

<http://iv.iijournals.org/content/21/5/871.long>

## **Egy növényi eredetű vegyület, a Flavin 7 hatása az ERK jelátviteli útvonalra az immortalizált egér proximális tubuláris sejtekben**

### **Kivonat**

#### Háttér:

*Mivel a MAP kinázok (mitogén-aktivált protein kinázok) fontos útvonalai a sejtekben a külső ingerek belső jelekké történő átalakításának, annak meghatározása, hogy milyen lehetséges szerepük van a ráksejtekben, egy ígéretes módja lehet a rosszindulatú betegségek kezelésének és prognózisának. Korábbi kísérleteink szerint egy flavonoidban gazdag oldat, a Flavin 7, képes volt csökkenteni a vesetumor növekedését, in vivo.*

#### Anyagok és módszerek:

*A Flavin 7-nek az MAPK jelátviteli útvonalra gyakorolt hatásait immortalizált egér proximális tubuláris sejtekben, a sejt-életképesség áramlási citometriás elemzésével, luciferáz próbával, Western blotokkal határoztuk meg.*

#### Eredmények:

*Nem toxikus dózisban a Flavin 7 jelentősen csökkentette az ERK (extracelluláris szignál-regulált kináz) foszforilációját és az ERK kináz MEK1 gátlásán keresztül gátolta az olyan lefelé irányuló célpontjainak (downstream targets) az aktivitását, mint az ELK1 és a CREB.*

#### Következtetés:

*Azon képessége miatt, hogy ideiglenesen gátolja a vesedaganat növekedését és a MEK1/ERK útvonal aktiválódását in vitro, további in vivo kutatások szükségesek annak meghatározására, hogy milyen potenciális szerepe van a Flavin 7-nek a rosszindulatú betegségek kezelésében.*

A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád az egyik fő jelátviteli rendszer, amellyel a sejtek az extracelluláris jeleket intracelluláris válaszokká alakítják át. Ennek a kaszkádnak sok lépése konzerválódott és homológokat fedeztek fel különböző fajokban. Az első három emlős MAP kinázt, az ERK1-et, az ERK2-t és az ERK3-at az 1990-es évek elején klónozták, ami megkönnyítette a kutatásukhoz szükséges reagensek kifejlesztését. Egyértelművé vált, hogy az ERK1 és az ERK2 azon protein kinázok közé tartozik, amelyek a leggyakrabban aktiválódnak a jeltovábbító (szignál transzdukciós) útvonalakon. Elsősorban a sejtburjánzáshoz kötötték ezeket, sok más eseményben is fontos szerepük van. Az emlős sejtekben az ERK1 és az ERK2 – amelyekre gyakran hivatkoznak p44 és p42 MAP kinázokként is –, a MAPK család archetipusos tagjai. Ezért annak meghatározása, hogy a MAPK-ok milyen lehetséges szerepet töltenek be a ráksejtekben, egy ígéretes módszer lehet a rákos betegségek kezelésében és prognózisában.

A legutóbbi eredmények szerint az ERK útvonalak aktiválódása gyakori esemény a tumorgenezisben. Az ERK jelen van a sejt iniciációban, a daganat promóciójában és fejlődésében, az invázióban, a metasztázisban, valamint a programozott sejthalál és az angiogenezis szabályozásában – amelyek események alapvetően szükségesek ahhoz, hogy áttétes daganat alakulhasson ki (áttekintése az 5. számú hivatkozásban). Másrészt, az ERK

aktiválódás nem egyértelműen kedvező vagy káros hatású a rákos betegek számára, mert kimutatták róla, hogy a sejtburjánzást és a túlélést a normál sejtekben, valamint a daganatos sejtekben egyaránt beindítja.

A gyümölcs kivonatokban nagy mennyiségben megtalálható flavonoidok a daganatellenes hatásokat mutató szupernövények másodlagos metabolitjai. Tudott róluk, hogy antioxidáns és burjánzásgátló hatást gyakorolnak a daganatos sejtekre. A legújabb tanulmányokban azt taglalják, nem valószínű, hogy a flavonoidok klasszikus antioxidáns aktivitása lenne az egyetlen magyarázat a celluláris szinten kifejtett hatásukra. Ennek a hipotézisnek többféle érvelés is alapjául: **I)** a flavonoidok nagymértékben metabolizálódnak *in vivo*, így redox (redukciós-oxidációs) potenciáljuk lényegesen megváltozik és **II)** a flavonoidok és metabolitjaik *in vivo* felgyülemlett koncentrációi alacsonyabbak, mint a kis antioxidáns tartalmú tápanyagoké. A vizsgálatok azt jelezték, hogy tirozin kináz aktivitást gátló képességüknek köszönhetően a flavonoidok szelektíven lépnek kölcsönhatásba a MAPK jelátviteli útvonallal.

Egy természetes, hét különböző gyümölcs kivonatából álló vegyületet, a Flavin 7-et (F7) vizsgáltunk meg vesedaganat állatkísérletünkben. Ne/De daganat sejteket ültettünk be 6-8 hetes Fischer 344 patkányok vese kapszulája alá, és az állatokat humán ekvivalensnek megfelelő F7 kivonattal kezeltük a gyártó utasításainak megfelelően. Két hetes kezelés után a patkányokat leöltük, és meghatároztuk a daganatnövekedést. Az F7 jelentősen ( $p < 0.05$ ) csökkentette a daganatnövekedést *in vivo*.

A kutatás célja annak meghatározása volt, hogy az F7 hatással van-e az ERK jeladó útvonalra az immortalizált egér proximális tubuláris sejtekben.

## **Anyagok és módszerek**

### *Sejtkultúra*

A TKPTS sejtvonalat a Dr. Bello-Reuss-tól szereztük be, és 5 %-os CO<sub>2</sub> atmoszférában növesztettük 37°C-on a *di Mari és munkatársai* által leírtak szerint. A logaritmikusan szaporodó sejtek párhuzamos halmazait 2 ml sejtkultúra közegenként 50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl és 500 µl F7-tel kezeltük [a teljes energiatartalom 9.7 kJ, a fehérje 0.07 g, a zsír 0.02 g, a szénhidrátok 0.16 g, teljes polifenol 85 mg (flavonoid 75 mg, rezveratrol 0,16 mg) 8 v/v % alkohol/10 ml oldat] (Crystal Institute Kft. Eger, Magyarország).

### *Sejt túlélési és FACS (fluorescence-activated cell sorting/fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás) analízis*

A TKPTS sejteket különböző dózisu (50 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl és 500 µl F7/2 ml tenyészközeg) Flavin 7-tel kezeltük. A 24 órás kezelést követően az életképes sejtek számát egy hemocitóméterben, tripánkék kizárással határoztuk meg (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). A 100 µl F7-tel kezelt TKPTS sejteket a kezelést követően összegyűjtöttük a FACS analízis elvégzéséhez. Röviden: a tripszinizációt követően összegyűjtöttük a TKPTS sejteket, és egy éjszakán keresztül 70 %-os etanolban fixáltuk. Rnáz kezelést követően a sejteket 5 µg/ml PI-vel inkubáltuk, és az elemzést egy Becton Dickinson FACSCalibur

analizátorral (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) végeztük el. A sejtciklus profilt CellQuest szoftver (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA) alkalmazásával analizáltuk.

#### *Luciferáz próba*

A konszenzus CRE (ciklikus cAMP response element – cAMP válasz elem) kötési helyeinek négy direkt ismétlődését tartalmazó pCREluc plazmid (Stratagene, La Jolla, CA, USA) TKPTS sejtekbe történő tranziens transzfektálását GenePorter2 reagenssel (GenLantis, San Diego, CA, USA)  $\beta$ -galaktidáz plazmiddal (Promega, Madison WI, USA), együttesen végeztük el a máshol már leírtak szerint. A pFR-Luc riporter plazmidot a pFA2-ELK1 transzaktivátor plazmiddal együtt (Stratagene, La Jolla, CA, USA) ugyancsak tranziens módon transzfektáltuk a TKPTS sejtekbe. Huszonnégy órával a transzfekció után a sejteket Flavin 7-tel kezeltük (50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 300  $\mu$ l F7/2 ml tenyészközeg 12 óráig). A luciferáz aktivitás Luciferase Assay Kit-tel (Promega, Madison, WI, USA) került meghatározásra, míg a  $\beta$ -galaktidáz kontroll körülmények között, és 18 órával az F7 kezelést követően határoztuk meg. Megmértük a relatív luciferáz aktivitást és ezt arra az aktivitásmennyiségre normalizáltuk, amelyet az együtt transzfektált  $\beta$ -galaktidáz plazmidra mutattunk ki (Invitrogen, La Jolla, CA, USA).

#### *Western blotok*

A logaritmikusan növekvő sejtek halmazait 2 ml sejt tenyészet közegenként 100  $\mu$ l F7-tel kezeltük. Az F7-tel történt kezelés után 30 perccel, 1 órával, 2 órával, 6 órával a közeget eltávolítottuk, a sejteket egyszer átmostuk PBS-sel, és 50  $\mu$ l/ml proteináz gátló koktélt (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 100  $\mu$ mol/ml nátrium ortovanadátot (Sigma Chemical Co.), és 100  $\mu$ g/ml fenilmetilszulfonil fluoridot (PMSF) (Sigma Chemical Co.) tartalmazó radioimmuno-precipitációs próba (RIPA) pufferben összegyűjtöttük, a máshol már leírtaknak szerint. A proteintartalmat a Bio-Rad Protein Determination assay-jel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mértük meg, és 50  $\mu$ g fehérjét cseppentettünk polivinilidén fluorid membránokra. A membránokat ezután egy éjszakán keresztül 5 ml 5 %-os tejoldatban foszfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), ERK 1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), foszfo-MEK (Ser217/221) és MEK (Cell Signaling Technology) elsődleges antitesttel hibridizáltuk a gyártó utasításainak megfelelően. Átmosást követően a membránokat torna peroxidázzal (HRP/horseradish-peroxidase) konjugált másodlagos antitesttel hibridizáltuk 2 ml 5 %-os tejoldatban 45 percig. A sávokat erősített kemilumineszcens (ECL) módszerrel tettük láthatóvá (Amersham, Piscataway, NJ, USA) és denzitometriával kvantifikáltuk (UnScan-It 6.1; Silk Scientific, Orem, UT, USA).

#### *Statisztikai elemzés*

A kezelt és a kontroll minták közötti statisztikai eltéréseket Student's-féle párosított t-próbával határoztuk meg. A középértékek közötti különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a  $p < 0.05$  volt. Az elemzésekhez a SigmaStat 3.5 szoftvercsomagot használtuk.

## Eredmények

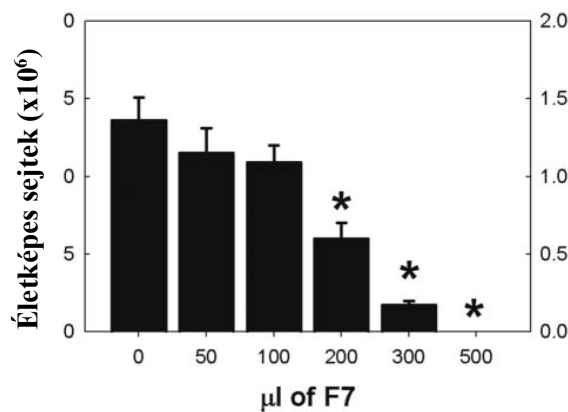
### *Az F7 kezelés sejtek életképességére gyakorolt hatásai*

A lyukanként 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l 300  $\mu$ l és 500  $\mu$ l F7-tel kezelt TKPTS sejteknél azt láttuk, hogy a 200  $\mu$ l, a 300  $\mu$ l és az 500  $\mu$ l F7 jelentősen csökkentette a sejtek számát a tenyészetben, míg az 50  $\mu$ l-es és a 100  $\mu$ l-es kezelésnek nem voltak ilyen hatásai (**1. ábra**). A 100  $\mu$ l F7-tel kezelt TKPTS sejtek FACS elemzése azt mutatta, hogy az F7 nem változtatta meg szignifikánsan a sejtek sejtciklusának eloszlását (**2. ábra**). Mivel az 50  $\mu$ l vagy 100  $\mu$ l F7 alkalmazásakor nem láttuk, hogy ez az életképességre citotoxikus hatást gyakorolt volna, vagy változást idézett volna elő abban, a további vizsgálatainkhoz a lehető legnagyobb terápiás dózis biztosítása érdekében a 100  $\mu$ l F7 dózist választottuk.

### 1. ábra

#### *Az F7 kezelés hatása a TKPTS sejtek túlélésére*

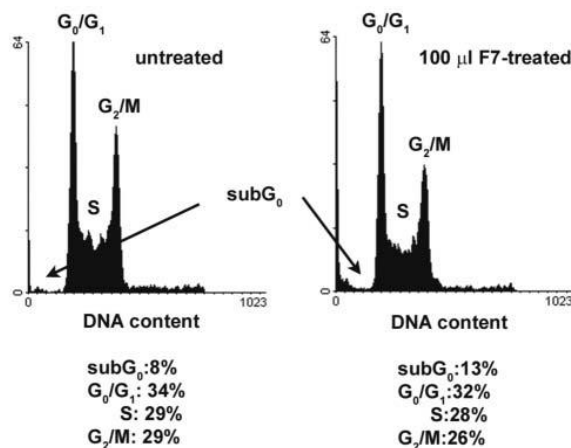
*A sejt számot tripánkék kizárással határoztuk meg (közéérték  $\pm$  SD, n = 3, \*p < 0,00 összehasonlítva a nem kezelt kontrollal).*



### 2. ábra

#### *Az F7 hatása a TKPTS sejtek sejtciklus progressziójára*

*A TKPTS sejteket 100  $\mu$ l F7-tel kezeltük 24 órán keresztül, majd az „Anyagok és módszerek” részben leírtak szerint FACS analízist végeztünk. Megadjuk a sejtciklus különböző fázisaiban meglévő sejtek százalékos arányát. Az adatok három külön kísérlet eredményeit jelenítik meg.*



(treated – kezelt; untreated – kezeletlen)

### Az F7 kezelés ERK és a MEK foszforilációra gyakorolt hatásai

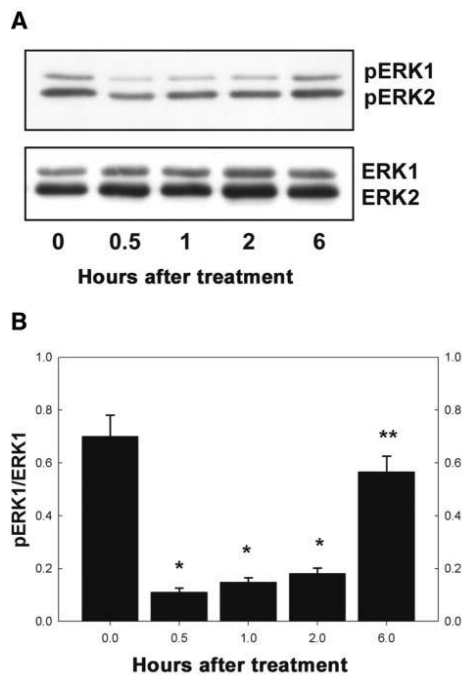
A következő lépésben azt határoztuk meg, hogy az F7 kezelés befolyásolta-e az ERK foszforilációt. Ahogyan az a **3. ábrán** bemutatásra kerül, a TKPTS sejtekben a foszfo-ERK mennyiségei jelentősen és tranziensen csökkentek a F7-tel való kezelését követően (**3A és B ábra**). Mivel az ERK a MEK upstream kinázán keresztül aktiválódott, az érdekelt bennünket, hogy az F7 az ERK foszforilációt annak kinázán keresztül befolyásolja-e. A Western blot eredményei szerint az F7 csökkenti a MEK foszforilációt (**4A és B ábra**), az ERK-hez hasonlóan. Másfelől az ERK és a MEK teljes mennyiségei változatlanok maradtak.

### 3. ábra

#### Az F7 hatása az ERK foszforilációra a TKPTS sejtekben

(A) A TKPTS sejteket 100 $\mu$ l F7-tel kezeltük a jelzett ideig. Az ERK foszforilációját Western blottal határoztuk meg, csak a foszforilált formát felismerő antitestet használva. Terheléses kontrollként meghatároztuk a teljes ERK szinteket is. Az adatok három külön kísérlet eredményeit mutatják.

(B) Az (A) ábrarészen mutatott Western blotok denzitometriája. A pERK/ERK1 arányainak megadása (középérték  $\pm$  SD, n = 3; \*p < 0,001 összehasonlítva a nem kezelt kontrollokkal, \*\*p < 0,001 összehasonlítva a 0.5, 1.0 és 2.0 órás kezeléssel).

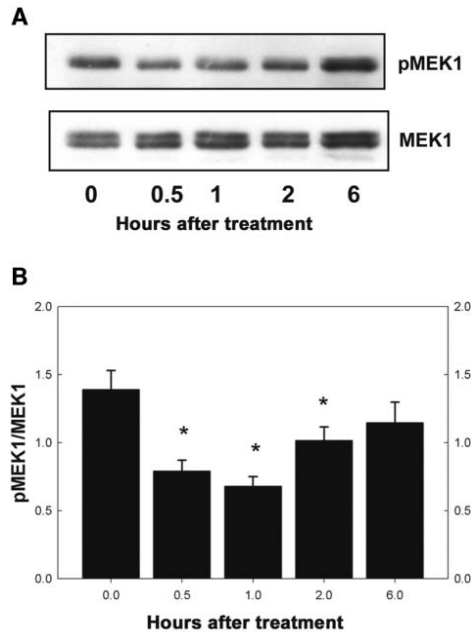


#### 4. ábra

##### Az F7 hatása a MEK1 foszforilációra a TKPTS sejtekben

(A) A TKPTS sejteket 100 µl F7-tel kezeltük a jelzett ideig. A MEK1 foszforilációját Western blotokkal határoztuk meg, csak a foszforilált formát felismerő antitestet használva. Terheléssel kontrollként meghatároztuk a teljes MEK1 szinteket is. Az adatok három külön kísérlet eredményeit mutatják.

(B) Az (A) ábrarészen mutatott Western blotok denzitometriája. Az pMEK1/MEK1 arányainak megadása (középvérték ± SD, n = 3; \*p < 0,001 összehasonlítva a nem kezelt kontrollokkal).



##### Az F7 kezelés hatásai az ERK downstream funkciójára

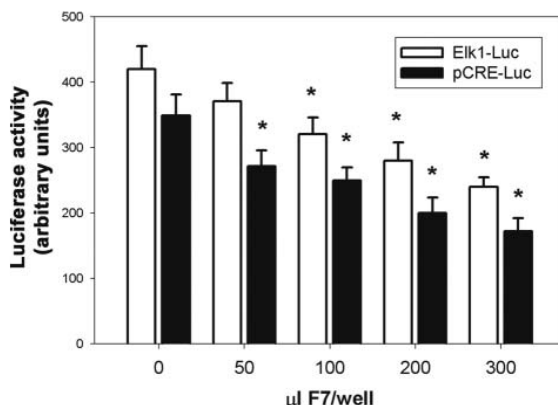
Az aktivált ERK aktiválja a célpont-specifikus transzkripciót indukáló downstream célokat, ami a része a túlélés jelátvitelnek. Az ELK1 egyike az ERK downstream célpontjainak, aminek az aktivitását egy transzaktiváló rendszer követhette, ahol az ELK aktivátor plazmid inicializálja a luciferáz riporter plazmid aktivitását. Ennek megfelelően a TKPTS sejteket azokkal a plazmidokkal együtt transzfektáltuk és 50 µl, 100 µl, 200 µl és 500 µl F7/2 ml tápközeggel kezeltük 18 órán keresztül. Ahogyan az **5. ábrán** látható, az ELK1 aktivitás jelentősen csökkent az F7 kezelést követően, hasonlóan az ERK foszforilációhoz (**3. ábra**). Ezek a megfigyelések azt a következtetést engedik levonni, hogy az F7 kezelés gátolja az ERK funkciót.

A cAMP rezponzív elemkötő protein (CREB) az ERK/p90rsk általi foszforiláción keresztül aktiválódik. Az aktivált CREB transzkripcióesemények sorozatát inicializálja azzal, hogy mint a túlélési mechanizmus része, a CREB rezponzív gének promótereire kötődik. Annak meghatározására, hogy vajon az F7 befolyásolja-e a CREB-mediált transzkripciót is, a TKPTS sejteket tranziensen transzfektáltuk CREB rezponzív pCRE-Luc plazmiddal. Ahogyan azt az **5. ábra** mutatja, az F7 kezelés jelentősen gátolta a CREB-mediált transzkripciót.

## 5. ábra

### Az F7 hatása az ERK downstream funkciójára

A TKPTS sejtek tranziens transzfektálását vagy pFR-Luc riporterrel és pFA2-Elk1 transzaktivátor plazmidokkal,  $\beta$ -galaktozidáz plazmiddal együttesen (üres oszlopok), vagy pedig pCRE-Luc és  $\beta$ -galaktozidáz plazmiddal (tele oszlopok) végeztük el, az „Anyagok és módszerek” részben leírtak szerint. 24 óra eltelte után a sejteket 12 órán keresztül F7-tel kezeltük, és a luciferáz aktivitással együtt meghatároztuk a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást is. A luciferáz aktivitást a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásra normalizált luciferáz aktivitás arányaként számítottuk ki (közéérték  $\pm$  SD,  $n = 3$ ; \* $p < 0.00$ , a nem kezelt kontrollal összehasonlítva).



## Tárgyalás

A flavonoidok nagy részét teszik ki a természetben előforduló polifenol növényi vegyületeknek. Az emberi étrend általában nagyjából napi 1 g, vagy ennél több flavonoidot tartalmaz, ami egy olyan mennyiség, amely farmakológiai szempontból jelentős koncentrációkat képez a testnedvekben. A flavonoidokról megállapították, hogy nemcsak, hogy gátolják a daganatos sejtnövekedést, de sejt differenciálódást is indukálnak. A flavonoidoknak a rosszindulatú sejtek növekedésére gyakorolt gátló hatása részben a sejtburjánzás szabályozásában szerepet játszó kináz aktivitásokat elnyomó hatásának tudható be.

Újabb adatok szerint az olyan MAPK jelátviteli útvonal aktiválása, mint amilyen az ERK is, gyakori esemény a rákos betegségek kialakulásában, bár az ERK foszforiláció nem jelent egyértelműen előnyt vagy hátrányt a rákos betegséggel küzdő betegek számára. *Ye és munkatársainak* kutatása azt mutatta, hogy a MEK/ERK útvonal gátlása jelentősen fokozta a növekedés gátlását az MCF-7 mellrák sejtekben. *So és munkatársai* kimutatták, hogy a citrus flavonoidok hatékonyan gátolták az MDA-MB-435 humán mellrák sejtútvonal burjánzását *in vitro*, különösen a különböző egyéb élelmiszerekben található kvercetinrel párosítva.

Korábban arról számoltunk be, hogy az F7 kezelés képes csökkenteni az F344 patkányokba beültetett Ne/De vesedaganat növekedését. F7-tel kezelve a rákos megbetegedéssel összefüggő súlyvesztés ugyancsak mérséklődött a daganathordozó állatoknál. Ennek a daganatsökkentő hatásnak a mechanizmusát nem vizsgáltuk, de – más mechanizmusok mellett –, feltételezhető, hogy hatást gyakorol a MEK/ERK útvonalra.

Adataink szerint a flavonoidokban gazdag F7 fehérje kináz gátló aktivitással rendelkezik, és ez lehet a felelős a t MEK és ERK foszforiláció TKPTS sejtekben megfigyelt gátlásáért (**3. és 4. ábra**). Az, hogy az F7 közvetlenül hat-e a MEK-re vagy upstream kinázaira, további kutatás igényel. Adataink azt is mutatták, hogy az ERK foszforiláció gátlása olyan downstream funkcióinak a gátlását is eredményezte, mint amilyen az Elk1 vagy a CREB aktiváció (**5. ábra**).

Az ERK szerepet játszik különböző olyan celluláris folyamatokban, mint a differenciáció, a proliferáció és a túlélés. Figyelemre méltó, hogy – amint azt a FACS analízis is bizonyítja – az ERK-nak és funkciójának gátlása nem érinti a sejtciklus progressziót (**2. ábra**). Másrészt, feltehetően az ERK gátlásán keresztül, az F7 jelentős mértékben gátolta a CREB aktivitást is (**5. ábra**). Mivel a CREB a túlélési jelátvitel fontos eleme, ezek az eredmények arra utalnak, hogy az F7 a túlélési útvonalat, nem pedig a sejtburjánzást érinti a vese tubuláris sejtekben. Ezeknek a hatásoknak a mechanizmusai további kutatást igényelnek.

**Összefoglalva:** azon képessége miatt, hogy ideiglenesen gátolja a MEK/ERK útvonal aktivizálódását *in vitro*, és a daganatnövekedést *in vivo*, az olyan rosszindulatú megbetegedések esetében, ahol a túléléshez az MEK/ERK aktivációja szükséges, az F7, ez a természetes vegyület fontos lehet a rákos betegek szupportív terápiájában. Ezért további *in vivo* és *in vitro* kutatásokra van szükséges annak meghatározása, hogy milyen potenciális szerepet tölt be az F7 rosszindulatú betegségek kezelésében.