

1. Irodalmi áttekintés

1.1 Urocortinok és receptoraik

1.1.1 *Az urocortinok*

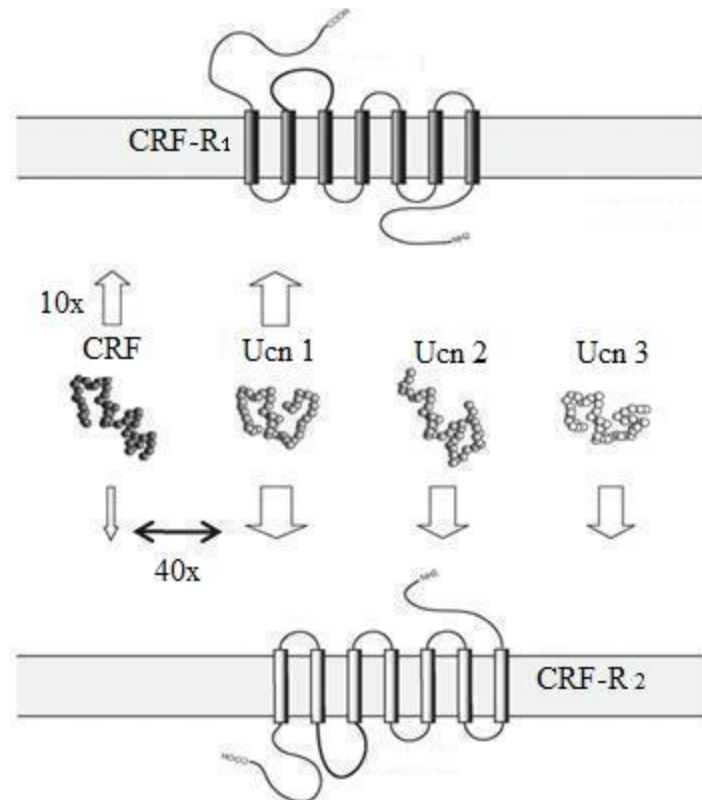
A corticotrop- releasing faktor (CRF) egy 41 aminosavból álló peptid, mely serkenti a corticotrophin szekréciót az agyalapi mirigy elülső részéből (SPIESS et al. 1981). VAUGHAN és munkacsoportja 1995-ben számoltak be újfajta CRF receptor- ligandokról, az Urocortinokról (Ucn), amik jelentős mértékben hasonlítottak a CRF-hez. Ezeknek a peptideknek a génjét patkány középagyból klónozták. Az Urocortinoknak három fajtája ismert, az Urocortin1, 2 és 3 (VAUGHAN et al. 1995). Az Ucn1 a CRF-R1 receptorhoz kötődik nagy affinitással (VAUGHAN et al. 1995), míg az Ucn2 és Ucn3 a CRF-R2 receptorhoz vonzódnak erősebben. Ezek a kölcsönhatások markánsabbak, mint a CRF affinitása e receptorokhoz (TAKAHASHI 2001). Ahogy a CRF, az Urocortin1, a 2 és a 3 is előfordulnak az agyban, ahol eltérő expressziós mintázatot mutatnak és mindegyik fehérje saját élettani jelentőséggel bír (LEWIS et al. 2001). Az Ucn3 a hasnyálmirigyben, a szívben és a tüdőben expresszálódik (SMAGIN and DUNN 2000). Az Ucn2 termelődik az agyban, legnagyobb mennyiségben a mesencephalon és diencephalon középvonali struktúrái mentén, valamint a mellékvesevelőben is. Az Urocortin1 fő forrása az agyi Edinger-Wherstpal magok (TUREKK et al. 2005).

A CRF és az Urocortinok többféle hatással is rendelkeznek, szerepet játszanak kiegészítő és agyi régió-specifikus módon többek között a szorongásos viselkedés, valamint az alkoholfogyasztás szabályozásában. Az Ucn1 hozzájárul a szorongásos állapotok kialakulásához. Az alkohol okozta betegségek esetén a CRF rendszer nem csak a függőség indukálta alkoholfogyasztást szabályozza, hanem a mérsékelt alkoholfogyasztást is. Az alkoholizmust a CRF a CRF-R1 receptorokon keresztül befolyásolja, ami alkoholfogyasztásos modellekben Urocortinok által a CRF-R2 receptorokon keresztül gátolható (RYABININ et al. 2012). Az Urocortinok ezen kívül szerepet játszanak a normális szív- és érrendszer élettanában, illetve e rendszerek betegségeiben és azok megelőzésében. Az Urocortinok szív- és érrendszeri hatásait a corticotrop- releasing faktor receptorokon keresztül közvetítik különböző jelátviteli utak segítségével. Az Urocortinok kedvező hatással vannak továbbá a hemodinamikai, illetve a neurohumorális szabályozásra. Ezek segítenek ellazítani az

érrendszert, valamint pozitív inotróp, kronotróp és luzitrop hatása van a szívre, vagyis szívelégtelenségek kezelésére is jól használhatók (VENKATASUBRAMANIAN et al. 2010). Az endogén Urocortin expresszió növekszik ishaemia (vérellátási hiány)/ reperfüzió (véráramlás visszaállítása) (I/R) alatt és exogén Urocortinnal csökkenthető a sejthalál, amit az I/R okoz (YUAN et al. 2010). Az endogén Urocortin serkentőleg hat az emberi szívre, ha azt valamilyen szívbénító hatás éri úgy, hogy megvédi a szívizom sejteket autokrin/ parakrin mechanizmuson keresztül (SCARABELLI et al. 2004). Az Urocortin által közvetített kardioprotekciót számos molekuláris mechanizmus közvetíti, mint például a mitogén aktivált protein kinázok (BRAR et al. 2000) és a foszfatidilinozitol 3- kináz aktiválása (BRAR et al. 2002). Továbbá e mechanizmusok közé tartozik még a kalcium-függő foszfolipáz A2 (iPLA2) gátlása (LAWRENCE et al. 2003) és a protein kináz C- epsilon (PKC ϵ) serkentése, majd mitokondriális áthelyeződése. Ilyen molekuláris folyamat még a mitokondriális ATP függő kálium csatornák aktiválása is (LAWRENCE et al. 2002).

1.1.2 A CRF receptorok

A receptor család tagjait emberben 15 gén kódolja, ligandjaik polipeptid típusú hormonok. Általában autokrin vagy parakrin módon fejtik ki hatásukat a receptoron (GRAMMATOPOULOS 2012). A receptorok két típusát különböztetjük meg, CRF-R1 és CRF-R2. A CRF-R1 magas arányban expresszálódik az agyban és az agyalapi mirigyben. A kettes típusú CRF receptornak két változatát különböztetjük meg. Az α (CRF-R2 α) a központi idegrendszerben expresszálódik, míg a β (CRF-R2 β) a szívben, perifériás szövetekben, az agyban, a mellékherében és a béltraktusban (POTTER et al. 1994). A receptorok eltérő affinitással kötik a CRF család különböző tagjait (1. ábra).



1. ábra: A CRF receptorok és affinitásuk a CRF család különböző tagjaihoz. A CRF mindkét típusú receptorhoz kapcsolódik, de a kötés affinitása alacsonyabb, mint az Urocortinok esetében. Az Ucn1 mindkét receptorhoz kötődik, míg az Ucn2 és Ucn3 csak a CRF-R2 receptort képes aktiválni.

1.1.3 Az Urocortin2

Az Urocortin2 paralóg bioaktív fehérje, a corticotrop- releasing faktor családba tartozik. Legismertebb hatásai közé tartozik a retino- és cardioprotekció, valamint a stressz válaszbán betöltött szerepe (PAN and KASTIN 2008). Többek között befolyásolja a hipofízis-agyalapi-mirigy-mellékvese tengely szabályozását, az immunrendszert, a viselkedést és a közérzetet is (TAKAHASHI et al. 2001). Az esetek többségében sejtfelszíni, G-protein kapcsolt CRF-R2 receptorokról aktivált jelátviteli utak közvetítik az élettani hatásokat (PAN and KASTIN 2008). Maga az Ucn2 a CRF-R2 β receptorokhoz mutatja a legmagasabb affinitást. Perifériás szövetekben az Ucn2 termelődik a szívben, a tüdőben, mellékvesevelőben, gyomorban, vérsejtekben, bőrben, vázizomban és a placentában (NEMOTO et al. 2005). Az Urocortin2 és receptora (CRF-R2) a mellékvesevelőben is expresszálódik és a mellékvesevelő kromaffin sejtekben az Urocortin2 játszik szerepet a catecholaminok funkciójának szabályozásában, bár

az még nem tisztázott, hogy a catecholamin szintézist irányítja vagy a kromaffin sejtekből kiinduló szekréción (NANMOKU et al. 2005). Az Ucn2 a cAMP jelátviteli úton keresztül növeli az interleukin 6 (IL-6) termelést aorta simaizom sejtekben (KAGEYAMA and SUDA 2003). Átjutva a vér-agy gáton az Ucn2 a táplálkozást és a hormonális rendszert is szabályozni képes (PAN and KASTIN 2008).

1.2 PC12 sejtek

A PC12 sejtek egy patkány mellékvesevelő daganatból származó sejtvonal, melyet eredetileg Greene és Tischler izoláltak. Egy hetes idegi növekedési faktor (NGF) kezelés után a sejtek nem osztódnak többé, hanem idegnyúlványokat fejlesztenek. Ha nem alkalmazzuk a továbbiakban az NGF-et, akkor 24 órán belül a nyúlványok degenerációja következik be, majd 72 óra után a sejtek újra sokszorozódni kezdenek. Az NGF-fel kezelt sejtek kis vezikulumokat tartalmaznak, melyek a különböző nyúlványokban és ezek végén halmozódnak fel (GREENE and TISCHLER 1976).

A PC12 sejtek catecholamin neurotranszmittereket szintetizálnak és tárolnak. Ezek közül dopamint (DA) és noradrenalin (NA) termelnek, illetve szabadítanak fel, válaszolva a különböző farmakológiai anyagok és oxigénhiány (hypoxia) hatására. Ez a folyamat függ a depolarizációtól és a citoszolikus Ca^{2+} koncentrációtól, valamint néhány proteinkináztól, mint pl.: proteinkináz A (PKA), proteinkináz C (PKC), és a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K) (NEMOTO et al. 2005). Hypoxia esetén PC12 sejtekben számos szignáltranszdukciós út (Ca^{2+} /kalmodulin- függő kinázok, Akt, stressz-aktivált proteinkináz (SAPKs) és MAPK), valamint transzkripciós faktor (cAMP-reszponzív elem kötő fehérje (CREB) (SPICER and MILLHORN 2003) aktiválódik. A PC12 sejtek CRF-R2 β receptorokat expresszálnak, amik az Ucn2 receptorai. Az Urocortin2 receptorhoz kötődésével különböző jelátviteli utak aktiválódnak (HAYCOCK and WAKADE 1992).

A PC12-nek több klónja is van, melyek bizonyos jelátviteli komponensekben defektívek. Ilyen például az MM17-26, az A126, és az nnr5 sejtvonalak. Az MM17-26 sejtvonal domináns gátló Ras proteint expresszál, vagyis a Ras nem működik (SZEBERÉNYI and ERHARDT 1994). Az A126 PKA-ban, míg az nnr5 sejtvonal az NGF receptorában, vagyis a Trk receptorban defektív sejtvonal.

1.3 Urocortin2 hatásai PC12 sejtekben

Az Urocortin2 endogén receptora PC12 sejtekben a CRF-R2 β . Ezekben a sejtekben az Urocortin emeli a cAMP szintjét (HAYCOCK and WAKADE 1992), továbbá növeli a noradrenalin szekréciót, illetve a proteinkináz A, valamint az extracelluláris szignál által regulált kinázok (ERK) foszforilációjához vezet, a dopamin szintet viszont nem változtatja meg. Az Urocortin általában parakrin módon fejti ki hatását (NANMOKU et al. 2005). Tirozin-hidroxiláz (TH) foszforiláció is kialakul Ucn2 kezelés hatására, mely enzim az catecholamin szintézis limitálója. Ez a folyamat a PKA jelátviteli komponensein keresztül történik (NEMOTO et al. 2005). Az Urocortin2 jelátviteli hálózatai PC12 sejtek esetében még kevésbé ismertek, ezért munkánk célja e folyamatok jobb feltérképezése is.

1.4 Az idegi növekedési faktor és jelátvittele

Az NGF egy polipeptid természetű növekedési faktor, mely a Ras/ERK úton keresztül fejti ki hatását. Ez a kulcsfontosságú jelátviteli út, szerepet játszik sok sejt szintű folyamat lebonyolításában, többek között a sejtproliferációban, túlélésben, differenciációban és migrációban. Kétféle NGF receptort különböztethetünk meg. Az egyikhez magas, míg a másikhoz alacsony affinitással kötődik az NGF. A p75NGFR egy sejt felszíni glikoprotein, ami minden NGF fogékony sejtben expresszálódik. Az NGF-et alacsony affinitással köti. Vannak bizonyítékok miszerint a p75NGFR receptornak szerepe van a sejthalálban PC12 sejtek esetében (RABIZADEH et al. 1993). A másik receptor a p140trk. Ezt egy 70 kDa tömegű onkoprotein analógjaként azonosították, mint protoonkogén, ember vastagbél rákban (MARTIN-ZANCA et al. 1986). Ez egy transzmembrán glikoprotein, ami a protein tirozin-kináz receptor családba tartozik. NGF kötés hatására a receptor tirozin oldalláncai foszforilálódnak, majd dimerizálódnak (KAPLAN et al. 1991). Az NGF receptorai jelentős mennyiségben expresszálódnak a központi idegrendszerben, NGF fogékony sejtekben (CHAO 1992). Klasszikus esetben az aktiváció úgy történik, hogy a ligand a sejt felszínén a TrkA tirozin kináz receptorhoz kötődik, majd a Ras-on, Raf-on és a MEK enzimeken keresztül stimulálja az ERK-et, ezt követően a jel bejutva a sejtmagba ott transzkripciós faktorokat kapcsol be és megkezdődik az adott célgének átírása. Mivel ez az út fontos szerepet játszik a sejtek egymás közötti kommunikációjában, így eltérései hozzájárulhatnak daganatos betegségek kialakulásához. Az ERK egy szerin/treonin specifikus kináz, amely széles körű nukleáris és citoplazmatikus repertoárral rendelkezik. Transzkripciós faktorok mint pl. az Elk1. foszforilációján, vagyis aktivációján keresztül pedig a génműködés

szabályozásában játszik szerepet. Az útvonal anti-apoptotikus túlélési gének és fehérjék aktivációján (Bcl-2 család) keresztül érintett az apoptózis szabályozásában is (SZEBERÉNYI and ERHARDT 1994).

1.5 Az Ucn2 és NGF jelátviteli útjai

1.5.1 A Ras/ERK út

Az extracelluláris szignál által regulált kinázoknak két legjobban ismert tagja, az ERK1 és ERK2, 42- és egy 44 kDa tömegű fehérjék. Fontos szerepet játszanak úgy a növekedési faktor jelátvitelben mind az Urocortin szignalizációs út mediátoraiként (BRAR et al. 2000). Az ERK1 és az ERK2 nagy fokú homológiát mutatnak, a MEK1 és MEK2 hatására aktiválódnak. Az ERK út olyan fehérjefoszforilációs láncokból áll, melyek proteinkináz komponensei egymást aktiválják. Ezeket összefoglaló néven MAPK (mitogén aktivált protein kináz) kaszkádoknak nevezzük. Az ERK a növekedési faktorok MAPK-aiként bejutva a sejtmagba a szérum-reszponzív elem enhancer (SRE) által serkentett célgének transzkripcióját fokozza (SZEBERÉNYI 2004). Mivel az ERK1 és ERK2 gyakran együtt aktiválódnak és a MEK inhibitorok (pl.: PD98059 és U0126) továbbá a foszforilált, tehát aktív alakokra specifikus ERK antitestek nem tesznek köztük különbséget, ezért az ERK1/2-t a továbbiakban mint ERK említjük. Az ERK aktiváció nemcsak a növekedési faktorok által kiváltott jelekre korlátozódik, hanem bekövetkezik perzisztens illetve patológiás neuronális stimulusok hatására is. Egyre több bizonyíték mutat arra, hogy az ERK- nek szerepe van a neuronális plaszticitásban éppúgy, mint a tanulásban és a memória kialakulásában, valamint a fájdalom hatására kialakuló túlérzékenységben (RU-RONG ET. AL 2009).

Ha az Urocortin a patkány hippocampusában a CRF- R1 receptorhoz kötődik, akkor az az ERK által közvetített túlélést támogatja az oxidatív- és excitotikus stresszel szemben (PEDERSEN et al. 2002). Az Urocortin indukálta ERK1/2 aktivációban a CRF-R1 és CRF-R2 receptorokon keresztül a Raf-1 kináz, tirozin- kinázok és feltételezhetően a Ca^{2+} is részt vesz (BRAR et al. 2004). Megkülönböztetünk ERK5 utat is, de ennek részletei kevésbé ismertek, mint az ERK1/2. Feltételezik, hogy fontos lehet a rák patológiájában, illetve kulcsszerepet játszik az endothel sejtek túlélésében. Úgy tűnik, hogy a tumor sejtek migrációjának, inváziójának szabályozásában is van jelentősége (LOCHHEAD et al. 2012). Az ERK5 a MEK5 által aktiválódik, ami pedig a MEK2/3 által. Az ERK5 a molekulasúlyt tekintve eléggé különbözik az ERK1 és ERK2-től. Az ERK5-nek van egy hosszú egyedi karboxil-

terminálisa, ami transzkripciós aktivitással rendelkezik és feltétlenül szükséges a MEF2 (miocyta enhancer faktor) aktivációjához. Viszont az amino-terminális domént tekintve nagyfokú hasonlóságot mutat az ERK1/2-vel, és tartalmazza az Thr-Glu-Tyr (TEY) motívumot abban az aktivációs hurokban, ami szintén hasonló az ERK1/2-höz. Kimutatták, hogy idegi sérülés ERK5 aktivációt vált ki spinális mikrogliában (RU-RONG et al. 2009).

1.5.2 A cAMP út

A ciklikus adenzin 3',5'-monofoszfát volt az első másodlagos hírvivő (second messenger) amit valaha azonosítottak. Fontos szerepet játszik a sejtválaszok kialakításában a hormonok és a neurotranszmitterek esetében is (SUTHERLAND and ROLL 1958). A jelátvitel folyamata úgy kezdődik, hogy a ligand a receptorához kapcsolódik. Ez stimulálja a G-fehérje effektorát, az adenil cikláz (AC) enzimet, melynek hatására ATP-ből ciklikus AMP (cAMP) jön létre (SZEBERÉNYI and ERHARDT 1994). A sejten belüli cAMP szintet két enzim aktivitása szabályozza, ezek az adenil cikláz és a ciklikus nukleotid foszfodiészteráz, utóbbi a cAMP elbontását végzi. A cAMP a proteinkináz A molekulához kötődik és annak katalitikus (C) alegységét aktiválja, miközben a komplexről a regulátor (R) alegységek disszociálnak. Így következik be a célfehérjék foszforilálása illetve a sejtmagba jutva transzkripciós faktorokat is foszforilál. Ezek közül egyik a cAMP-reszponzív elem kötő fehérje (CREB), mely a cAMP-reszponzív elem (CRE) nevű enhancerhez kötődve fokozza az érintett gén expresszióját. Így fejt ki hatását az adrenalin, a hipofízis elülső lebeny hormonok közül az ACTH, FSH, LH, TSH, a hátsó lebeny vazopresszin hormonja, a parathormon és a glukagon. Gátló, inhibitor hatású G-fehérjéken át hat például az acetilkolin a szívizomban (SZEBERÉNYI 2004). A CRF és az Urocortinok a corticotrop-releasing faktor receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. E receptorok a G-fehérjékkel kapcsolatos különböző sejten belüli hálózatok szabályozásában vesznek részt, melyhez intracelluláris effektorok is kellenek, például a cAMP (GRAMMATOPOLOUS 2012).

1.6 cAMP-ERK út közötti kapcsolat

1.6.1 A Ras-ERK út gátlása cAMP-vel

A korai 1990-es években kimutatták, hogy a cAMP blokkolja a növekedési faktorok által stimulált ERK aktivációt Rat1 (patkány) és NIH3T3 (egér) fibroblasztokban, így nyilvánvaló a párbeszéd a két szignalizációs út között. Azóta már sok sejttypusban kimutatták ezt a gátló hatást (glukagon adipocytákban, simaizomsejtekben, stb.). A cAMP targetje a C-RAF. Ennek

aktivációjához kell a Rap1 nevű fehérje, ami GTP-áz enzimaktivitással is rendelkezik. Egy másik modell szerint a PKA gátolja a C-RAF-ot, úgy hogy az S621 oldalláncot direkt foszforilálja. Ekkor egy adapter protein kapcsolódik a C-RAF C terminálisához, mely felelős az aktivációért. A harmadik modell is a C-RAF direkt foszforilációjáról számol be a PKA által. Ekkor a PKA 3 aminosav oldalláncot foszforilál a C-RAF N terminális doménjében (S43, S233, S259) (DUMAZ and MARAIS 2005).

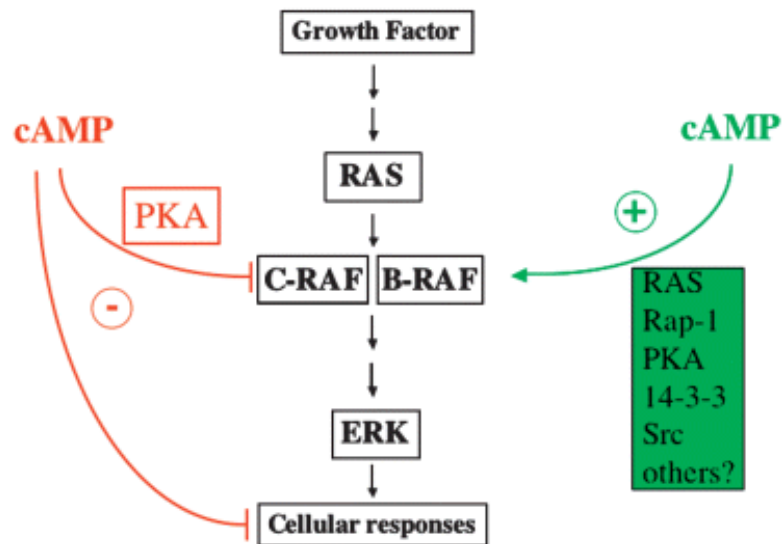
1.6.2 cAMP által kiváltott ERK proliferáció és differenciáció

PC12 és egyes idegsejt típusokban az NGF és a cAMP B-RAF függő módon stimulálják az ERK-et. A B-RAF az elsődleges RAF izoforma illetve MEK aktivátor egyes agy alapú kutatásokban. Ez nem más, mint egy esszenciális túlélési fehérje az elsődleges szenzoros illetve motoros neuronokban. A B-RAF cAMP általi aktivációjának akadnak ellentmondásai, miszerint az aktiváció történhet PKA-függő és PKA-tól független módon is. Számos tanulmányban kimutatták, hogy a B-RAF-ot egy kisméretű G-protein a Rap1 aktiválja. *In vitro* ez a kisméretű protein kapcsolódik a B- és C-RAF-hoz, a B-RAF-ot *in vitro* és *in vivo* aktiválja, ezzel szemben *in vivo* nem képes a C-RAF aktiválására. Számos hormon és agonista, melyek emelik az intracelluláris cAMP szintjét, aktiválják a Rap1-et. Ezen megfigyelések vezettek egy olyan modell kialakulásához, melyből egyértelműnek tűnik, hogy a RAF izoformák különböző funkciókat látnak el PC12 sejtekben, ami nagymértékben függ a tenyésztési körülményektől is. NGF és cAMP aktiválja a Rap1-et, majd a Rap1 a B-RAF-on keresztül az ERK-et, ami végül a PC12 sejtek differenciációjához vezet (DUMAZ and MARAIS 2005).

1.6.3 Konklúzió

Ha a C-RAF szignalizációs út működik, akkor a cAMP gátolja a proliferációt sok különböző célmolekulán keresztül, de ennek a folyamatnak az élettani jelentősége még nem teljesen tisztázott. A B-RAF szerepének megértése a cAMP stimulált proliferációban is még további vizsgálatokat kíván. Továbbá a B-RAF kutatása azért is fontos lehet, mert a szignalizációs komponens mutánsait kimutatták melanoma és thyroid daganatokban, ahol úgy tűnik, hogy a cAMP aktiválja az ERK utat, helyett, hogy gátolná azt. A B-RAF valószínűleg fontos szerepet játszik a sejtek biológiai folyamataiban és a cAMP nem képes ezt elnyomni. Ugyanakkor vannak olyan esetek is, pl.: colorectális és petefészek daganatokban, ahol a cAMP szintén aktiválja az ERK utat, viszont mutáns B-RAF nagy számban mutatható ki (DUMAZ and MARAIS 2005).

A cAMP általi ERK aktiváció (2. ábra) többféle úton is kialakulhat. Ezek egyike a cAMP → PKA → Ras → Raf → MEK → ERK útvonal. Ez az aktiváció gátolható G₁₂ mutánssal, melynek következtében nincs Ras függő proliferáció, vagyis ERK foszforiláció sincs. A cAMP Ras-függő gátlásához kell a PKA, de létezik ERK független cAMP mediált sejt proliferáció gátlás is. Ennek mechanizmusa nem teljesen tisztázott, lehet, hogy csak késlelteti az aktivációt, de az is lehet, hogy korai periódusban gátol, később pedig serkent. Létezik azonban Ras-tól független ERK aktivációs út is. Ehhez szükséges egy kisméretű G protein a Rap1, melynek aktivációja egy guanin nukleotid exchange faktor (GEF) és az Src fehérje által történik. A Rap1 által is gátolható az ERK, ehhez viszont az kell, hogy a Src fehérje antiproliferatív hatással rendelkezzen. A Rap1-en keresztüli ERK aktiváció során a RAF egy másik izoformája aktiválódik, a B-RAF. Ha a B-RAF nem áll rendelkezésre, akkor a Rap1 gátolja a RAF1-et a Ras úton (STORK and SCHMITT, 2002). Ezzel szemben melanocytákban azt találták, hogy a Ras-nak van egy szövetspecifikus exchange faktora, ami nem a RAF1-et, hanem a B-RAF-ot aktiválja, ez pedig ERK aktivációt okoz (ROSER et al. 2000). A Ras-on és a Rap1-en keresztüli ERK aktiváció PKA függőek, de valószínűleg létezik PKA független út is. Eerre példa az EPAC, vagyis exchange protein directly activated by cAMP. Továbbá ilyen a PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) is, mely emeli a cAMP szintet és neuritogenezist indukál PC12 sejtekben (MATTHEW and LEE 2007).



2. ábra: Dumaz and Marais: Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways (DUMAZ and MARAIS 2005). Az ábra a cAMP és a Ras/RAF/MEK/ERK utak közötti kapcsolatot szemlélteti. A cAMP általi aktiváció a C-RAF-tól és a B-RAF-tól függ. A cAMP gátolhatja a C-RAF-ot, ami PKA függő mechanizmus, ez pedig gátolja az ERK foszforilációt (ábra bal oldala). Ezzel ellentétben a cAMP az ERK foszforilációjához is vezethet a B-RAF-on keresztül. Utóbbi folyamatban a Ras, Rap1, PKA, 14-3-3 fehérje és az Src is érintett lehet (ábra jobb oldala).

2. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Stayer-Harci Alexandrának, hogy fáradhatatlan munkával segített előrehaladásomban, a kísérlet megtervezésében és a stabil elméleti háttér megszerzésében.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Vecsernyés Mónikának a módszerek betanításában nyújtott segítségéért.

Továbbá köszönettel tartozom Ifj. Dr. Sétáló Györgynek szakmai segítségnyújtásáért és belső konzulensemnek Dr. Hoffmann Gyulának.

Köszönettel tartozom Dr. Bátor Juditnak az adatelemzés elsajátításában nyújtott segítségét.

Köszönet illeti Dr. Szeberényi József Professzor Urat, hogy engedélyezte számomra a kísérlet elvégzését és tanulmányaim lefolytatását.

Köszönöm az Orvosi Biológiai Intézet összes munkatársának, hogy biztosították az anyagokat, eszközöket és a lehetőséget.

Köszönöm családomnak és barátaimnak a biztatást és a javításban nyújtott segítséget.

3. Irodalomjegyzék

BRAR BK., CHEN A., PERRIN MH., VALE W. (2004): 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*. 145(4):1718-1729.

BRAR BK., JONASSEN AK., STEPHANOU A., SANTILLI G., RAILSON J., KNIGHT RA., YELLON DM., LATCHMAN DS. (2000): Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem*. 275(12):8508-8514.

CHAO M.V. (1992): Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron*. 9(4):583-593.

GRAMMATOPOULOS DK. (2012): Insights into mechanisms of corticotropin-releasing hormone receptor signal transduction. *Br J Pharmacol*. 166(1):85-97.

GREENE LA., TISCHLER AS. (1976): Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73(7):2424-2428.

HAYCOCK JW, WAKADE AR. (1992): Activation and multiple-site phosphorylation of tyrosine hydroxylase in perfused rat adrenal glands. *J Neurochem*. 58(1):57-64.

JOAN VAUGHAN, CYNTHIA DONALDSON, JACKSON BITTENCOURT, MARILYN H. PERRIN, KATHY LEWIS, STEVEN SUTTON, RAYMOND CHAN, ANDREW V. TURNBULL, DAVID LOVEJOY, CATHERINE RIVIER, JEAN RIVIER, PAUL E. SAWCHENKO and WYLIE VALE (1995): Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378. 287:292.

KAGEYAMA K., SUDA T. (2003): Urocortin-related peptides increase interleukin-6 output via cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent pathways in A7r5 aortic smooth muscle cells. *Endocrinology*. 144(6):2234-2241.

KAPLAN DR., MARTIN-ZANCA D., PARADA LF. (1991): Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature*. 350(6314):158-160.

LAWRENCE KM., CHANALARIS A., SCARABELLI T., HUBANK M., PASINI E., TOWNSEND PA., COMINI L., FERRARI R., TINKER A., STEPHANOU A., KNIGHT RA., LATCHMAN DS. (2002): K(ATP) channel gene expression is induced by urocortin and mediates its cardioprotective effect. *Circulation*. 106(12):1556-1562.

LAWRENCE KM., SCARABELLI TM., TURTLE L., CHANALARIS A., TOWNSEND PA., CARROLL CJ., HUBANK M., STEPHANOU A., KNIGHT RA., LATCHMAN DS. (2003): Urocortin protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion injury by attenuating calcium-insensitive phospholipase A2 gene expression. *FASEB J*. 17(15):2313-2405.

LEWIS K., LI C., PERRIN MH., BLOUNT A., KUNITAKE K., DONALDSON C., VAUGHAN J., REYES TM., GULYAS J., FISCHER W., BILEZIKJIAN L., RIVIER J., SAWCHENKO PE., VALE WW. (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(13):7570-7575.

LOCHHEAD PA., GILLEY R., COOK SJ. (2012): ERK5 and its role in tumour development. *Biochem Soc Trans*. 40(1):251-256.

MARTIN-ZANCA D., HUGHES SH., BARBACID M. (1986): A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature*. 319(6056):743-748.

MATTHEW J. GERDIN and LEE E. EIDEN (2007): Regulation of PC12 Cell Differentiation by cAMP Signaling to ERK Independent of PKA: Do All the Connections Add Up? *Science*. .Issue 382. p. pe15

NANMOKU T., TAKEKOSHI K., FUKUDA T., ISOBE K., SHIBUYA S., KAWAKAMI Y. (2005): Urocortin stimulates tyrosine hydroxylase activity via the cAMP/protein kinase a pathway in rat Pheochromocytoma PC12 cells. *Neurosci Lett*. 382(1-2):124-127.

NEMOTO T., MANO-OTAGIRI A., SHIBASAKI T. (2005): Urocortin 2 induces tyrosine hydroxylase phosphorylation in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 330:821-831.

NICOLAS DUMAZ AND RICHARD MARAIS (2005): Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. *FEBS Journal*. Volume 272. 3491:3504.

- PAN W., KASTIN AJ. (2008): Urocortin and the brain. *Prog Neurobiol.* 84(2):148-156.
- PEDERSEN WA., WAN R., ZHANG P., MATTSON MP. (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(2):404-412.
- PHILIP J.S STORK, JOHN M SCHMITT (2002): Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Cell Press.* Volume 12. 258:266.
- POTTER E., SUTTON S., DONALDSON C., CHEN R., PERRIN M., LEWIS K., SAWCHENKO PE., VALE W. (1994): Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(19):8777-8781.
- RABIZADEH S, OH J, ZHONG LT, YANG J, BITLER CM, BUTCHER LL, BREDESEN DE. (1993): Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science.* 261(5119):345-348.
- ROSER BUSCÀ, PATRICIA ABBE, FRÉDÉRIC MANTOU, EDITH ABERDAM, CAROLE PEYSSONNAUX, ALAIN EYCHÈNE, JEAN-PAUL ORTONNE and ROBERT BALLOTTI (2000): Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *The EMBO Journal.* Volume 19, Issue 12, 2900:2910.
- RU-RONG JIA, ROBERT W. GEREAU IVB, MARZIA MALCANGIIOC, GARY R. STRICHARTZA (2009): MAP kinase and pain. *Elsevier.* 135:148.
- RYABININ AE., TSOORY MM., KOZICZ T., THIELE TE., NEUFELD-COHEN A., CHEN A., LOWERY-GIONTA EG., GIARDINO WJ., KAUR S. (2012): Urocortins: CRF's siblings and their potential role in anxiety, depression and alcohol drinking behavior. *Alcohol.* 46(4):349-357.
- SCARABELLI TM., PASINI E., FERRARI G., FERRARI M., STEPHANOU A., LAWRENCE K., TOWNSEND P., CHEN-SCARABELLI C., GITTI G., SARAVOLATZ L., LATCHMAN D., KNIGHT RA., GARDIN JM. (2004): Warm blood cardioplegic arrest induces mitochondrial-mediated cardiomyocyte apoptosis associated with increased urocortin expression in viable cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 128(3):364-371.

SMAGIN G.N., DUNN A.J. (2000): The role of CRF receptor subtypes in stress-induced behavioural responses. *Eur. J. Pharmacol.* 405:199-206.

SPICER Z., MILLHORN DE. (2003): Oxygen sensing in neuroendocrine cells and other cell types: pheochromocytoma (PC12) cells as an experimental model. *Endocr Pathol.* 14(4):277-291.

SPIESS J., RIVIER J., RIVIER C., VALE W. (1981): Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(10):6517-6521.

SUTHERLAND EW., RALL TW. (1958): Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 232: 1077–1091.

SZEBERÉNYI J. (2004): *Molekuláris sejtbológia. Dialóg Campus Kiadó. Budapest-Pécs.* 381-383.

SZEBERÉNYI J, ERHARDT P. (1994): Cellular components of nerve growth factor signaling. *Biochim Biophys Acta.* 1222(2):187-202.

V. F. Turek, N. O. Tsivkovskaia, P. Hyytia, S. Harding, A. D. Lê, A. E. Ryabinin (2005): Urocortin 1 expression in five pairs of rat lines selectively bred for differences in alcohol drinking. *Psychopharmacology.* Volume 181, Issue 3, pp 511-517.

TAKAHASHI LK. (2001): Role of CRF(1) and CRF(2) receptors in fear and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25:627-636.

VENKATASUBRAMANIAN S., NEWBY DE., LANG NN. (2010): Urocortins in heart failure. *Biochem Pharmacol.* 80(3):289-296.

YUAN Z., MCCAULEY R., CHEN-SCARABELLI C., ABOUNIT K., STEPHANOU A., BARRY SP., KNIGHT R., SARAVOLATZ SF., SARAVOLATZ LD., ULGEN BO., SCARABELLI GM., FAGGIAN G., MAZZUCCO A., SARAVOLATZ L., SCARABELLI TM. (2010): Activation of Src protein tyrosine kinase plays an essential role in urocortin-mediated cardioprotection. *Mol Cell Endocrinol.* 325(1-2):1-7.