

Az Urocortin2 jelátviteli kapcsolatainak vizsgálata PC12 sejtekben

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Készítette: Balogh Bálint

Biológus MSc II. évfolyam Pécsi Tudományegyetem

Témavezető: Stayer-Harci Alexandra

PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézet



Pécs, 2014

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	3
2.	Célkitűzés.....	4
3.	Anyagok és módszerek.....	5
3.1	<i>PC12 sejtenyészet</i>	5
3.2	<i>PC12 sejtek kezelése</i>	5
3.3	<i>Western blot analízis</i>	5
3.4	<i>Adatelemzés</i>	6
3.5	<i>Immunfluoreszcencia</i>	6
4.	Eredmények és értékelésük	8
4.1	<i>PC12 sejtek kezelése</i>	8
4.2	<i>MM17-26 sejtvonal vizsgálata</i>	9
4.3	<i>A126 sejtvonal vizsgálata</i>	10
4.4	<i>nnr5 sejtvonal vizsgálata</i>	11
4.5	<i>Részösszefoglalás</i>	13
4.6	<i>A2B-vel előkezelt PC12 sejtek</i>	14
5.	Összefoglalás és jövőbeli céljaink.....	15

1. Bevezetés

Anyagcsere tevékenységeiket a sejtek csak a környezetükkel való folytonos kölcsönhatásban képesek véghezvinni. Életük során környezetükből számtalan inger éri őket: kémiai, mechanikai, hő, elektromos, és egyéb. Ezek a sejten kívüli, vagyis extracelluláris szignálok biztosítják a sejtek közötti kommunikációt, a szervezet összehangolt működését is. Mivel a kommunikáció kémiai ágensek közvetítésével is történhet, ezért ezt a folyamatot kémiai jelátvitelnek, vagy szignáltranszdukciónak nevezzük. A kémiai jelátvitelnek két szakasza van. Az első, mely során a jeltermelő sejt jelátviteli molekulát (ligandot) képez, ami eléri és felismeri a rá specifikus receptorral rendelkező célsejtet. Ez a sejten kívüli szignalizáció folyamata. Ezt követően a ligand receptorhoz kötődésével megkezdődik az intracelluláris, azaz a sejten belüli jelátvitel. Ennek végeredményeként a sejt biológia választ ad az őt ért hatásokra, többek közt génexpressziós változások következnek be, melytől anyagcseréje módosulhat.

A kémiai jelátvitelnek több fajtáját különböztetjük meg aszerint, hogy a jeltermelő- és a célsejt milyen viszonyban vannak egymással. Eszerint beszélhetünk parakrin-, endokrin-autokrin-, juxtakrin- és intakrin jelátvitelről. Parakrin szignalizáció esetén a ligand a célsejtet diffúzióval éri el, a hatás gyors. Az endokrin jelátvitel során endokrin mirigyek termelik a hormonokat, melyek a véráram útján érik el célsejtjeiket. A célsejteknek nagy affinitású receptorokkal kell rendelkezniük, a hormonnak kis koncentrációban is hatásosnak kell lennie. Autokrin jelátvitelnél a jeltermelő sejt által kiválasztott ligand ugyanazon sejt sejtfelszíni receptorához kötődik, juxtakrin esetben pedig a jelátviteli molekula sejtfelszíni fehérjeként expresszálódik, majd a másik sejt receptorához közvetlen, sejt-sejt kontaktus útján kapcsolódik. Intakrin jelátvitelről beszélünk akkor, amikor a sejten termelődő anyag (metabolit) a sejten található úgynevezett árva receptorhoz kötődik, az anyag a sejtet nem is hagyja el.

A receptorok két csoportját különítjük el. Vannak sejtfelszíni és intracelluláris receptorok. Az intracelluláris receptorok a citoszólban vagy a sejtmagban találhatók, kis hidrofób molekulák (pl.: szteroidok) érhetik őket el, melyek számára a sejthártya szabadon átjárható. A sejtfelszíni receptorokhoz ezzel szemben olyan ligandok kötődnek, melyek méretük és/vagy töltésük miatt nem tudnak átjutni a sejthártyán (SZEBERÉNYI 2004).

2. Célkitűzés

- A felhasznált szakirodalmi adatok alapján tudjuk, hogy Urocortin2 kezelés ERK foszforilációt, azaz aktivációt indukál PC12 sejtekben.
- Rendelkezésünkre állt az az információ is, hogy NGF (idegi növekedési faktor) kezelés hatására szintén bekövetkezik az ERK aktiváció ebben a sejttypusban.
- Ezen előzményekből kiindulva kutatócsoportunk Ucn2 és idegi növekedési faktor kombinált kezelését alkalmazta PC12 sejtekben, de a várt jelnövekedéssel szemben az együttes kezelés hatására egy köztes intenzitású aktiváció alakult ki.
- Ahhoz, hogy jobban megértsük, mely jelátviteli komponensek szükségesek az Ucn2 szignáltranszdukciójához PC12 sejtekben, jelátviteli utakban defektív sejt vonalakat használtunk. Ezzel az volt a célunk, hogy kiderítsük, vajon mi lehet a köztes aktiváció oka.
- A továbbiakban kombinált kezeléseket alkalmaztunk, hogy kiderítsük, vajon mely jelátviteli fehérje/fehérjék felelősek ezért a jelenségért, vagyis tulajdonképpen a gátlásért.

3. Anyagok és módszerek

3.1 PC12 sejtenyésztés

Kísérleteinkhez vad típusú PC12 sejteket, illetve ennek valamely jelátviteli komponensére nézve mutáns sejtvonalat használtuk. 5% foetalis borjúsérumot és 10% hővel inaktivált lósérumot tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's médiumban (Sigma-Aldrich), standard tenyésztési körülmények között (37°C, 5% CO₂, 80% páratartalom) növesztettük a sejteket. A tápfolyadékot heti két alkalommal cseréltük. Kezeléshez kiültetés előtt a tenyésztő edény aljáról médiummal mostuk le a sejteket, majd ezt követően 1.000.000 sejtet ültettünk ki lemezenként. A kezelések előtt a sejtek szinkronizálása és általános jelesillapítás céljából 0,5%-os médiumban 24 órás séruméheztetést végeztünk.

3.2 PC12 sejtek kezelése

Patkány eredetű 10nM végkoncentrációjú Ucn2-vel (Sigma Aldrich) és idegi növekedési faktorról kezeltük a PC12-, MM17-26-, A126- és az nnr5 sejteket 5-, 15-, 30 percen, valamint 1-, 3-, 6- és 24 órán keresztül, illetve NGF-fel 15 perces kezelést végeztünk. Ezen felül PC12 sejteken Astressin2B-vel (Sigma Aldrich) való kombinált Ucn2 és NGF kezeléseket is végeztünk. Végül a kezelések leállítása és a sejtek roncsolása lízispufferben (50mM Tris-base, pH7.4, 150mM NaCl, 10%glycerol, 1mM EGTA, 1mM Na₃VO₄, 5μM ZnCl₂, 100mM NaF, 10μg/ml aprotinin, 1μg/ml leupeptin, 1mM PMSF, and 1% Triton X-100) történt.

3.3 Western blot analízis

Egykomponensű BioRad Protein Assay-t követően 595 nm-en mért abszorbania értékek alapján határoztuk meg a sejtízátumok fehérje koncentrációit, majd nátrium dodecil szulfát-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS- PAGE) választottuk szét egymástól a fehérjéket. A fehérjekivonatot az elválasztás előtt 3x-os koncentrációjú SDS pufferben (30% glicerol, 6%SDS, 200mM Tris-HCl, 0,03% brómfenolkék festék, 3% mercaptoetanol) feloldottuk, majd a fehérjemintákat pár percig forralással denaturáltuk. A 10%-os koncentrációjú poliakrilamid gél zsebeibe egyenként 30μg fehérjekivonatot mértünk be, majd 25mA/gél áramerősséggel a fehérjéket méret szerint szeparáltuk. A gélben lévő mintákat egy éjszakán át elektromos áram segítségével permeabilizált nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Az antitestek aspecifikus kötődésének minimalizására 3% koncentrációjú zsírmentes tejben

blokkoltuk a membránt, majd indirekt immunológiai jelöléssel detektáltuk a specifikus fehérjét. A poliklonális, nyúlban termelt anti-foszforilált ERK antitestet (Cell Signaling) 1:1000 arányban, 3% marha szérum albuminban oldva vittük fel a membránokra, majd 4°C-on éjszakán át így inkubáltuk. 2x5 perces, majd 3x10 perces TBS-T-s (10mM Tris-base (pH8), 150mM NaCl, 0,2% Tween-20,) mosással távolítottuk el a rendszerből a fehérjéhez nem specifikusan kötődött antitesteket. A membránokat ezután 5% zsírmentes tejben 1:10.000 arányban oldott, poliklonális, anti-nyúl, tormagyökér-peroxidáz (HRP) enzimmel kapcsolt, szekunder antitestekkel (Jackson Immunological) inkubáltuk 4°C-on, 1 órán át. A jelet röntgenfilmen, HRP katalizált kemilumineszcens reakcióval (Millipore Immobilon Western) detektáltuk. Ez után stripping pufferrel (0,2M glicin-HCl, 0,05M Tween 20, pH2,5) történő mosással leoldottuk az elsődleges és másodlagos antitesteket a membránokról, majd ugyanezen a membránon 1:1000 arányban zsírmentes tejben oldott, nyúl, poliklonális anti ERK-antitesttel (Cell Signaling) a fent leírtakhoz hasonló módon ellenőriztük a betöltött minták mennyiségét.

3.4 Adatelemzés

Kísérleteinket egymástól függetlenül, 3 alkalommal végeztük el. A Western blot analízis során kapott jeleket ImageJ szoftverrel denzitometráltuk, átlagukat grafikonon ábrázoltuk, melyen feltüntettük az egyes minták átlagtól való eltérését is. A detektált jelet minden esetben a foszforilált fehérje inaktív formájára normalizáltuk (loading kontroll).

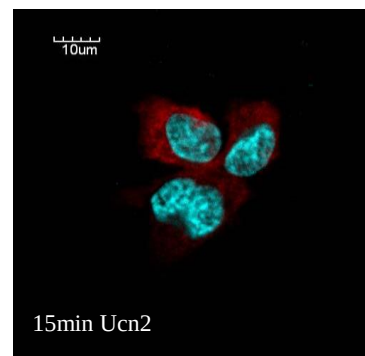
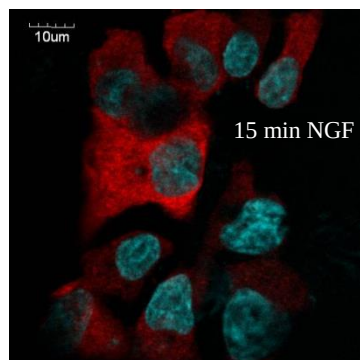
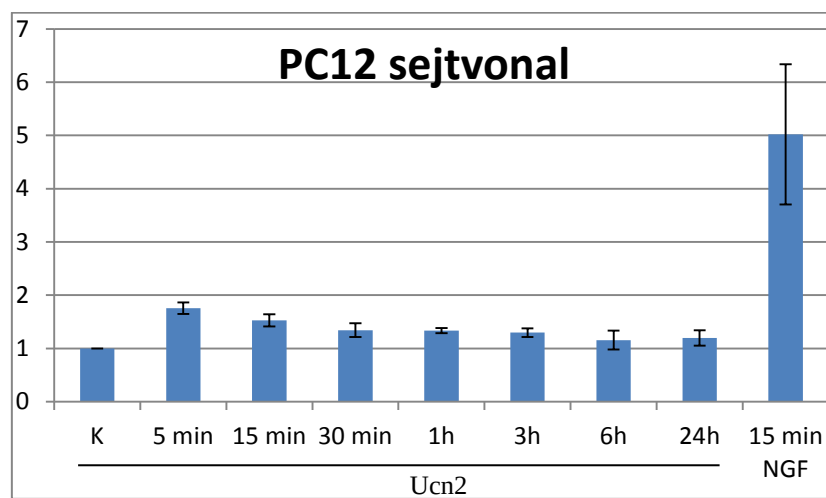
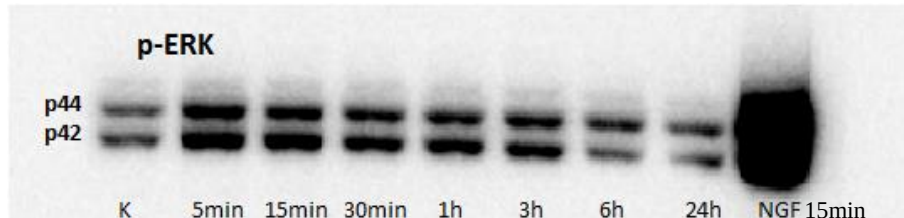
3.5 Immunfluoreszcencia

Immunfluoreszcens vizsgálatainkhoz 24-lyukú tenyésztőedénybe, alkohollal zsírtalanított fedőlemezekre, Bürker- kamrában történt sejtszámolást követően 50.000 sejtet ültettünk ki. A sejteket a kezeléseket megelőző éjszakán át 0,5%-os szérumtartalmú médiumban éhezettük. A kezeléseket 10nM végkoncentrációjú Ucn2-vel és NGF-fel végeztük. Ezt követően 4%-os paraformaldehiddel fixáltunk a fedőlemezeken lassú rázatás mellett, 4°C-on, egy órán át. Ezt követően a sejteket 2x5 percig mostuk foszfát-pufferelt sóoldatban (PBS: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 1,4mM KH₂PO₄), amit 2x10 perc mosás követett tris pufferelt sóoldatban (TBS: 50mM Tris-HCl (pH7,4), 150mM NaCl). 3%-os zsírmentes tejben történt az aspecifikus kötőhelyek blokkolása. Az elsődleges, poliklonális, nyúlban termelt anti-foszforilált ERK antitestet (Cell Signaling) 1:300 arányban, 3%-os zsírmentes

tejben oldva adtuk a sejtekhez, majd egy éjszakán át 4°C-on inkubáltunk. Ezek után a nem kötődött, elsődleges antitesteket 2x5 perc, majd 3x15 perc TBS-sel mostuk ki lassú rázatás közben. Ezt követően a másodlagos, Cyanin 3-mal konjugált poliklonális, anti-nyúl, fluoreszcens antitestet (Jackson Immunological) 1:600 arányban oldottuk 3%-os zsírmentes tejben, és a sejteket 4°C-on inkubáltuk az oldatban 1 órán keresztül. A nem kötődött másodlagos antitesteket 2x5 perc, majd 3x15 perc TBS -es mosással távolítottuk el. 5 perces, TBS-ben 1:10.000 arányban feloldott Hoechsttel (Calbiochem) végzett festéssel tettük láthatóvá a sejtmagokat. A Hoechst oldat leszívását követően, a felesleges festék eltávolítása végett a sejteket 3x15 percig TBS-ben mostuk. A preparátumokat Vectashilddel (Vector Laboratories Inc.) fedtük. A fluoreszcens jelet lézer-pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkóp segítségével jelenítettük meg. A preparátumokról egy Olympus Fluo View-1000 rendszer és a FW10ASW szoftver használatával felvételeket készítettünk.

4. Eredmények és értékelésük

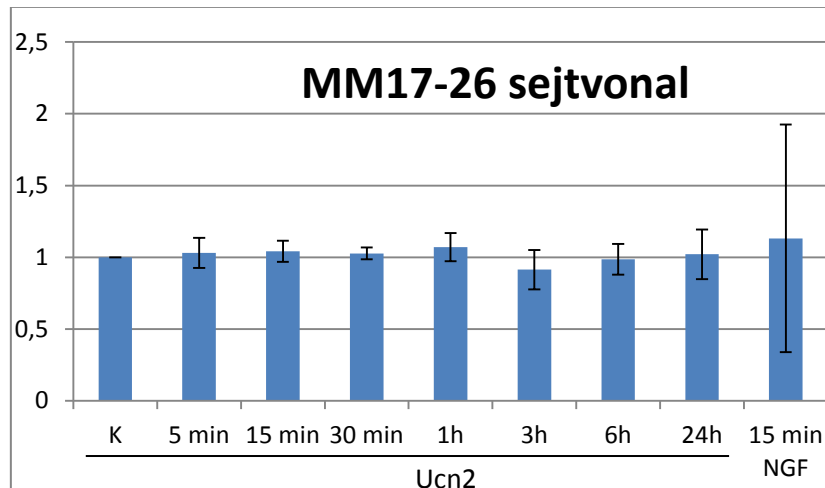
4.1 PC12 sejtek kezelése

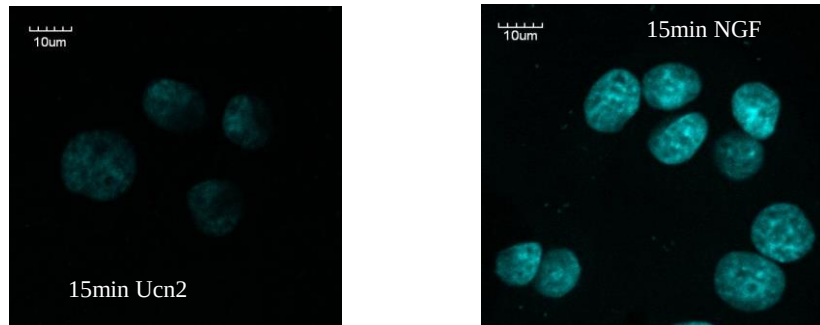


1. ábra: 10 nM végkoncentrációjú Urocortin2-vel, vagy NGF-fel történő kezelés hatása az ERK fehérje foszforilációjára Western bloton (felső ábra), a blot denzitometriája alapján kapott oszlop diagramok (középső ábra) és a 15 perces NGF és Urocortin2 kezelések foszfo-ERK jelének immunfluoreszcens felvétele (alsó ábra)

A PC12 sejteket 10nM végkoncentrációjú Urocortin2-vel kezeltük. Az eredmények azt mutatják, hogy 5 percnél kezdődik meg az ERK foszforiláció, majd a 15. perc után kezd el csökkenni. Így sikerült kimutatnunk, hogy van ERK foszforiláció Urocortin2 kezelést követően PC12 sejtekben. NGF kezelés hatására az Ucn2 kezelésnél erősebb ERK aktiváció figyelhető meg. Az oszlopdiagram számszerűsítve is mutatja az ERK aktiváció mértékét az egyes kezelések esetében. Immunfluoreszcencia vizsgálattal is igazoltuk az ERK aktivációt PC12 sejtekben NGF és Ucn2 kezelés hatására, ahol is jól látható az ERK foszforiláció a citoplazmában mindkét kezelés hatására.

4.2 MM17-26 sejtvonal vizsgálata

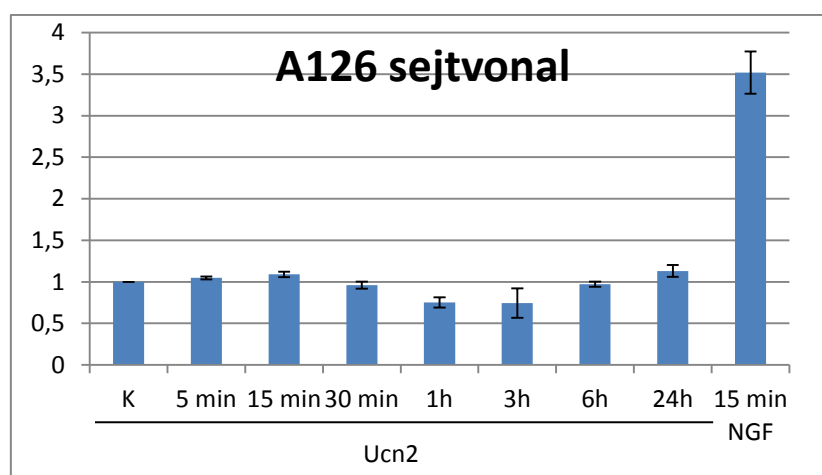
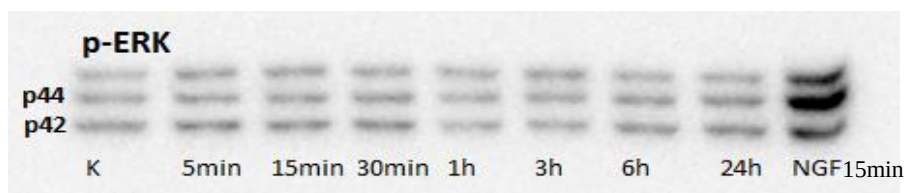


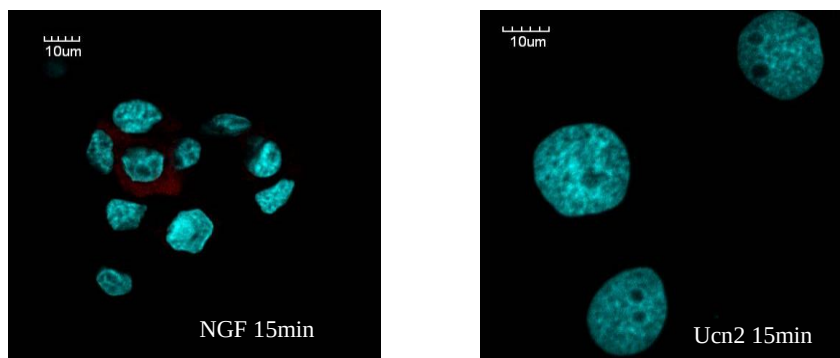


2. ábra: 10 nM végkoncentrációjú Urocortin2-vel és NGF-fel történő kezelés hatása az ERK fehérje foszforilációjára Western bloton (felső ábra), a denzitometria alapján kapott oszlop diagramok (középső ábra) és a 15 perces Ucn2 és NGF kezelések immunfluoreszcens felvétele (alsó ábra)

Domináns gátló Ras-t expresszáló MM17-26 sejtvonalban Western blottal nem figyelhető meg Ucn2-vel, vagy NGF-fel történő kezelés hatására. Ezt az oszlopdiagram is mutatja. Az immunfluoreszcens felvételek alapján jól látható, hogy nincs ERK aktiváció sem a sejtplazmában, sem a magban egyik kezelés hatásár sem. Így azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Ras fehérje részt vesz az Ucn2 jelátvitelében, ami vad típusú PC12 sejtekben az ERK foszforilációjához vezet.

4.3 A126 sejtvonal vizsgálata

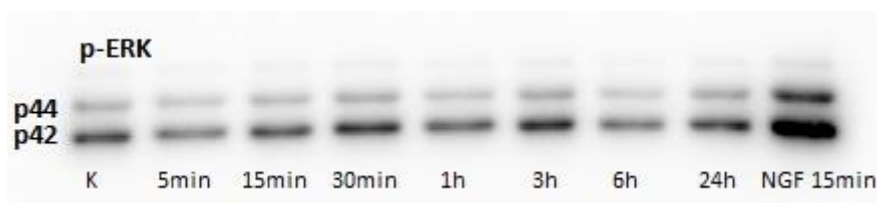


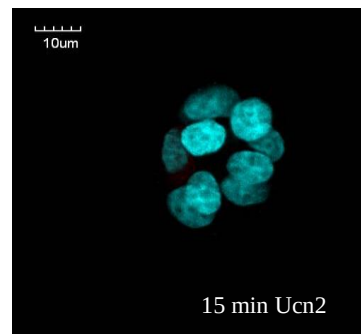
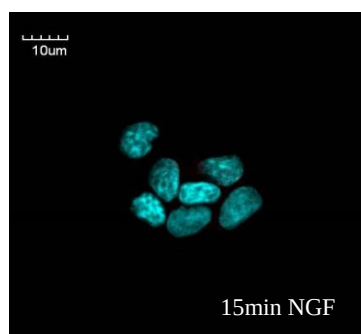
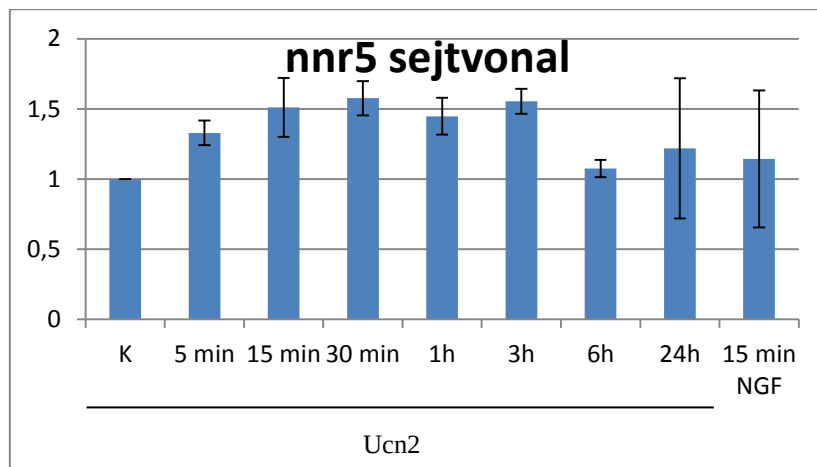


3. ábra: 10 nM végkoncentrációjú Urocortin2-vel és NGF-fel történő kezelés hatása az ERK fehérje foszforilációjára Western bloton (felső ábra), a denzitometria alapján kapott oszlop diagramok (középső ábra) és a 15 perces idegi növekedési faktor és Urocortin2 kezelések immunfluoreszcens felvétele (alsó ábra)

Az A126 sejtvonal PKA-ra defektív sejtvonal. Ahogy azt a Western blot analízis is mutatja, ebben a sejtvonalban sem figyelhető meg ERK aktiváció Ucn2 kezelés hatására. Denzitometriával is alátámaszthatjuk ezen megfigyeléseinket, melyeket szintén megerősítettünk immunfluoreszcencia segítségével. Ez alapján itt is elmondhatjuk, hogy Urocortin2 kezelés hatására nem alakul ki ERK aktiváció A126 sejtvonalban. NGF hatására is a kontrolhoz képest egy a vad típusú PC12 sejtben mérhetőnél jóval gyengébb foszforiláció figyelhető csak meg. Ezen eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a proteinkináz A egy fontos komponens az Ucn2 jelátvitelében PC12 sejtekben, viszont ez az enzim a növekedési faktorok hatását nem befolyásolja olyan erősen.

4.4 *nnr5* sejtvonal vizsgálata

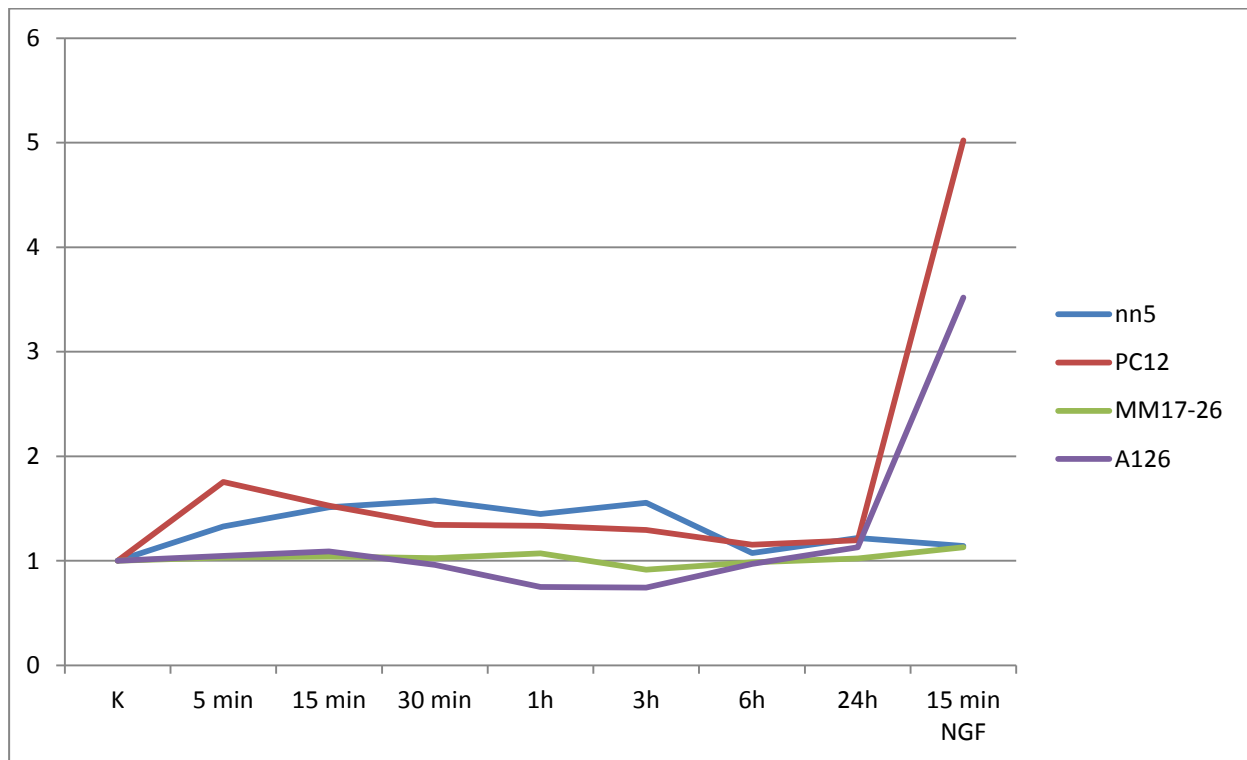




4. ábra: 10 nM végkoncentrációjú Urocortin2-vel és NGF-fel történő kezelés hatása az ERK fehérje foszforilációjára Western bloton (felső ábra), a denzitometria alapján kapott oszlop diagramok (középső ábra) és a 15 perces idegi növekedési faktor és Ucn2 kezelések immunfluoreszcens felvétele (alsó ábra)

Az nnr5 sejt vonal a TrkA-ra defektív, ami az idegi növekedési faktor nagy affinitású receptora. A Western blot analízis alapján elmondható, hogy ebben a sejt vonalban Urocortin2 kezelés hatására hasonlóan, mint vad típusú PC12 sejtekben, van ERK aktiváció, vagyis a TrkA receptor nem vesz részt az Ucn2 jelátvitelében. NGF kezelés hatására a vártaknak megfelelően nincs ERK foszforiláció, hiszen az NGF receptora nem működik ebben a sejt vonalban, így a Ras/ERK út sem tud ebből az irányból aktiválódni. A Western blot analízist követő denzitometria szintén jól tükrözi az említett következtetéseket, amikkel az immunfluoreszcens felvételek is egybevág.

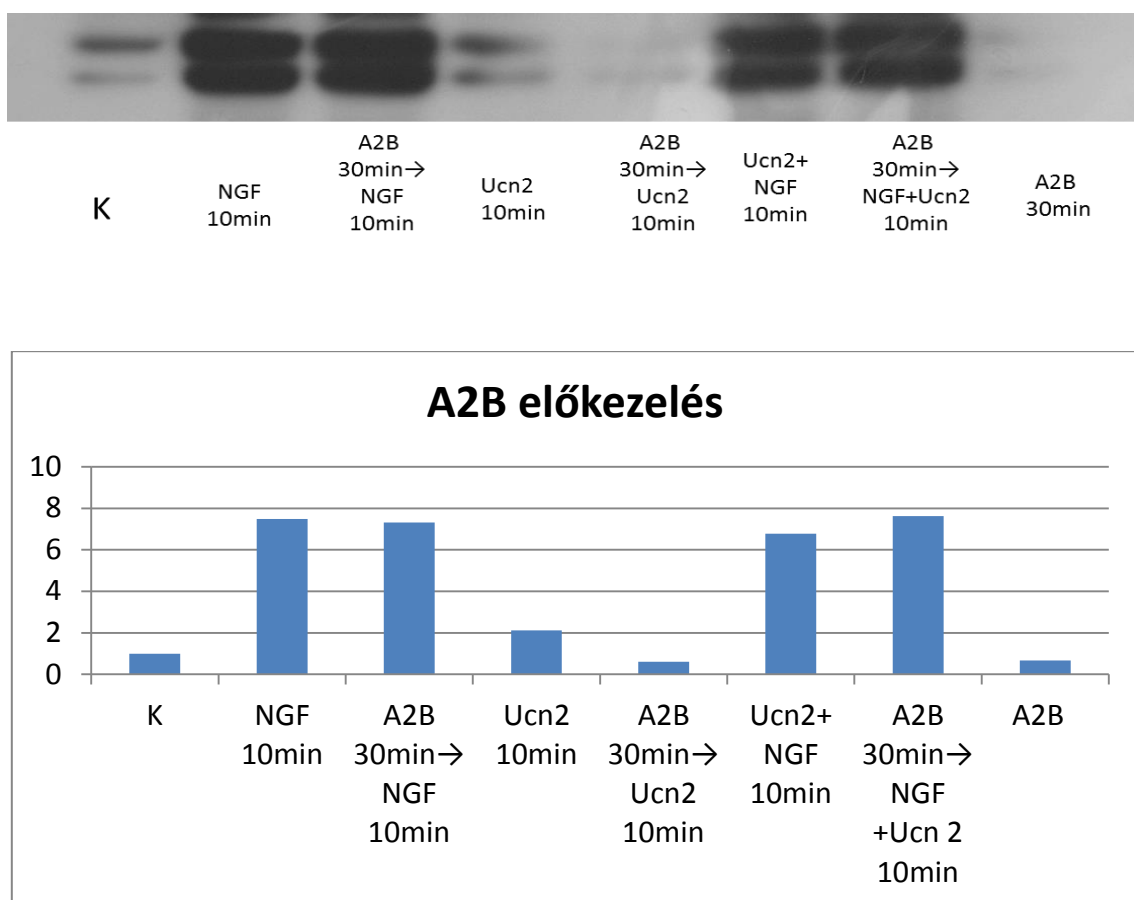
4.5 Részösszefoglalás



5. ábra: A különböző, vizsgált sejtvonalak (A126, MM17-26, PC12, nn5) Urocortin2, vagy NGF kezelésekre adott ERK aktivációs válaszai

Az 5. ábra grafikonja a 4 sejtvonala egyes kezelésekre adott ERK aktivációs válaszait összegzi. Jól látható, hogy PC12 sejtvonala Ucn2 kezelés hatására az 5. percnél kezdődik az ERK aktiváció és a 15-30. perc után kezd el csökkenni, míg NGF kezelés esetében egy jóval erősebb ERK foszforiláció alakul ki. A domináns negatív Ras-t tartalmazó MM17-26 sejtvonala esetében nincs ERK aktiváció sem Ucn2, sem NGF kezelés hatására. A proteinkináz A-ra defektív A126 sejtvonala Ucn2 kezelést követően és idegi növekedési faktor hatására is csak egy gyenge aktiváció figyelhető meg. Tehát elmondhatjuk azt, hogy a PKA és a Ras fontos komponensei az Ucn2 jelátvitelének PC12 sejtekben, míg a Trk receptor nem vesz részt az Ucn2 jelátvitelében. Ezen eredményeink után kezdtük el az Ucn2- és NGF-fel történő kombinált kezeléseinket.

4.6 A2B-vel előkezelt PC12 sejtek

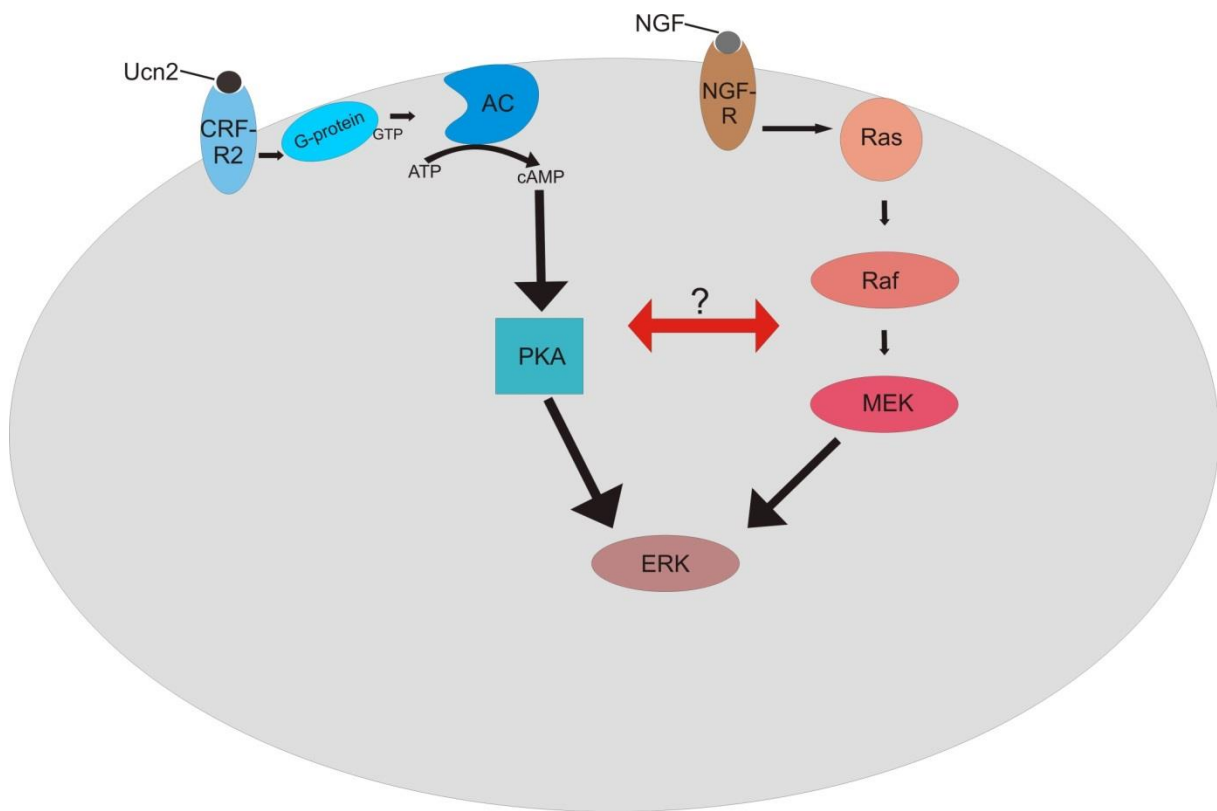


6. ábra: 10 nM végkoncentrációjú Ucn2, NGF és astressin2B kombinált kezeléseinek hatása az ERK fehérje foszforilációjára Western bloton (felső ábra) és a denzitometria alapján kapott oszlopdiagramok (alsó ábra). Kellő számban elvégzett megbízható ismétlés hiányában csak az első kísérlet eredményeit mutatjuk.

A PC12 sejteket astressin2B-vel kezeltük, mely a CRF-R2 β típusú receptort, vagyis az Urocortin2 receptorát szelektíven blokkolja. 10 perces NGF kezelés hatására erős ERK aktiváció figyelhető meg, míg ezt megelőző 30perces astressin2B előkezelés hatására szintén erős ERK aktiváció indukálódik. Ezek alapján elmondhatjuk azt, hogy az astressin2B nincs hatással az NGF receptorára. 10 perces Ucn2 kezelés hatására szintén kialakul az ERK aktiváció, de ha ezt megelőzte a 30 perces astressin2B-vel való előkezelés, akkor nem jött létre az ERK aktiváció. Urocortin2 és idegi növekedési faktor kombinált 10 perces kezelése során azt tapasztaltuk, hogy köztes aktiváció alakul ki, míg ha ezt a kombinált kezelést megelőzte a 30 perces astressin2B-vel való előkezelés, akkor olyan mértékű ERK aktivációt kaptunk, mintha csak önmagukban NGF-fel kezeltük volna a sejteket. Úgy tűnik tehát, hogy az astressin2B nincs hatással az NGF jelátvitelére, míg az Urocortin2 szignáltranszdukciójára

igen. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a PKA és a Ras/ERK út nem receptor szinten hatnak egymásra.

5. Összefoglalás és jövőbeli céljaink



7. ábra: Urocortin2 és NGF kezelések hatása a cAMP és a Ras/ERK jelátviteli utakra PC12 sejtekben

Az Ucn 2 egy CRF receptor ligand, melynek egyedi szövettani eloszlása és számos funkciója ismert. Élettani hatásait legtöbbször a sejtfelszíni, G-protein-kapcsolt CRF2-receptor által közvetíti, de más alternatív útvonalak aktivációját is megfigyelték. Mivel Ucn2 kezelést követően hasonló ERK aktivációs kinetika volt megfigyelhető, mint NGF esetében, ezért kutatócsoportunk a két liganddal egyszerre történő, kombinált kezeléseket is végzett. Az eredmények itt némileg ellentmondtak a vártaknak, mert a két szer együttes hatására csak

némileg gyengébb foszforilációt figyelhettünk meg, mint amit az NGF egymagában ki tudott váltani. Mindezek alapján célunk az volt, hogy a jelátviteli utakat pontosabban feltérképezzük, és így a gátlás lehetséges okára is fényt derítsünk.

Eredményeik alapján azt mondhatjuk, hogy az Urocortin2 kezelés hatással van a cAMP-PKA és a Ras/ERK jelátviteli utakra. Ennek bizonyítéka a Ras illetve a PKA fehérjék kiiktatása, melynek következtében Ucn2 kezelés hatására nem alakul már ki ERK aktiváció PC12 sejtekben. Az A2B által blokkolt CRF-R2 β receptor nem vesz részt az NGF jelátvitelében, tehát nem receptor szinten történik a gátlás. Jövőbeli céljaink közé tartozik ezeknek a jelátviteli utaknak a további vizsgálata, illetve annak meghatározása, hogy mely további komponensek játszanak fontos szerepet az Ucn2 jelátvitelében PC12 sejtekben. Szeretnénk továbbá azt is kideríteni, hogy a cAMP és a Ras/ERK jelátviteli út hol mutat átfedést. A gátlás egyik lehetséges oka lehet a Rap1 fehérje, mely szintén része az ERK szignalizációs útnak, így további kísérleteink során erre a jelátviteli komponensre fogunk fókuszálni.