotométerrel mért lumineszcens jel intenzitása, vagyis az MCF7 sejtek ATP termelése. A sejtek által termelt ATP mennyisége pedig arányos a metabolikus aktivitásukkal. A markánsan fokozott E2F-1 expresszió és az Rb foszforiláció szignifikáns mértékű emelkedése HU adása mellett azonban az MTT-esszével detektált biológiai hatást erősítik. Az ATP termelés HU jelenlétében megfigyelt csökkenését így más, általunk nem vizsgált anyagcsere mechanizmusoknak tulajdonítottuk.

### ***PKB/Akt fehérje foszforilációjának vizsgálata Western blottal***

A PKB/Akt fehérje a túlélést közvetítő jelátvitel egyik kulcseleme. Az enzim urokortin által indukált aktivációját közvetítheti a CRFR1 és 2, vannak azonban olyan esetek is, melyekben az UCN gátolja az Akt foszforilációt. MCF7 sejtekben HU10 jelenlétében emelkedett a sejtek túlélését serkentő PKB/Akt fehérje foszforilációjának mértéke, majd 3 órával az urokortin hozzáadása után elérte maximumát. HeLa sejtekben is fokozódott a PKB/Akt fehérje foszforilációja, 1 órával az urokortin kezelés megkezdését követően indukálva szignifikáns aktivációt. A HU által stimulált PKB/Akt foszforiláció hozzájárulhat az MCF7 és a HeLa sejtek fokozott túléléséhez.

### ***Csökkenet p53 szint HU-kezelt HeLa sejtekben***

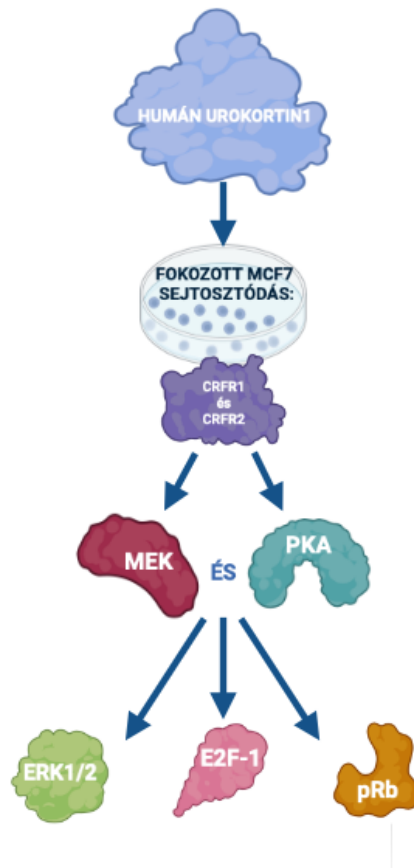
Az apoptózis, vagyis a programozott sejthalál egy másik olyan biológiai jelenség, aminek közvetítésében CRF receptorok gyakran szerepet játszanak. Western blottal vizsgáltuk a sejtosztódást- és túlélést szabályozó transzkripciós faktor p53 expresszióját. HeLa sejtekben HU10 kezelés hatására elnyújtott jelleggel, szignifikáns p53 fehérje szint csökkenés következett be, majd a kezelés napjának végére az visszaállt a kiindulási szint körüli értékre. A csökkent p53 szint hozzájárulhat a HeLa sejtek fokozott túléléséhez.

## **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 Arestin2b-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 az általunk vizsgált 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 jelenlétében 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

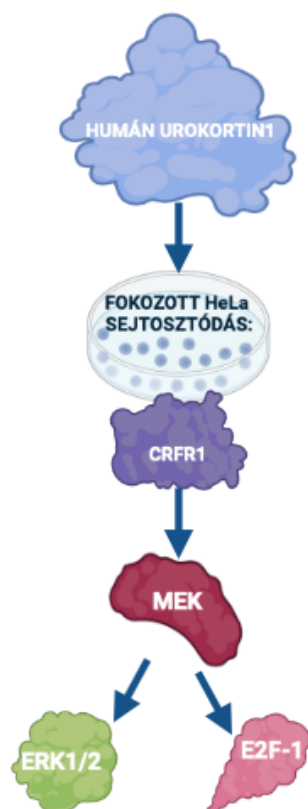
HU10 kezelés hatására nőtt a formazánná alakított MTT festék mennyisége is mindkét általunk vizsgált sejttípusban, vagyis urokortin jelenlétében tenyésztve a sejteket fokozódott azok osztódási képessége. MCF7 sejtekben ez a hatás gátolható volt a CRFR1 inhibitor Antalarmin és a CRFR2 antagonistá Astressin2b jelenlétében is, míg HeLa sejtekben csak az Antalarmin kezelés akadályozta az urokortin ennek a biológiai hatásának a kifejezésében. 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 MCF7 sejtekben hatását a HU 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 a sejtek osztódási képességét fokozza a neuropeptid jelenlétében.



*HU-indukált jelátvitel sémás modellje MCF7 sejtekben*

Eredményeink alapján továbbá azt a következtetést vonhatjuk még le, hogy hatását HeLa sejtekben a HU 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 proliferációját támogatja urokortin kezelés során.



*A HU jelátvitelének vázlatos modellje HeLa sejtekben*

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

## **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.

## TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

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