

**Az uterusban folyó sejtkepződés
szabályozásában szerepet játszó tényezők
hatásmechanizmusa**

Ph.D. értekezés

Lengyel Ferenc

Programvezető: Prof. Dr. Lénárd László, akadémikus

Témavezető: Prof. Dr. Vértés Marietta, DSci.

**Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Élettani Intézet**

Pécs, 2008

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Rövidítések jegyzéke.....	2
1. Bevezetés.....	3
2. Célkitűzések.....	12
3. Módszerek.....	13
3.1. Anyagok.....	13
3.2. Állatok.....	13
3.3. Kezelések.....	13
3.4. Human uterusz.....	15
3.5. Western blot.....	15
3.6. Szubcelluláris frakciók elválasztása.....	16
3.7. Kvantitatív RT PCR.....	16
3.8. Statisztika.....	17
4. Eredmények.....	18
5. Következtetések.....	44
6. Összefoglalás.....	53
7. Köszönetnyilvánítás.....	55
8. Irodalomjegyzék.....	56
A témához kapcsolódó tudományos közlemények:	67
Egyéb tudományos közlemények:	70

Rövidítések jegyzéke

AP1:	Activator protein-1
BAX:	Bcl-2-associated X protein
BIM-1:	Bcl2-interacting mediator of cell death-1 = Bcl-2-like protein 11
BSA:	Bovine serum albumine
CD1:	Ciklin-D1
Cdk:	Ciklin-dependens kináz
CREB:	cAMP response element binding protein
DMSO:	Dimetil-szulfoxid
DNA-PK:	DNS-függő protein kináz
E2:	17 β -ösztradiol
ER:	Ösztrogén receptor
ER α :	Ösztrogén receptor alfa
ER β :	Ösztrogén receptor béta
ERE:	Ösztrogén-reszponzív elem
α ERKO:	Ösztrogén receptor alfa 'knock-out'
β ERKO:	Ösztrogén receptor beta 'knock-out'
ERE:	Ösztrogén-reszponzív elem
Fasl:	Fas-ligand
FOX:	Forkhead-box
G6Páz:	Glukóz-6 foszfatáz
gadd45:	Growth arrest and DNA damage-inducible 45
GPR30:	G-protein coupled receptor-30
GSK3 β :	Glikogén szintáz kináz-3 béta
HRP:	Horseradish peroxidase
ILK:	Integrine linked kinase
LPL:	Lipoprotein lipáz
MnSOD:	Manganáz-szuperoxid dizmutáz
MAPK:	Mitogen activated protein kinase
NGF:	Nerve growth factor
eNOS:	Endotéliális nitrogen-monoxid szintáz
p130:	Retinoblastoma-like protein 2
p27kip1:	Kinase interacting protein 1 = cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
PDHK 4:	Piruvát dehidrogenáz kináz 4
PDK1:	Foszfatidilinozitol 3-foszfát dependens kináz-1
PH:	Pleckstrin homology
PI3K:	Foszfatidilinozitol-3 kináz Ia
PKB:	Protein kináz B
PLK:	Polo-like kináz
SDS:	Nátrium-dodecil-szulfát
SGK:	Serum and glucocorticoid induced kinase
SHIP:	SH2 Domain-containing Inositol 5'-Phosphatase
SP1:	Selective promoter factor 1
c-src:	Cellular-src
TBS:	Tris-Buffered Saline
YAP:	Yes-associated protein of 65 kDa

1. Bevezetés

Az ösztadiol (E2) hatásait az ösztrogén receptorokon (ER) keresztül fejti ki. Elsőként a human ER cDNS-ét izolálták (Green S et al., 1986), röviddel a glukokortikoid receptor (Hollenberg S M et al., 1985) után. Ezidőtájt izolálták a tiroid receptor cDNS-ét is (Weinberger C et al., 1986). Hamarosan világossá vált, hogy ezek (és a többi, később felfedezett nukleáris receptor) egy új nagycsaládot alkotnak, a nukleáris receptorok nagycsaládját (Weinberger C et al., 1987). A nukleáris receptorok általános szerkezete igen konzervált. N-terminális végükön egy A/B domén található, amit a DNS-kötő domén követ. A DNS-kötő domént a ligand-kötő doménnel egy összekötő szakasz kapcsolja össze. Az ER molekulák C-terminális végén egy - nem minden nukleáris receptorban jelenlévő - rövid F-domén van. Legalább két aktivátor funkciós szakasz található az ER-okon: az A/B domén tartalmaz egy vagy két ligandfüggetlen transzkripció aktivátor funkciót (AF I), a ligand-kötő domén pedig egy, a ligandfüggő transzkripció aktivitásért felelős funkciót (AF II, Gronemeyer H et al., 1987).

Az A/B domén a legkevésbé konzervált a nukleáris receptorok között, és ennek a doménnek a szerkezete a legkevésbé ismert jelenleg. Régebben - viszonylag kevés adat birtokában - meglehetősen rendezetlen szerkezetűnek gondolták. Azonban az utóbbi években intenzívebben kezdték kutatni, és kiderült, hogy - bár nincs egy olyan egységes szerkezete, mint a ligand-kötő doménnek - mégsem rendezetlen struktúrájú, hanem rövidebb rendezett szakaszokból épül fel (Lavery D N, McEwan I J, 2005). Ez a domén tartalmazza a molekula foszforilációs helyeinek túlnyomó többségét, és elsősorban regulációs szerepe van, valamint az ER ligandfüggetlen aktivációjáért felelős.

A DNS-kötő domén szekvenciája a legkonzerváltabb a nukleáris receptorok között. Két cink-ujjat tartalmaz, amelyek a közül az első (N-terminálisan elhelyezkedő) a megfelelő DNS szekvencia felismerésében és a DNS kötésben játszik szerepet, míg a második a receptor dimerizációjában.

Az összekötő szakasz egyrészt lehetővé teszi a DNS-kötő és a ligand-kötő domén egymástól viszonylag független elmozdulását, szerkezetének változását, másrészt pedig tartalmaz egy nukleáris lokalizációs szekvenciát. Ezen kívül az összekötő

szakasz N-terminális része szerepet játszik a DNS felismerésben, a C-terminális vége pedig a transzkripció kofaktorok kötésében.

A ligand-kötő domén túlnyomórészt alfa-hélicekből áll, és nagymértékben rendezett szerkezetű. Az alfa-hélicek egy hidrofób ligandkötő zsebet képeznek, amibe beleillik a megfelelő ligand (agonista vagy antagonist). A ligand kötése után egy alfa-hélix (a 12-es) „csukódik” a ligand fölé (Tanenbaum D M et al., 1998). Agonista esetében ez a szerkezeti változás olyan kötőhelyet tesz szabaddá, amely transzkripció koaktivátorokat köt meg. Ha antagonist kötődik a receptorhoz, akkor másképp „csukódik” rá a 12-es alfa-hélix, a koaktivátor kötőhely rejtve marad, és a receptor inkább antagonistákat köt meg. Az ER különböző ligandjainak eltérő mértékű, és sokszor sejttípustól és szövettől függő agonista és antagonist hatásuk van (ezért szelektív ösztrogén receptor modulátoroknak hívják őket).

Az E2 többféle módon is befolyásolhatja a sejtek életfolyamatait. Legrégebben ismert hatásmechanizmusa a „klasszikus” ösztrogénhatás. Ennek során az E2 olyan gének transzkripcióját serkenti, amelyek promóter régiójában ösztrogén-reszponzív elemek találhatóak. (Ezek olyan, 13 bázispárnyi palindrom szekvenciák, amelyekhez nagy affinitással kötődik az ER.) Röviden, az E2 az ER-hoz kapcsolódik, majd az ER-E2 komplex a sejtmagba transzlokálódik, ahol dimerizálódik, és ösztrogén-reszponzív elemekhez kötődik. A DNS-hez kötődött, ligand-aktivált ER számos koaktivátor, a transzkripció beindítását elősegítő fehérje, pl.: CREB (Smith CL et al., 1996), AIB1 (Anzick SL et al., 1997), CARM1 (Lee Y H et al., 2005), SRC-1 (Onate SA et al., 1995), GRIP1 (Norris J D et al., 1998) segítségével kialakít egy preiniciációs komplexet, ami végül az adott gén transzkripciójának a fokozódásához vezet (Shibata H et al., 1997).

Az ligand-aktivált ER olyan gének transzkripcióját is serkentheti, amelyek promóter régiójában nincsenek teljes ösztrogén reszponzív elemek. Erre a két legismertebb példa az ER együttműködése az AP1 vagy az SP1 transzkripció faktorokkal. Az SP1 útvonal esetében egy fél ösztrogén-reszponzív elem található egy SP1 kötőhely mellett, és egy ER-SP1 dimer alakul ki ezen a hibrid transzkripció faktor kötőhelyen, ami serkenti a gén transzkripcióját (Salvatori L et al., 2003). Az AP1 útvonal során az ER nem közvetlenül a DNS-hez, hanem az AP1-hez kapcsolódik, és azon keresztül, indirekt módon kötődik a DNS AP1-kötő

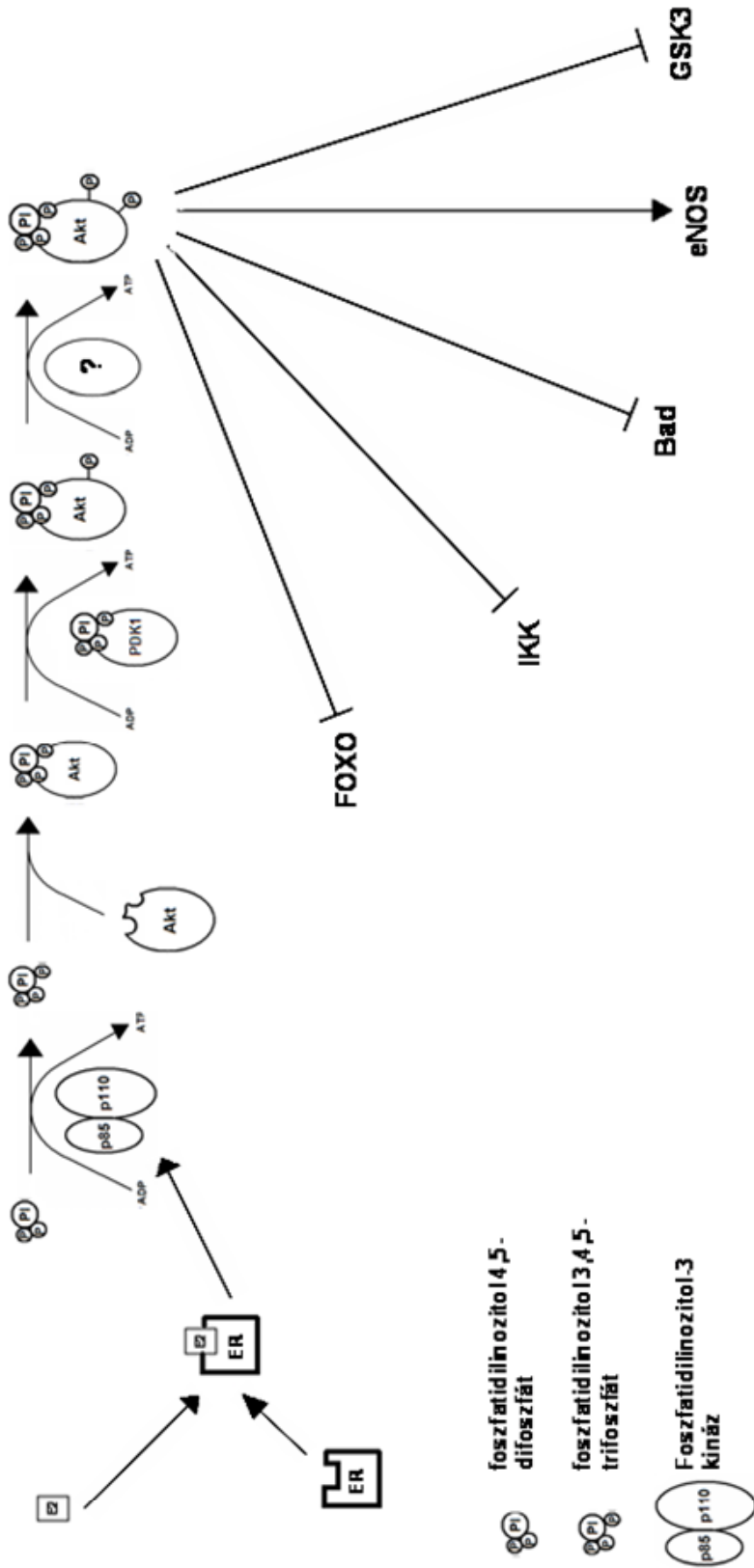
helyeihez. Ezen a módon AP1 kötőhellyel rendelkező promóterek működését is befolyásolhatja az E2 (Gaub, M et al., 1990).

Kuiper és munkacsoportja 1996-ban klónozott egy másik ER-t, az ER betát (ER β , Kuiper G G et al., 1996). Az ER α és ER β között nagyfokú hasonlóság van (a DNS-kötő doménjük 97%-os, a ligand-kötő doménjük 60%-os homológiát mutat), tehát két ER altípusról van szó. Altípusokat más szteroid receptoroknál is azonosítottak, azonban azok esetében a különböző altípusok egyetlen génről íródnak át, és alternatív promóterhasználat, vagy alternatív splicing útján képződnek. Ezzel szemben az ER α és ER β két különböző gén terméke. Bár a két receptor mind szerkezetében, mind pedig szekvenciájában meglehetősen hasonlít egymáshoz, hatásuk némileg eltérő, amire a legbeszédesebb példát az ER kiütött (α ERKO és β ERKO) állatok eltérő fenotípusos jellegzetességei szolgáltatják (Hewitt S C et al., 2005). Ezekből a kísérletekből úgy tűnik, hogy az ER α felelős az E2-nak az emlőmirigyek fejlődésére gyakorolt hatásáért, az LH termelésre gyakorolt gátló hatásáért, az uterusz normális fejlődéséért és E2 érzékenységeért, valamint hím állatokban a normális sperma termelésért. A fenti folyamatok β ERKO állatokban (ahol az ER β hiányzik, de az ER α jelen van) normális módon, vagy némileg csökkent hatékonysággal, de lejátszódnak. Az α ERKO állatok teljesen terméketlenek mindkét nemből, ezzel szemben a β ERKO hímek termékenysége normális, a β ERKO nőstények pedig, bár ritkábban esnek teherbe és az alomszámuk is kisebb, mint a vad allélt hordozó anyáké, de szaporodóképesek. A szaporodási viselkedésformák ugyancsak sérültek az α ERKO-, és normálisak a β ERKO állatokban. Az emlőkben és a májban például csak az ER α , a gasztrointesztinális rendszerben pedig csak az ER β expresszálódik, a legtöbb szövetben mindkét altípus jelen van, bár a két ER altípus expressziójának mértéke és egymáshoz viszonyított aránya sejttípusonként különböző, és az egyedfejlődés során is változhat (Weihua Z et al., 2000). Felnőtt uteruszban az elsődleges ER az ER α , és itt az ER β inkább az ER α negatív regulátoraként működik (Weihua Z et al., 2000). Azonban a két ER altípus szöveti eloszlása nem magyarázza az α és β ERKO állatok között tapasztalható különbségeket. E különbségek alapját inkább a két ER altípus által kiváltott hatások között kell keresnünk.

Az ER-ok képezhetnek homo- és heterodimereket is. A különböző dimerek vizsgálata lehetőséget nyújt a két ER altípus transzkripciós hatásainak vizsgálatára. Mivel az ER α és az ER β DNS-kötő doménje 97%-os egyezést mutat, ugyanazt a DNS szekvenciát ismerik fel. Azonban az A/B doménjük közötti különbség elég nagy ahhoz, hogy az eltérő transzkripciós hatásokra magyarázatul szolgáljon. Kimutatták, hogy az ER β A/B doménjében található AFI aktivitása igen gyenge, és ez a domén tartalmaz egy transzkripciós represszor funkciót, aminek segítségével gátolni képes az ER α transzkripciós aktivitását (Hall J M, McDonnell D P, 1999). Az ER β nem csak heterodimer formában gátolhatja az ER α aktivitását. Egyes API kötő helyeken, amiket az ER α aktivál, represszorként működik (Paech K et al., 1997). Fontos felismerés volt, hogy az ER α -ER β heterodimer transzkripciósan akkor is aktív, ha csak az egyik partner képes ligand kötésre, azonban mindkét AFII régióra szükség van, tehát a két partner mintegy egymást kiegészítve, egy minőségileg új egységet alkotva fejti ki a hatását (Tremblay G B et al., 1999). Újabb vizsgálatok megerősítették, hogy az ER heterodimerek nem egyszerűen a két ER altípus keverékei, hanem saját, mindkét homodimertől eltérő hatással vannak a sejtek transzkripciójára (Monroe D G et al., 2005; Liu Y et al., 2008).

A fenti, genomikus hatások közös jellemzője, hogy megváltoztatják a sejtek transzkripciós mintázatát azzal, hogy bizonyos gének expresszióját szelektíven fokozzák. A fiziológias hatásokért ezen gének termékei a felelősek. Vannak azonban olyan sejtélettani változások, amelyek túl gyorsan zajlanak le ahhoz, hogy génexpressziós változásokkal magyarázni lehetne őket, vagy transzkripciót gátló anyagok jelenlétében is lezajlanak. Ilyen gyors változások például a Ca²⁺ csatornák nyílása (Morley P et al., 1992), a cAMP szint emelkedése (Gu Q, Moss R L, 1996), a MAPK (Migliaccio A et al., 1996), vagy a PI3K-Akt útvonalak aktiválódása. Ezekről az E2 kiváltotta gyors, nemgenomikus válaszokról régóta tudtak, azonban nem voltak ismertek az ezek háttérében meghúzódó molekuláris folyamatok. Az E2 elsőként felderített nemgenomikus mechanizmusa a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K) aktiválódása volt. Simoncini és munkacsoportja kimutatta, hogy a ligand aktivált ER fizikailag hozzákapcsolódik a PI3K katalitikus alegységéhez, és aktiválja azt (Simoncini T et al., 2000). A PI3K aktiválódása igen fontos a sejtek túlélése szempontjából, ugyanis serkenti az antiapoptotikus folyamatokat és a sejtosztódást.

A régebbi, genomikus és nemgenomikus elnevezés helyett helyesebb nukleárisan kezdődő és extranukleárisan kezdődő útvonalokról beszélni, ugyanis az újabb kutatások tükrében egyre nyilvánvalóbb, hogy a nemgenomikus hatások egyrészt módosítják a genomikus hatásokat azáltal, hogy bizonyos transzkripciós faktorokat aktiválnak, másokat inaktiválnak, másrészt pedig mintegy „előkészítik a terepet” a későbbi, genomikus hatások számára. Neuroblasztóma sejteken végzett vizsgálatok szerint ha az E2 kezelés előtt bizonyos idővel BSA-val konjugált E2-t kapnak a sejtek, akkor az felgyorsítja az E2 transzkripciós hatásainak kifejlődését (Vasudevan N et al., 2005). Ugyanakkor a nemgenomikus útvonalak aktiválása önmagában is előidézi transzkripciós változásokat a sejtben. Erre az egyik legközvetlenebb példát a PI3K-Akt-FOXO1 útvonal szolgáltatja (1. ábra). Ezt az útvonalat a növekedési faktorok citoprotektív hatásának vizsgálata kapcsán fedezték fel. 1995-ben megfigyelték, hogy a NGF nem képes kifejteni antiapoptotikus hatását, ha a PI3K gátolva volt (Yao R, Cooper GM, 1995). A PI3K egy lipid-fehérje kináz, ami a sejtmembránban található foszfatidilinozitol 4,5-difoszfátot az inozitol gyűrű 3-as szénatomján foszforilálva foszfatidilinozitol 3,4,5-trifoszfátot állít elő. (Ennek egy része lipid foszfatázok, például a SHIP által foszfatidilinozitol 3,4-difoszfáttá defoszforilálódhat). A keletkezett 3-foszfoinozítidek PH doménnel rendelkező fehérjéket kötnek meg, amelyek így a sejtmembránhoz lokalizálódnak. A 3-foszfoinozítidek által regulált fehérjéket vizsgálva megállapították, hogy a PI3K gátlásakor tapasztalható fokozott apoptotikus hajlamért elsősorban az Akt (PKB) csökkent aktivitása felelős (Kulik G et al., 1997). A további kutatások feltárták az Akt aktiváció részleteit. Röviden, a 3-foszfoinozítidek hatására az Akt és a PDK1, amelyek mindketten a szerin-treonin kinázok AGC családjába tartoznak, a membránhoz lokalizálódnak. Miután a PDK1 a 3-foszfoinozítidek révén az Akt közelébe került, foszforilálja annak 308-as treonil oldalláncát. A 3-foszfoinozítidek nem csak a két fehérje kolokalizációján keresztül serkentik az Akt foszforilációját, hanem az Akt konformációját megváltoztatva hozzáférhetővé teszik - az addig a PH domén által elfedett - Thr³⁰⁸ csoportot a PDK1 számára. A 308-as treonil aminosavmaradék foszforilációját követően az Akt Ser⁴⁷³ csoportja is foszforilálódik (Bellacosa A et al., 1998). Az, hogy a Ser⁴⁷³ foszforilálását melyik enzim végzi, még nem teljesen tisztázott. A DNA-PK-ról (Feng J et al., 2004),



1. ábra Az ER-PI3K-Akt útvonal vázlata (magyarázat a szövegben).

az ILK-ről (Troussard A A et al., 2003) és a PDK1-ről is kimutatták, hogy bizonyos körülmények között képesek ezt a csoportot foszforilálni. A foszforilációk hatására az Akt aktiválódik, és számos egyéb fehérjét foszforilálva (pl.: Bad, GSK3 β , eNOS, CREB, YAP) aktiválja az antiapoptotikus, és gátolja a proapoptotikus folyamatokat, illetve serkenti a sejtosztódást.

A fent vázolt PI3K-Akt útvonal működését számos sejtvonalban és több szövetben is bizonyították. Ezen kívül kimutatták, hogy az inzulinon és növekedési faktorokon kívül az E2 is aktiválhatja ezt a jelátviteli utat, és számos szövetben valószínűleg ez az útvonal mediálja (legalább részben) az E2 antiapoptotikus hatását (Honda K et al., 2000). Az, hogy az E2-ER komplex milyen módon aktiválja a PI3K-t, még nem teljesen tisztázott. Bár kimutatták, hogy az ER közvetlenül hozzá tud kapcsolódni a PI3K katalitikus alegységéhez, aminek hatására az aktiválódik (Simoncini T et al., 2000), még nem bizonyított, hogy ez a mechanizmus szerepet játszik a PI3K aktiválásában uterusban in vivo. Még az sem eldöntött kérdés, hogy a klasszikus ER (egy, a sejtmembrán közelében elhelyezkedő szubpopulációja) mediálja-e az E2-nak a PI3K aktiváló hatását, vagy pedig egy más szerkezetű, "nemklasszikus" ER. A kutatások nagy része az első eshetőséget támasztja alá. Az ER α egy splice variánsa, aminek az N-terminális része hiányzik, részben a sejtmembránnál helyezkedik el (Li L et al., 2003), és hatékonyabban mediálja az E2 nemgenomikus hatásait, mint a teljes hosszúságú ER α . Azonban nemrégiben azonosítottak egy G-protein kapcsolt receptort, a GPR30-at (Filardo E J et al., 2000), ami bizonyos kísérleti rendszerekben membrán ösztrogén receptorként működik. A kutatások jelenlegi állása szerint az tűnik a legvalószínűbbnek, hogy az E2 sejt- illetve szövettípusokként eltérő receptor(ok) segítségével indítja el az extranukleáris jelátviteli kaszkádokat.

Endothel sejtekben a PI3K-Akt útvonal fontos szabályozója a nitrogén-monoxid szintézisnek (Haynes M P et al., 2000). Az Akt fontos szubsztrátját képezik a FOXO proteinek, amelyek a transzkripciós faktorok FOX családjába tartoznak (Kaestner K et al., 2000). A FOX család valamennyi tagjának jellegzetes DNS-kötő doménje (FOX domén) van, amit az alakja után "szárnyas hélix" doménnek is neveznek. Mint transzkripciós faktorok, hatásaikat a sejtek transzkripciós mintázatának módosításán keresztül fejtik ki. A p27kip1 (Medema R H et al., 2000), a Ciklin-G2 (Martinez-

Gac L et al., 2004) vagy a gadd45 (Tran H et al., 2002) expressziójának fokozásával, illetve a D típusú ciklinek expressziójának gátlásával (Schmidt M et al., 2002) leállítják a sejtciklust, a p130 szintjének emelésével a sejtek G₀ fázisba való belépését segíti elő (Kops G J, 2002 A), míg a ciklin-B, a PLK és más fehérjék koordinált expressziójával biztosítják a mitózis zavartalan lefolyását (Alvarez B et al., 2001). Azonban a FOXO fehérjék hatása nem csupán a sejtciklus szabályozására korlátozódik. A kataláz, vagy a MnSOD szintjének emelésével az oxidatív stressz elleni védekezést segítik (Kops G J et al., 2002 B), míg a Bim-1 és a FasI fokozott expresszióján keresztül proapoptotikus hatást fejtenek ki (Gilley J et al., 2003). Ezen kívül a FOXO transzkripciós faktorok serkentik egyes, az anyagcserében szerepet játszó enzimek expresszióját, mint például a PDHK 4-ét, a LPL-ét, vagy a G6Pázét (Schmoll D et al., 2000).

A FOXO fehérjék transzkripciós aktivitását az expressziójuk és lebomlásuk mértéke, illetve a rajtuk végrehajtott poszttranszlációs módosítások befolyásolják. Expressziójuk sok szövetben viszonylag állandó, de például endometriumban progeszteron hatására fokozódik (Labied S et al., 2006). Féléletidejüket a foszforiláció és az ezt követő nukleáris exklúzió lényegesen lerövidíti (Matsuzaki H et al., 2003). A FOXO proteineken számos foszforilációs és acetilációs hely van, amelyek közül az aktivitás szempontjából legfontosabbak az Akt érzékeny csoportok, amelyek a FOXO1 esetében a Thr²⁴, a Ser²⁵⁶, és a Ser³¹⁹ aminosav oldalláncok. Bár mindhárom csoport egy-egy Akt érzékeny konszenzus szekvenciában található, in vivo az Akt nagyobb specificitást mutat a Thr²⁴ és a Ser²⁵⁶ oldalláncokra, mint a Ser³¹⁹ csoportra (Brunet et al., 2001).

Az E2 hatását a PI3K-Akt útvonalra intenzíven kutatják különböző sejt kultúrák modellek segítségével, azonban az in vivo vizsgálatok száma lényegesen kisebb. Ez több dologra vezethető vissza: igen nehéz elkülöníteni szövetmintában az E2 un. korai és késői, genomikus hatásait, másrészt pedig az élő szervezetben a hormonok ill. a hormonok által kiváltott válaszreakciók intenzív "crosstalk"-ja zajlik, és ezen hatásoknak a szétválogatása, elkülönítése igen nehéz. Az in vivo vizsgálatok hiánya rendkívül sajnálatos, mert az egyes sejt típusokban megfigyelhető jelenségeket, törvényszerűségeket a fentebb említett kölcsönhatások miatt nem lehet az egész szövetre általánosítani, ezért egyedül az in vitro vizsgálatok eredményeiből

nem, vagy csak igen nagy fenntartással következtethetünk egy-egy szövet (pl. endometrium) betegségének patomechanizmusára, ill. az adekvát terápia tennivaló kiválasztására.

Az orvosi kutatások egyik legfontosabb modellállata a Laboratóriumi patkány (*Rattus norvegicus*), az E2 hatás egyik legfontosabb célszerve pedig az uterus. Az uterusban a sejtproliferáció, differenciálódás és programozott sejthalál folyamata az ivarérett kor kezdetétől - patkány esetében az állat haláláig - ciklusosan ismétlődik, és egyik fontos regulátora az E2. Ezért munkánkban patkány uterusban vizsgáltuk az E2-nak a PI3K-Akt-FOXO1 útvonalra gyakorolt hatását.

2. Célkitűzések

Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Expresszálódik és foszforilálódik-e az Akt patkány uterusban. Amennyiben igen, akkor az expresszió illetve a foszforiláció mértéke változik-e akut E2 kezelés hatására?
2. Hogyan alakul az egyedfejlődés folyamán az Akt expressziója, foszforilációja és E2 érzékenysége?
3. Patkány uterusban az E2-nak az Akt foszforilációra gyakorolt hatását az ER α mediálja-e, vagy esetleg egy más szerkezetű, nemklasszikus ösztrogén receptor?
4. Az Akt az uterusban PI3K függő, vagy pedig egy alternatív úton aktiválódik?
5. Expresszálódik-e patkány uterusban a FOXO1, foszforilálódik-e a két Akt érzékeny helyen (Thr²⁴ és Ser²⁵⁶), és hogyan hat ezen csoportok foszforilációjára az akut E2 kezelés, illetve a PI3K Wortmanninnal történő gátlása?
6. Milyen hatással van az E2 kezelés és a PI3K gátlása a CD1 és a FasI mRNS szintjére, és az uterus vízimbibíciójára?
7. Milyen jellegzetességei vannak az Akt expresszióknak és aktivációknak humán uterus szövetben a menstruációs ciklus alatt és menopauzában?

3. Módszerek

3.1. Anyagok

A 17- β ösztradiolt, Wortmannint, DMSO-t, Na-ortovanadátot, SDS-t, BSA-t, glicint a Sigma-tól (Sigma, St. Louis, MO, USA), a Tris-Cl-t, EDTA-t, Merkaptotetanolt, glicerolt, Nátrium-kloridot a Reanal-tól (Reanal, Budapest, Magyarország), az etanolt, metanolt a Spektrum-3D-től (Spektrum-3D, Budapest, Magyarország), az ICI 182,780-at a Tocris-től (Tocris Cookson Ltd., Northpoint, UK) az ECL-t pedig a Pierce-től (Pierce, Rockford, IL, USA) vásároltuk. A sovány tejport az Instantpack KFT gyártotta (Instantpack KFT, Berettyóújfalú, Magyarország). Az elsődleges antitestek mind nyúlban termelt poliklonális antitestek, gyártójukat és egyéb fontos tulajdonságaikat az I. Táblázat tartalmazza. A többi vegyszert a BioRad-tól (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) vásároltuk.

3.2. Állatok

Kísérleteinkhez fejlődésben lévő és felnőtt nőstény Wistar patkányokat használtunk. A patkányokat standard körülmények között tartottuk. A felnőtt állatokat öt nappal a kísérletek előtt enyhe éter narkózis alatt ovariektomizáltuk. A kísérleteket a PTE állatetikai bizottságának engedélyével végeztük.

3.3. Kezelések

Az antiösztrogén ICI 182,780-at (2 mg/ml, 96% etanolban) intraperitoneális injekcióval juttattuk az állatokba (0.1 mg/100 g tt.). A Wortmannint dimetilszulfoxidban (DMSO) oldottuk fel (1 mg/ml), ebből az oldatból (vagy tiszta DMSO-ból) adtunk 5 μ l-t közvetlenül a narkózisban lévő állatok uterusának jobb szarvába az alábbi módon: éter narkózis alatt egy vágást ejtettünk az állatok jobb oldalán, az ovariektómia után maradt heg mellett, a vágáson keresztül benyúlva csipesszel megkerestük az uteruszt, majd az uterusz szarv végét kihúztuk, és egy hegyes végű

Hamilton fecskendővel bejuttatuk az anyagot az uterusz lumenébe. A 17- β ösztradiolt (E2) 25%-os etanolban oldottuk fel, és intraperitoneális injekcióval adtuk be az állatoknak. Ahol nem jeleztük külön, ott az alkalmazott E2 dózis 10 μ g/100 g tt. volt. Oldószerként 25%-os etanolt használtunk. A kísérletek végén az állatokat dekaptáltuk, az uteruszukat eltávolítottuk, tömegüket lemértük, majd a két szarvat külön-külön lefagyasztottuk, és felhasználásig -80 °C -on tároltuk.

	gyártó	Katalógus szám	A felismer t epitop*	Mely fajokra specifikus
anti-Akt	Sigma, St. Louis, MO, USA	P 1601	Az Akt 1 és Akt 2 fehérje C-terminális részét	ember, patkány, egér, marha
anti-pSer ⁴⁷³ -Akt**	Sigma, St. Louis, MO, USA	P 4112	Az Akt 1 Ser ⁴⁷³ -on foszforilált formáját	ember, patkány, egér, marha
anti-pSer ⁴⁷³ -Akt***	Cell Signaling Technology Inc.,	9271	Az Akt Ser ⁴⁷³ -on foszforilált formáját	ember, patkány, egér, hörcsög, csirke
anti-pThr ³⁰⁸ -Akt	Sigma, St. Louis, MO, USA	P 3862	Az Akt 1 (és feltehetőleg az Akt 2) Ser ⁴⁷³ -on foszforilált formáját	ember, patkány, egér, marha, csirke
Anti-pThr ²⁴ -FOXO1	Cell Signaling Technology Inc.,	9464	A FOXO1 Thr ²⁴ -en foszforilált formáját	ember, patkány, egér
anti-pSer ²⁵⁶ -FOXO1	Cell Signaling Technology Inc.,	9461	A FOXO1 Ser ²⁵⁶ -on foszforilált formáját	ember, patkány, egér
anti-Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology	Sc509	A Bcl2 fehérjét	ember, patkány,
anti-Bax	Santa Cruz Biotechnology	Sc526	A Bax fehérjét	ember, patkány
Anti-ER α	Santa Cruz Biotechnology	Sc7207	Az Era fehérjét	ember, patkány
anti-aktin	Sigma, St. Louis, MO, USA	A 2103	Az aktin N-terminális 10 aminosava által alkotott epitopokat	ember, patkány, egér, hörcsög, béka

I. táblázat: A munkánk során használt antitestek főbb tulajdonságai.

*Az aminosavak számozása a patkány fehérje aminosavszekvenciáján alapul.

**Ezt az antitestet az eredmények 4.1.1. és 4.1.2. pontjaiban szereplő kísérleteknél használtuk.

***Ezt az antitestet az eredmények 4.1.3. pontjában szereplő és az azt követő kísérleteknél használtuk.

3.4. Human uterusz

Ezeket a vizsgálatokat a PTE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársaival kollaborációban végeztük. A vizsgálatokat a PTE ÁOK Human Etikai Bizottsága engedélyezte.

Vizsgálatainkat hysterectómiás műtétekből származó humán uterusz szöveteken végeztük. A betegek (38-55 évesek) a műtét előtt legalább 3 hónapig hormonkezelésben nem részesültek. A ciklus stádium beosztásokat ill. a menopausa meglétét az endometrium szövettani vizsgálatával, illetőleg a műtét reggelén levett vérből történő FSH, ösztrogén és progeszteron szintek meghatározásával állapították meg.

Közvetlenül a műtét után a myomát az uteruszból disszekálták. Kontrollként ugyanazon uteruszból származó ép myometrium szövetet alkalmaztunk.

A mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és -80°C -on szállítottuk és tároltuk felhasználásig.

3.5. Western blot

A mintákat 4°C -on elhomogenizáltuk 1 ml/100 mg szövet I-es pufferben (50 mM Tris-Cl (pH 8,0), 1 mM Na-ortovanadát), majd hozzáadtunk 1 ml/100 mg szövet II-es puffert (10 mM Tris-Cl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 1 % SDS, 5 % merkaptóetanol, 40 % glicerol), és további 10-15 másodpercig homogenizáltuk. A homogenizátumokat 5 percig főztük, majd centrifugáltuk. A felülúszókat -20°C -on tároltuk. A mintákat poliakrilamid géltre vittük fel, elektroforetizáltuk, majd a szétfuttatott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk át. A membránokat egy órát blokkoltuk blokkoló pufferben (5 % sovány tejpor TBS-ben), majd elsődleges antitesttel kezeltük őket. Az elsődleges antitesteket 5 % BSA-t és 0,2 % TWEEN 20-at tartalmazó TBS-ben hígítottuk. Másodlagos antitestként nyúl ellenes, HRP-zal konjugált antitestet használtunk. A HPR szubsztrátjaként ECL-t használtunk. Loading kontrollként aktint használtunk.

3.6. Szubcelluláris frakciók elválasztása

Az egész procedúrát 4 °C -on végeztük. 1 ml izoláló pufferbe (250 mM szacharóz, 1 mM EGTA, 5 mM TRIS (pH 7,5)) 5 µl proteáz gátló keveréket, 5 µl nátrium-ortovanadátot (50 mM-os törzsoldat desztillált vízben), és 100 µl EDTA-t (500 mM desztillált vízben, pH 8,0) pipettáztunk, ebbe a pufferbe (A puffer) 50-100 mg fagyasztott szövetet tettünk, felolvadás után késes homogenizátorral kb 1 mm³-es darabokra vágtuk, majd potterrel homogenizáltuk. Ezután centrifugáltuk (750 g, 15 perc, 4°C-on). Az így nyert felülúszó a citoplazmában gazdag durva homogenizátum. A csapadékot felvettük 1 ml A pufferbe, adtunk hozzá 50 µl Triton X-100-at, azután újra késes, majd teflonos homogenizátorral homogenizáltuk, és ismét centrifugáltuk. Az üledék lett a sejtmagban gazdag durva homogenizátum. Erre 1 ml A puffert pipettáztunk, majd annyi triklór-ecetsavat (TCA) raktunk bele, hogy 8 % legyen a koncentrációja. Ugyancsak 8 % TCA-t tettünk a citoplazmában gazdag durva homogenizátumba. Mindkét frakciót 10 percig jégben inkubáltuk, majd centrifugáltuk (10 000 g, 10 perc, 4 °C-on), a csapadékot háromszor mostuk -20 °C-os acetonnal, majd felvettük a Western blotnál használt I-es és II-es puffer 1:1 arányú keverékébe.

3.7. Kvantitatív RT PCR

A hagyományos és a kvantitatív PCR-hoz használt primerek szekvenciája a II. táblázatban látható. A mintákból TRIzol reagenssel total RNS-t izoláltunk, és ezt használtuk a reverz transzkripció templátjaként. A reverz transzkriptáz reakció 4 µl 5 x-es iscript reakciómixet, 1 µl iscript reverz transzkriptázt, 1 µg RNS templátot és annyi RNS mentes vizet tartalmazott, hogy a végtérfogat 20 µl legyen. Először az RNS mentes vizet és az RNS-t mértük be, 10 percig 65 °C-on inkubáltuk, majd hozzáadtuk a puffert és az enzimet. A reverz transzkripciót a következő programmal végeztük: 5 min 25 °C-on, 30 min 42 °C-on és 5 min 85 °C-on.

A kész cDNS tisztaságát hagyományos PCR segítségével ellenőriztük. Ennek során a reakcióelegy (2 µl 10 x-es Taq polimeráz puffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM minden egyes dNTP-ből, 0,5 µM forward primer, 0,5 µM reverse primer, 12 µl RNáz mentes desztillált víz, 2 µl Taq polimeráz) összeállítása után az alábbi

programot alkalmaztuk: denaturálás 1 min 94 °C-on, majd 45 amplifikációs ciklus (30 sec 92 °C-on, 20 sec 50 °C-on, 1 min 72 °C-on), és a végső lánchosszabbítás 5 min 72 °C-on.

A kvantitatív PCR-hoz SyBr Green Supermixet használtunk a termék leírásának megfelelően. A program a következő lépésekből állt: 3 min 95 °C-on, majd 45 amplifikációs ciklus (10 sec 92 °C-on, 10 sec 55 °C-on, plate read, 12 sec 72 °C-on), végül 1 min 72 °C-on. Befejezés után melting curve analízist végeztünk (65 °C-ról 0,5 °C-os lépésként 95 °C-ra melegítettük a reakcióelegyet, és minden egyes hőmérsékletemelés után beiktattunk egy plate read-et). A kapott eredményeket a $\Delta\Delta C_T$ Livak módszerrel értékeltük.

Alkalmazás	Primer név	Szekvencia	A primer tervezéshez használt cDNS azonosító száma az NCBI adatbázisban
Hagyományos PCR-hoz	Beta aktin forward primer	5' AGCCATGTACGTAGCCATCC 3'	NM_031144
	Beta aktin reverse primer	5' AAGGGTGTAAAACGCAGCTC 3'	
QT PCR-hoz	Beta aktin forward primer	5' AGCCATGTACGTAGCCATCC 3'	
	Beta aktin reverse primer	5'AGCGCGTAACCCTCATAGAT 3'	
	CD1 forward primer	5'TAGGGCTGGTAGCATGAGGT 3'	NM_171992
	CD1 reverse primer	5' CACGGTCCCTACTTCCAAAC 3'	
	Fasl forward primer	5' TCTGGTTGGAATGGGGTTAG 3'	NM_012908
	Fasl reverse primer	5' TTGGTTTCAGAGGGTGTGC 3'	

II. táblázat: A munkánk során használt primerek szekvenciája.

3.8. Statisztika

A Western blotok denzitometriás mérését Image Tool (Roswell, GA, USA) programmal végeztük. Az állatkísérletek eredményeit Student t-teszttel, a humán minták adatait ANOVA teszttel, majd Student-Newman-Keul-féle multiple range teszttel analizáltuk. Az oszlopábrák az átlagokat és a standard devianciát mutatják.

4. Eredmények

4.1 A PI3K-Akt jelátviteli út jellegzetességei patkány uteruszban (Lengyel F et al., 2004; Lengyel F et al, 2007)

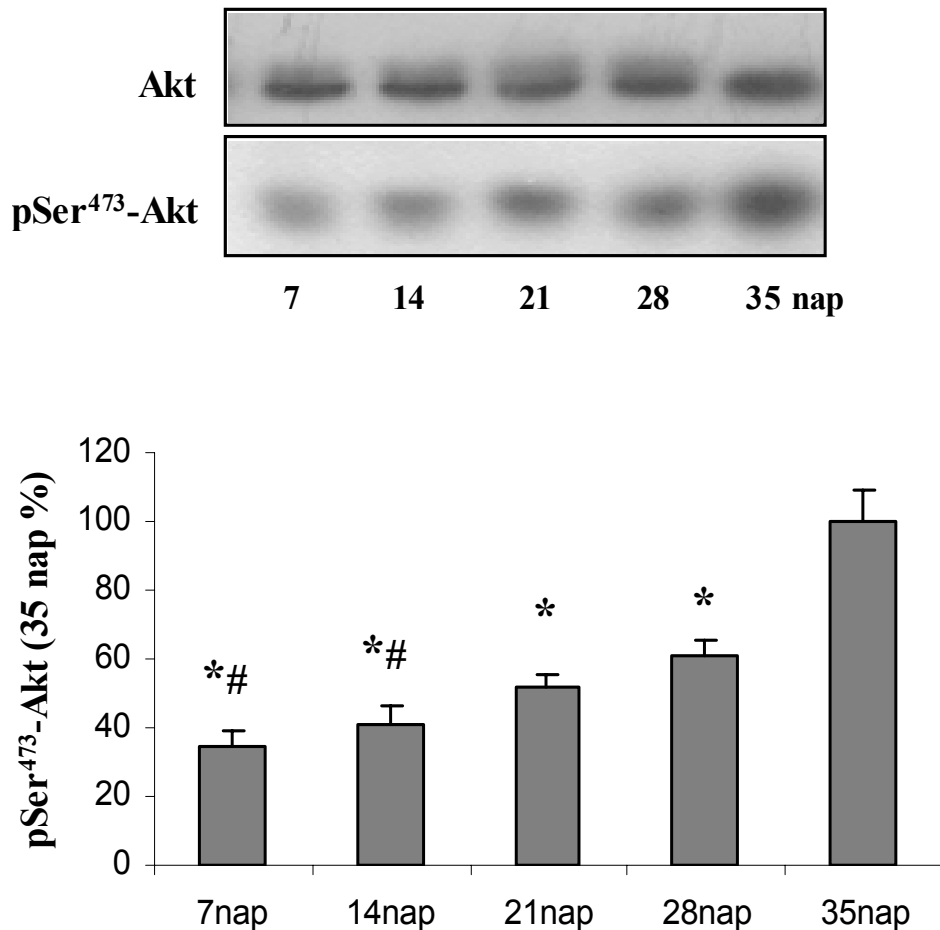
A sejtciklus regulációjában fontos szerepe van a PI3K-Akt útvonalnak (Liang J, Slingerland JM, 2003). Az Akt általi foszforiláció gátol olyan fehérjéket, amelyek leállítják a sejtciklust, mint például a ciklin-dependens kináz inhibitor p21 (Ball K L, 1997), és p27 (Yang H et al., 2006), a multifunkciós GSK-3 béta (Cross D A et al., 1995), valamint a proapoptotikus hatású Bax (Yamaguchi H, Wang H G, 2001). Ugyanakkor az Akt aktivál bizonyos antiapoptotikus hatású fehérjéket, mint például a PED/PEA-15 (Trencia A et al., 2003). A sejtciklus szabályozásán kívül szerepe van ennek az útvonalnak az anyagcsere szabályozásában, például az Akt szubsztrátjai között szerepel a frutóz-6 foszfát-2 kináz (Deprez J et al., 1997), és a fent említett GSK-3 béta, ami a sejtciklus szabályozásában betöltött szerepe mellett a glikogén szintézisnek is fontos regulátora. Az Akt-nak szerepe van az angiogenezis folyamatában is (Jiang B H, Liu L Z, 2008).

Az uterusz pubertás alatti fejlődése és az endometrium reproduktív korban zajló ciklikus változásai a sejtciklus pontos szabályozását igénylik. A sztróma és epithelsejtek proliferációján kívül új erek képződése, és az anyagcserefolyamatok intenzitásának növelése is szükséges. Ezen folyamatok mindegyike - legalább részben - a PI3K-Akt útvonal szabályozása alatt áll. Azonban uterusz vonatkozásában kevés adatt áll rendelkezésre az útvonal szabályozásával és hatásaival kapcsolatban.

4.1.1. Az Akt fejlődő és felnőtt állatokban is expresszálódik, és életkorfüggő érzékenységgel foszforilálódik

Elsőként azt vizsgáltuk, hogy az egyedfejlődés során hogyan alakul az Akt expressziója és foszforilációja patkány uteruszban. Ehhez fejlődésben lévő, 7, 14, 21, 28 és 35 napos patkányok uteruszának homogenizátumát elemeztük Western blottal. Eredményeink szerint az Akt protein minden vizsgált életkorban azonos

mértékben expresszálódik, a foszforilációja azonban életkor függő módon változik (2. ábra): 7 és 14 napos állatokban alacsonyabb, 21 napos korban elkezd fokozódni, 28 napos korban tovább fokozódik, majd 35 napos korban, a hüvelynyílás idején (hüvelynyílás ideje: 36 +/-2 nap) éri el maximumát.



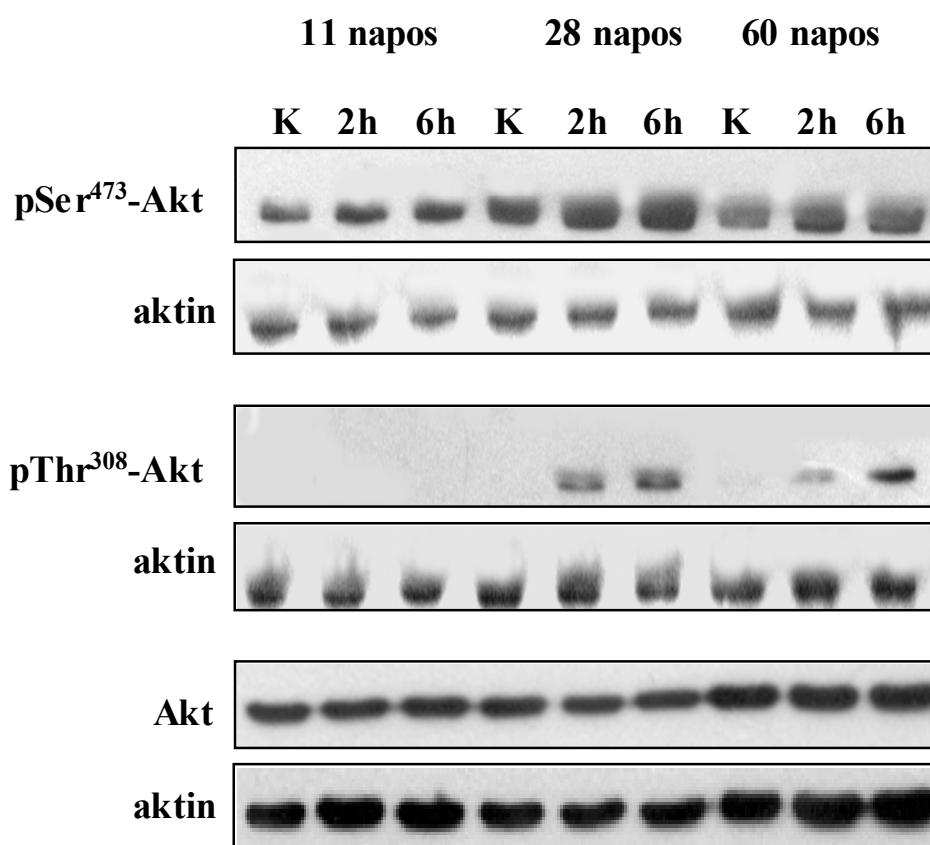
2. ábra Az Akt/PKB expresszió (insert) illetőleg foszforiláció változása (insert, oszlopok) 7, 14, 21, 28 és 35 napos patkányok uterusában Az Akt és a pSer⁴⁷³-Akt szintjét Western blotlal határoztuk meg. Az oszlopok 3-3 kísérlet átlagát ± SEM mutatják.

* p<0.05 a 35 napos értékekhez viszonyítva

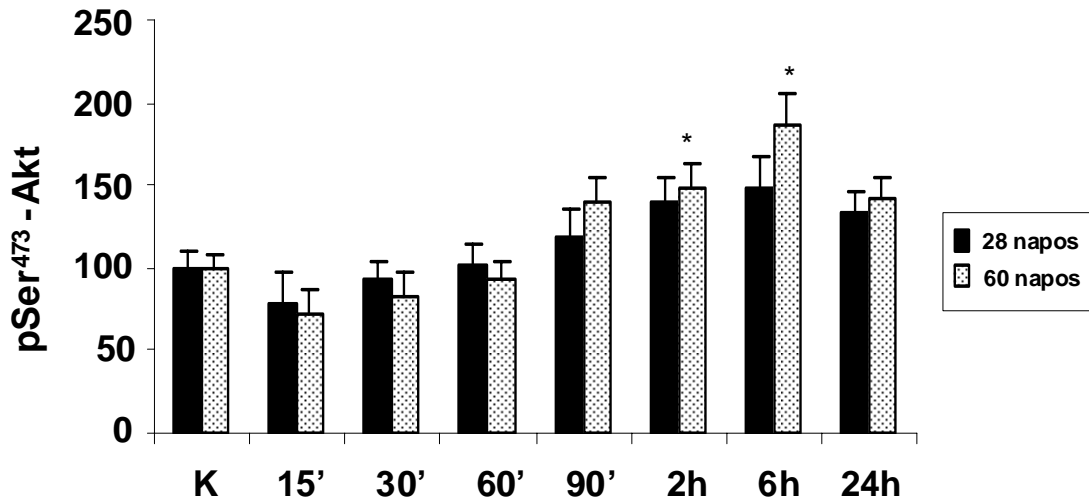
p<0.05 a 28 napos értékekhez viszonyítva

A következő lépésben az Akt E2 érzékenységének egyedfejlődés alatti változását vizsgáltuk oly módon, hogy 11 napos, hüvelynyílás előtt álló 28 napos, valamint 60 napos, ovariectomizált állatoknak adtunk E2-t (10 µg/100 g tt.; i.p.). Az Akt

foszforilációját pThr³⁰⁸-Akt és pSer⁴⁷³-Akt ellenes antitestekkel vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy 11 napos korban az Akt foszforilációt E2 kezelés még nem befolyásolta, viszont a 28 és a 60 napos (felnőtt) állatok uteruszában fokozta azt (3. és 4. ábra). A 28 és a 60 napos állatok uteruszában az Akt E2 érzékenysége nem különbözött szignifikánsan (4. ábra).



3. ábra Ösztadiol (E2, 10 µg/100 g tt.) kezelés hatásának időfüggése Akt/PKB protein expressziójára és foszforilációjára 11, 28 és ovariektomizált 60 napos patkányok uteruszában. Az állatokat öt nappal az ovariektómia után 10 µg/100 g tt. E2-lal kezeltük intraperitoneálisan, majd a jelzett időpontokban dekapitáltuk. A vizsgált fehérjék szintjét Western blottal határoztuk meg. A kontroll állatokat (K) oldószerrel kezeltük. A kísérleteket legalább három alkalommal végeztük el hasonló eredményekkel.



4. ábra Ösztradiol (E2, 10 µg/100 g tt.) kezelés hatása az Akt protein foszforilációjára 28 napos és ovariectomizált 60 napos patkányok uterusában. Az állatokat öt nappal az ovariectomia után 10 µg/100 g tt. E2-lal kezeltük intraperitoneálisan, majd a jelzett időpontokban dekapitáltuk. A pSer⁴⁷³-Akt szintjét Western blottal határoztuk meg. A kontroll állatokat (K) oldószerrel kezeltük. Az oszlopok 3-3 kísérlet átlagát ± SEM mutatják.

* $p < 0.05$ a kontroll értékekhez viszonyítva

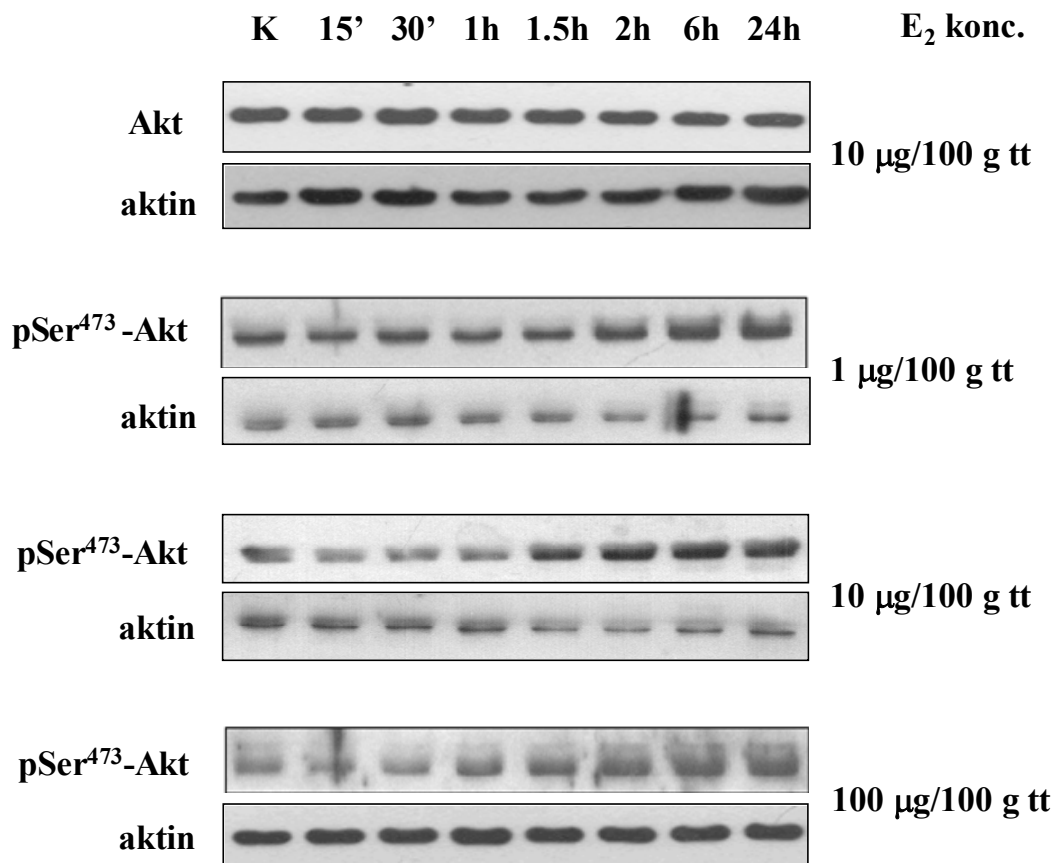
Mivel az Akt Thr³⁰⁸ csoportjának foszforilációja megelőzi a Ser⁴⁷³ csoporttét, és az Akt teljes aktivációjához mindkét csoportnak foszforilált állapotban kell lennie, a továbbiakban csak a Ser⁴⁷³ foszforilációját vizsgáltuk.

4.1.2. Az Akt expresszálódik és E2 érzékeny módon foszforilálódik patkány uterusban

Felnőtt, ovariectomizált patkányokat kezeltünk különböző dózisú E2 (1, 10 vagy 100 µg/100 g tt.) injekcióval. Az állatokat az E2 kezelés után különböző időpontokban dekapitáltuk, majd Western blottal vizsgáltuk az Akt fehérje mennyiségét, valamint foszforilációjának mértékét.

Az Akt minden vizsgált állatban expresszáldott, és szintjét az E2 kezelés nem befolyásolta (5. ábra). A fehérje foszforilációját pSer⁴⁷³-Akt ellenes antitesttel vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az szignifikánsan fokozódott két órával az E2 injekciót követően.

A kísérletet különböző E2 dózisokkal (1, 10 és 100 µg /100 g tt.) elvégezve megállapítottuk, hogy a 10 µg /100 g tt. E2 Akt aktiváló hatását nem fokozta a nagyobb E2 dózis, viszont kisebb dózist alkalmazva kicsit megnőtt az injekció beadásától az Akt foszforiláció fokozódásáig eltelt idő (5. ábra), így munkánk további részében a 10 µg/100 g tt. dózisban alkalmaztuk az E2-t.

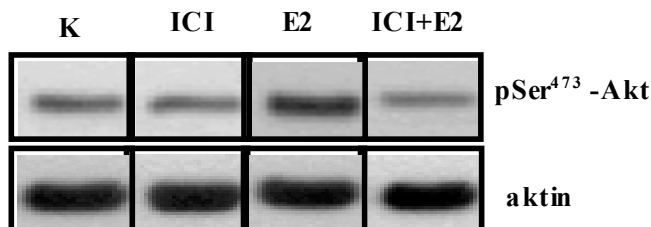


5. ábra Ösztadiol (E2) kezelés hatása az Akt és a pSer⁴⁷³-Akt szintjére felnött, ovariectomizált patkányokban. Az állatokat öt nappal az ovariectomia után 1, 10 vagy 100 µg/100 g tt. E2-lal kezeltük i.p., majd a jelzett időpontokban dekaptáltuk. A kontroll állatok (K) oldószert kaptak. Az Akt és a pSer⁴⁷³-Akt szintjét Western blottal határoztuk meg. A kísérleteket legalább három alkalommal végeztük el hasonló eredményekkel.

4.1.3. Az Akt E2 hatására ICI 182,780 érzékeny úton foszforilálódik az uteruszban

Korábban kimutatták, hogy az E2 képes a membrántól kiinduló jelátviteli kaszkádokat aktiválni klasszikus ösztrogén receptor hiányában is. 1997-ben izoláltak egy 7 transzmembrán domén szerkezetű, G-fehérjéhez kapcsolt receptort (GPR30, Carmeci C et al., 1997), amiről később kiderült, hogy ösztrogén receptorként működhet a sejtben. Ezen receptornak az E2 extranukleáris hatásaiban betöltött szerepével kapcsolatban a különböző kísérleti rendszereken végzett kutatások eltérő következtetésre vezettek. Ezért megnéztük, hogy milyen szerepe van az ER α -nak a mi rendszerünkben az E2 indukálta Akt foszforilációban. Felnőtt patkányokat kezeltünk egy órával az E2 beadása előtt ICI 182,780-nal, ami szelektív gátlószer az ösztrogén receptoroknak.

Az ICI 182,780-nal előkezelt állatok uteruszában az E2 nem fokozta az Akt foszforilációját (6. ábra). Az ICI 182,780 kezelés önmagában hatástalan volt.



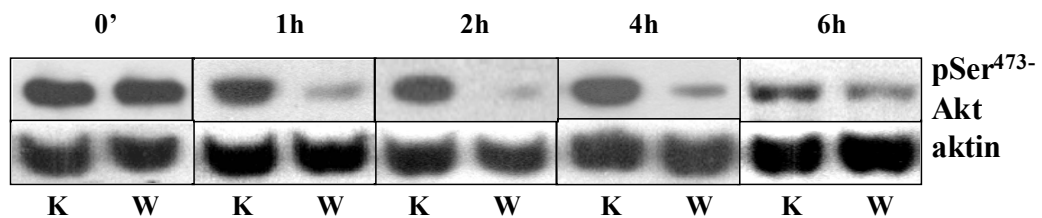
6. ábra Intraperitoneális ösztradiol (E2, 10 ug/100 g tt.) és/vagy ICI 182,780 (ICI, 0.1 mg/100 g tt.) kezelés hatása az Akt foszforilációjára (Ser⁴⁷³) felnőtt patkányok uteruszában. Az ICI-t az állatok lefejezése előtt 4, az E2-t pedig 2 órával adtuk, intraperitoneálisan. A kontroll állatok az E2 és az ICI oldószerét kapták. A pSer⁴⁷³-Akt és az aktin szintjét Western blottal határoztuk meg. A kísérleteket legalább három alkalommal végeztük el, hasonló eredményekkel. Reprezentatív blot.

4.1.4. Az Akt patkány uteruszban PI3K függő úton foszforilálódik

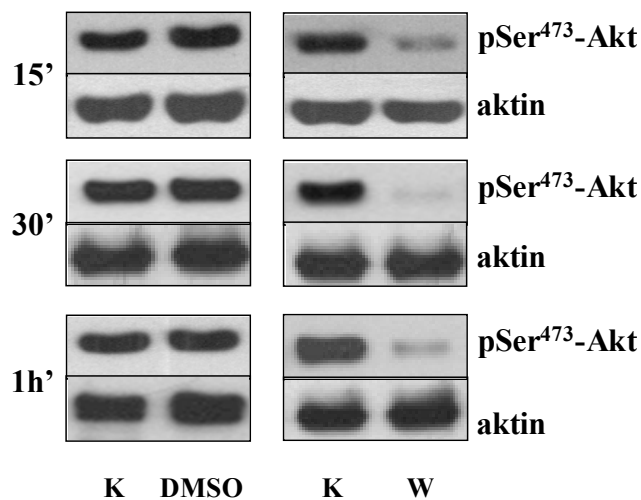
Az Akt többnyire a bevezetésben leírt, PI3K függő úton aktiválódik. Azonban az Akt aktiváció alternatív útjait is leírták, nagyrészt sejt kultúrák rendszereiben. Mivel még nem volt ismert, hogy patkány uteruszban milyen úton foszforilálódik az Akt,

vizsgálatainkban elemeztük a Wortmannin hatását a PI3K aktivitására az állatok uterusában. Nem ismert a Wortmannin farmakokinetikája, így több módszert is kipróbáltunk a bevitelére. Egyes állatoknak automata pipettával a hüvelyébe juttattuk, másoknak intraperitoneális injekció, míg megint másoknak intrauterin injekció formájában adtuk be. Vizsgálatainkban a Wortmannin hatásának detektálására az Akt foszforiláció változását vizsgáltuk. Amennyiben a három közül bármelyik Wortmannin kezelés csökkenti azt, az arra utal, hogy a PI3K-nak szerepe van az Akt foszforilációjában. Ha nem csökkenti egyik sem, akkor vagy a

A.



B.



7. ábra Unilaterális Wortmannin (W) kezelés hatására a pSer⁴⁷³ Akt szintjére felnőtt, ovariectomizált patkányok uterusában. **A:** Az uterus jobb szarvába öt nappal az ovariectomia után 5 µg Wortmannint injektáltunk. A bal szarvat kontrollként (K) használtuk. **B:** Az uterus jobb szarvába öt nappal az ovariectomia után 5 µg Wortmannint, vagy 5 µl oldószert (DMSO) injektáltunk. Az állatokat a jelzett időpontokban dekaptáltuk. A bal szarvat kontrollként (K) használtuk. A pSer⁴⁷³-Akt szintjét Western blottal határoztuk meg. A kísérleteket legalább három alkalommal végeztük el hasonló eredményekkel.

Wortmannin nem jut el kellő mennyiségben a sejtekig egyik módszerrel sem, vagy pedig PI3K közreműködése nélkül megy végbe az Akt foszforilációja.

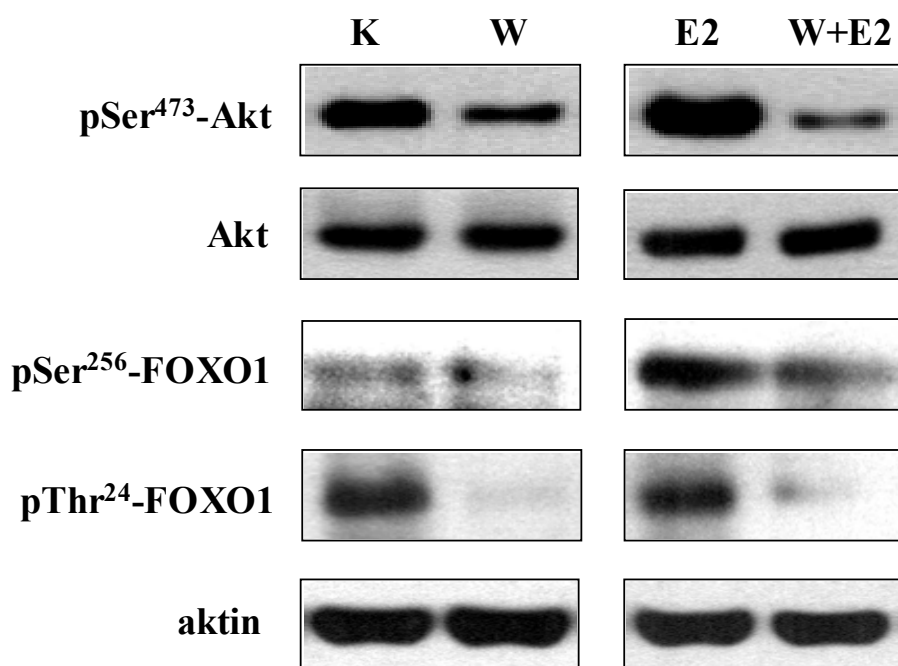
Az uterusz lumenébe a „módszerek”-ben leírt módon beadott Wortmannin (5 µg/állat) szignifikáns mértékben csökkentette az Akt foszforilációt, ami azt mutatja, hogy ovariectomizált patkányok uteruszában az Akt PI3K függő úton foszforilálódik. Mivel a másik két módszerrel bevitt Wortmannin hatástalan volt, a továbbiakban minden alkalommal intrauterin injekció útján vittük be a gátlószert az állatokba. Időfüggéses kísérletekkel megállapítottuk, hogy a Wortmannin Akt foszforilációt csökkentő hatása esetenként már 15 perces kezelés után is jelentős volt, azonban az egy órás kezelés jobban reprodukálható eredményt adott. Azt is megállapítottuk, hogy a Wortmannin okozta pSer⁴⁷³-Akt szint csökkenés legalább négy órán át specifikus marad a kezelt uterusz szarvra, valamint azt, hogy a Wortmannin oldószereként használt DMSO nem befolyásolta az Akt foszforiláció mértékét (7. ábra). Ezek alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy a Wortmannint az E2 kezelés előtt egy órával célszerű beadni.

Ezen előkísérletek után szisztematikusan megvizsgáltuk a Wortmannin hatását az E2 indukálta Akt foszforilációra. Az állatok egy részének intrauterin Wortmannin injekciót adtunk, majd egy órával később E2-t vagy oldószert kaptak intraperitoneálisan. Az állatok másik része nem kapott Wortmannint, csak intraperitoneálisan E2-t vagy annak oldószert. A patkányokat az intrauterin injekció után három órával dekapitáltuk, és Western blottal vizsgáltuk az Akt foszforiláció alakulását. Azt tapasztaltuk, hogy a Wortmannin kivédte az E2-nak az Akt aktiváló hatását, és a vehiculummal kezelt állatok pSer⁴⁷³-Akt szintjét is jelentősen csökkentette (8. és 9. ábra).

4.1.5. Részösszefoglalás 1.

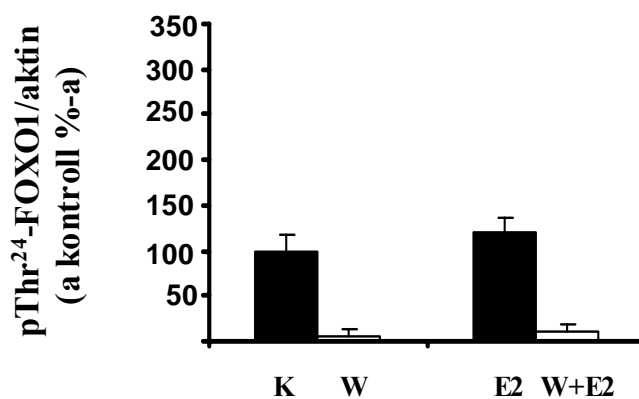
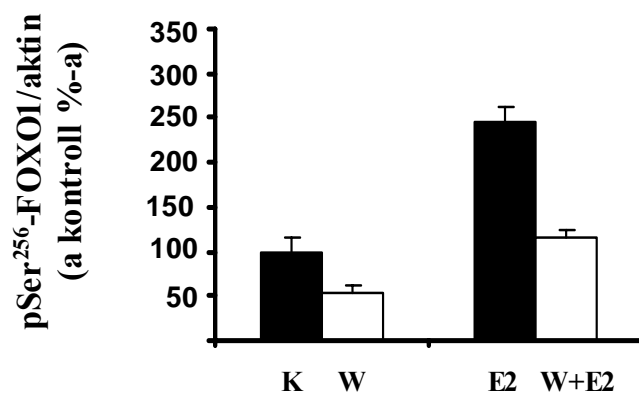
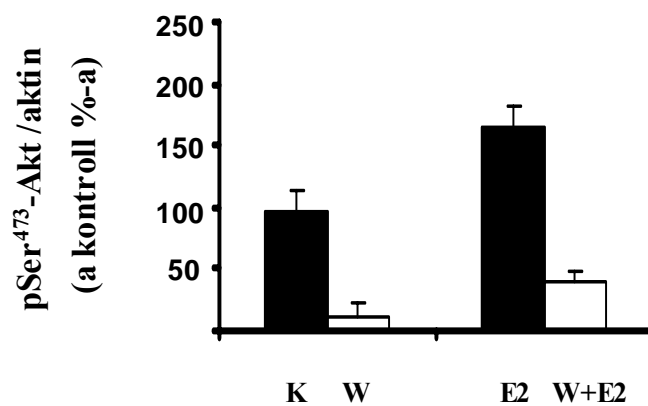
Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az Akt az egyedfejlődés alatt végig expresszálódik, és aktinra normalizált expressziója minden életkorban közel azonos. Az Akt egy része minden életkorban foszforilálódik is. A foszforiláció mértéke 21 napos korban kezd emelkedni, és 35 napos kor körül éri el maximumát. Az Akt aktiváció E2 érzékenységét 11, 28 és 60 napos állatokon vizsgáltuk. A 11 napos

állatok uteruszában az Akt nem volt E2 rezponzív, a 28 napos és a felnőtt (60 napos) állatok E2 kezelésre az Akt foszforiláció fokozódásával válaszoltak. Az Akt két regulációs helye (a Ser⁴⁷³ és a Thr³⁰⁸) hasonló E2 érzékenységet mutatott. Az Akt foszforiláció felnőtt állatokon végzett részletesebb vizsgálata azt mutatta, hogy annak szintje 2 órával az E2 kezelés után emelkedett meg szignifikáns mértékben, és 6 óra után érte el maximumát.



8. ábra Két órás ösztradiol (E2, 10 µg/100 g tt.; i.p.) és intrauterin Wortmannin (W) kezelés hatása az Akt protein mennyiségére és foszforilációjára (Ser⁴⁷³), valamint a pSer²⁵⁶-FOXO1 és pThr²⁴-FOXO1 mennyiségére felnőtt patkányok uteruszában. A Wortmannint mindig az állatok dekapitálása előtt 3, az E2-t pedig 2 órával adtuk. A vizsgált fehérjék szintjét Western blottal határoztuk meg. A kísérleteket legalább három alkalommal végeztük el hasonló eredményekkel.

Az Akt foszforiláció mechanizmusát az ER antagonistá ICI 182,780 és a PI3K gátló Wortmannin használatával vizsgáltuk. Az intraperitoneálisan adott ER antagonistá sikeresen gátolta az E2 indukálta Akt foszforilációt. A Wortmannin beadására kidolgoztunk egy műtéti eljárást, amivel közvetlenül az egyik uterusz



9. ábra Két órás ösztadiol (E2, 10 µg/100 g tt.; i.p.) és intrauterin Wortmannin (W) kezelés hatása az Akt Ser⁴⁷³, illetve a FOXO1 protein Thr²⁴ és Ser²⁵⁶ oldalláncainak foszforilációjára felnőtt patkányok uterusában. A részletes magyarázatot lásd az előző ábrán. Az oszlopok 3-3 kísérlet átlagát +/- SEM mutatják

szarv lumenébe juttattuk az anyagot. Így a PI3K gátlása specifikus volt a kezelt szarvra mintegy 4 órán át. A PI3K gátlása megakadályozta E2 indukálta Akt foszforilációt, és erősen lecsökkentette pAkt szintjét E2-nel nem kezelt állatokban is. Mindezek alapján az E2 Akt foszforilációra gyakorolt hatását az ER mediálja, és PI3K függő úton megy végbe.

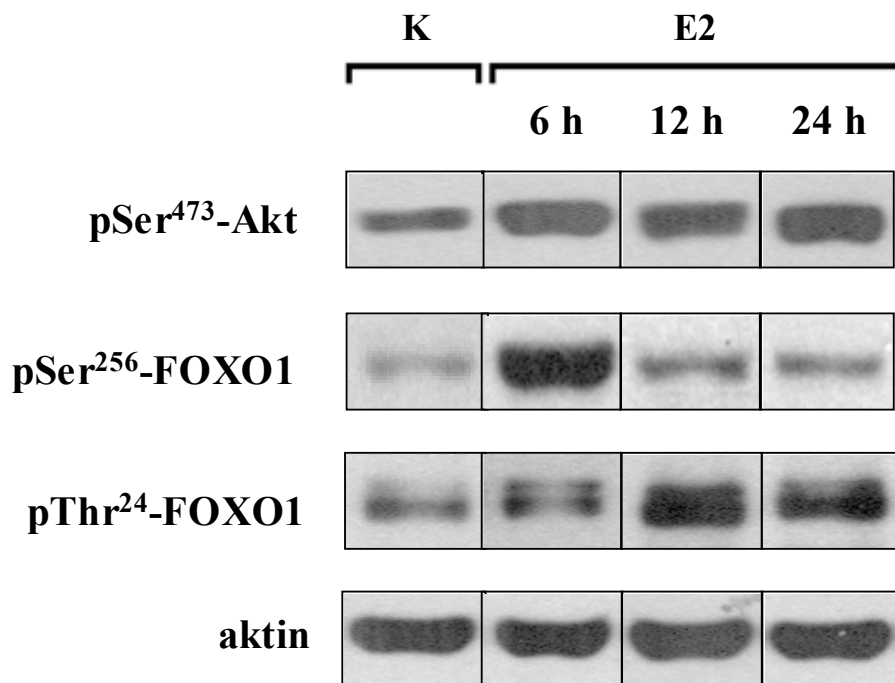
4.2. A PI3K-Akt útvonal szerepe a FOXO transzkripciós faktorok poszttranszlációs szabályozásában (Lengyel F et al., 2007)

A PI3K-Akt útvonal egyik fontos célpontját képezik a FOXO proteinek. A forkhead transzkripciós faktorok nagycsaládjába tartoznak, amely nevét az elsőként felfedezett tag, a forkhead gén után kapta. Ennek mutációja – mint neve is mutatja - villa alakú fejet eredményez Drosophiláknál. A nagycsalád minden tagjára jellemző DNS-kötő domént forkhead-boxnak hívják, ennek rövidítése (FOX) adja a nagycsalád ma is használt nevét. A FOX fehérjék O osztályát nevezik FOXO fehérjéknek. Jelenleg négy FOXO fehérjét ismerünk emlősökben: a FOXO1-et, aminek eredeti neve FKHR (forkhead in rhabdomyosarcomas), a FOXO3a-t (FKHRL1), FOXO4-et (AFX) és a FOXO6-ot. Igen szerteágazó a funkciójuk. A bevezetésben említett, a sejtciklus szabályozásában betöltött szerepük mellett proapoptotikus hatásuk is van, valamint részt vesznek a szénhidrát anyagcsere, az oxidatív stressz elleni védekezés, a DNS javítás, sejt differenciálódás, izomnövekedés szabályozásában (Huang H, Tindall D J, 2007). Első pillantásra logikátlanak tűnhet ez a sokféle funkció (például proapoptotikus hatású, és a DNS javítást végző enzimek átírását is serkentheti), azonban érthetővé válik, ha nem sejt szinten vizsgáljuk ezen hatásokat, hanem az egyed szintjén. Ekkor nyilvánvaló, hogy az egyed túlélését segítik elő ezek a hatások: a sejtciklus pontos regulálása, a stressz elleni védekezés és a DNS javítás segít az egyed sejtjeinek, hogy megőrizték egészségüket. Azonban ha például a DNS károsodás meghalad egy bizonyos mértéket, akkor a rákos elfajulás veszélye miatt előnyösebb az egyed számára, ha elpusztul a sérült sejt. Az ilyen sokrétű funkció finom szabályozás létét sejteti. A FOXO proteinek valóban számos poszttranszlációs módosítás alanyát képezik: foszforilációk, acetilációk, ubikvitiniláció. Ezek jelentősen módosítják az aktivitásukat. A FOXO fehérjék egyik legfontosabb regulátora az Akt. Bár FOXO proteinek sokrétű funkcióját igen intenzíven kutatják, viszonylag kevés munka foglalkozik az uterusz fiziológiájában betöltött szerepükkel.

4.2.1. A FOXO1 két Akt érzékeny csoportja egymástól eltérő módon reagál az E2 kezelésre és a PI3K Wortmanninnal történő gátlására

Ahogy a bevezetésben említettem, az Akt antiapoptotikus hatásában fontos szerepe van a FOXO fehérjék inaktiválásának. Bár a FOXO1 három Akt szubsztrátként szolgáló konszenzus szekvenciát tartalmaz, az Akt *in vivo* csak két helyen foszforilálja, a 24-es treonil és a 256-os szeril oldalláncon (Brunet et al., 2001). Ezen helyek foszforilációja a FOXO1 nukleáris exklúziójához vezet, így az nem működhet tovább mint transzkripciós faktor. A Ser²⁵⁶ foszforilációja nukleáris exklúzió nélkül is inaktiválja a FOXO1-et, a DNS-hez való affinitásának csökkentésével.

FoszfóThr²⁴ és pSer²⁵⁶ ellenes antitesteket alkalmazva Western blottal vizsgáltuk a FOXO1 foszforiláció változásait PI3K gátlás és két órás E2 kezelés hatására.



10. ábra Hat, 12 és 24 órás ösztradiol (E2) kezelés hatása a pSer⁴⁷³-Akt, a pSer²⁵⁶-FOXO1 és a pThr²⁴-FOXO1 proteinek mennyiségére felnőtt patkányok uterusában. Az E2-t intraperitoneálisan adtuk, majd az állatokat a jelzett időpontokban dekapitáltuk. A vizsgált fehérjék szintjét Western blottal határoztuk meg. A kísérleteket legalább három alkalommal végeztük el hasonló eredményekkel.

Mindkét foszforilált forma detektálható volt minden vizsgált állatban. A pSer²⁵⁶-FOXO1 szintje alacsony volt a vehiculummal kezelt állatokban, azonban két órával az E2 injekció után szignifikáns emelkedést mutatott, és a PI3K gátlása mintegy 50%-ban csökkentette. A FOXO1 24-es treonil csoportjának foszforilációja nem emelkedett két órás E2 kezelés hatására, viszont Wortmannin kezelés szinte teljesen legátolta azt (8. és 9. ábra).

4.2.2. A FOXO1 Ser²⁵⁶ és Thr²⁴ csoportjainak foszforilációs szintje a hosszú idejű E2 kezelésre is eltérő módon változik

Mivel a két órás E2 kezelésnek nem volt szignifikáns hatása a FOXO1 Thr²⁴-oldalláncának foszforilációjára, a következőkben megnéztük, hogy hosszabb idejű E2 kezelés hatására hogyan alakul ezen csoport foszforilációja.

Intraperitoneális E2 injekció után hat órával ugyanazt tapasztaltuk, mint a két órás kezelés esetében, azaz a pSer²⁵⁶-FOXO1 szintje megemelkedett, viszont a pThr²⁴ szintje változatlan maradt.

Ezzel szemben 12 és 24 órával az E2 kezelés után emelkedett pThr²⁴-FOXO1 szintet detektáltunk, míg a pSer²⁵⁶-FOXO1 szintje ezekben az időpontokban már a kontroll értékre csökkent (10. ábra). Az Akt foszforilációja valamennyi kezelés hatására fokozódott a kontrollhoz képest.

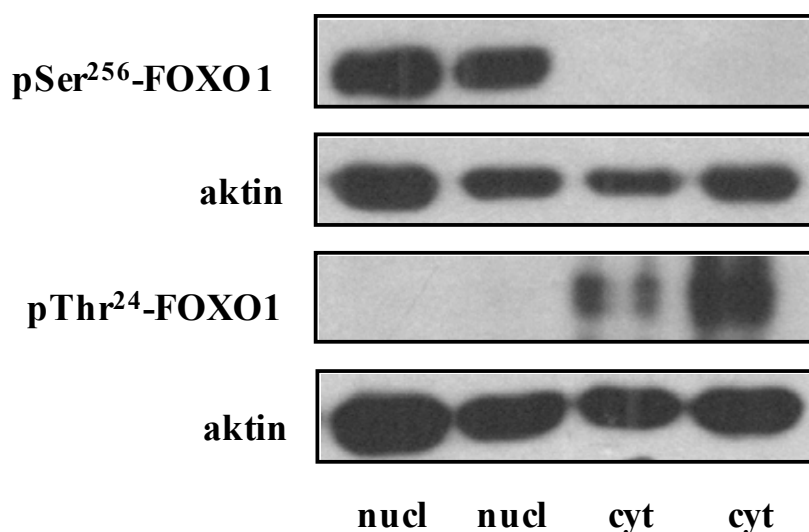
4.2.3. A FOXO1 két foszforilált formájának intracelluláris eloszlása különbözik egymástól

Ovariektomizált patkányok uteruszából a módszerek között leírt módon sejtmagban gazdag és citoplazmában gazdag frakciókat izoláltunk. A kapott mintákat Western blottal elemeztük.

A pSer²⁵⁶-FOXO1 ellenes antitesttel kizárólag a sejtmag frakcióban, míg a pThr²⁴ FOXO1 ellenes antitesttel a citoplazma frakcióban kaptunk jelet (11. ábra).

A következőkben intraperitoneális E2 és/vagy intrauterin Wortmannin (vagy DMSO) kezelésen átesett állatok uteruszából izoláltunk sejtmagban gazdag és

citoplazmában gazdag frakciókat. A csak E2-lal kezelt uteruszban a sejtmag frakcióban erős jelet kaptunk a pSer²⁵⁶-FOXO1 ellenes antitesttel (12. A és B. ábra). Az E2-lal és Wortmanninnal is, valamint a csak Wortmanninnal kezelt uteruszokban csak gyenge jelet kaptunk. A DMSO (a Wortmannin oldószere) nem befolyásolta a jel erősségét. A citoplazma frakcióban valamennyi alkalmazott kezelés hatására nagyon alacsony pSer²⁵⁶-FOXO1 szintet detektáltunk (12. A. ábra).



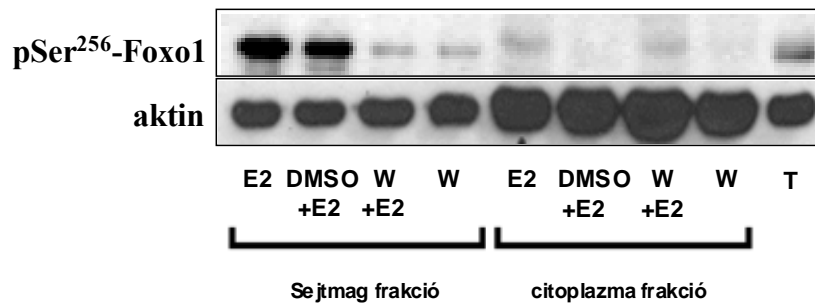
11. ábra A FOXO1 protein pSer²⁵⁶ illetve pThr²⁴ formáinak szubcelluláris eloszlása. A citoplazmában gazdag frakciót (cyt) és a sejtmagban gazdag frakciót (nucl) a módszerek között leírt módon izoláltuk. A mintákban a pSer²⁵⁶-FOXO1 és a pThr²⁴-FOXO1 fehérjék mennyiségét Western blot technikával határoztuk meg.

4.2.4. Részösszefoglalás 2.

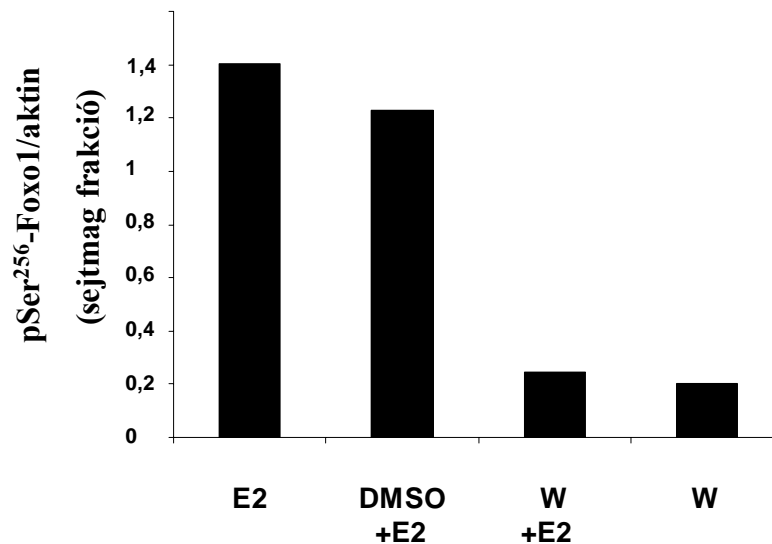
Eredményeink megmutatták, hogy patkány uteruszban az E2 részt vesz a FOXO1 regulációjában. Ösztradiol hatására megemelkedik a pSer²⁵⁶-FOXO1 és a pThr²⁴-FOXO1 szintje is, de eltérő időfüggéssel. Mindkét csoport E2 függő foszforilációját gátolja a Wortmannin, tehát PI3K függő úton zajlik, és nagy valószínűséggel az Akt is részt vesz benne. A szubcelluláris frakciók elválasztására és a sejtmagban gazdag és citoplazmában gazdag frakció vizsgálatára irányuló kezdeti

kísérleteink szerint a FOXO1 két vizsgált regulációs helyének foszforilációja elkülönül egymástól.

A.



B.



12. ábra A pSer²⁵⁶-FOXO1 szubcelluláris eloszlása E2, Wortmannin és E2 (W+E2), DMSO és E2, valamint Wortmannin (W) kezelt uterusban. A citoplazmában gazdag frakciót (cyt) és a sejtmagban gazdag frakciót (nucl) a módszerek között leírt módon izoláltuk. A mintákban a pSer²⁵⁶-FOXO1 mennyiségét Western blot technikával határoztuk meg. **A:** A pSer²⁵⁶-FOXO1 szintje a sejtmag és a citoplazma frakcióban a különböző kezelések hatására. A T jelű minta egy hat órás E2 kezelésen átesett állat uterusának total homogenizátuma. Reprezentatív blot. **B:** A pSer²⁵⁶-FOXO1 és az aktin hányadosa a sejtmag frakciókban. Az oszlopábrát a reprezentatív blot alapján számolt értékek felhasználásával készítettük.

A két csoport E2 válasza közötti időbeli különbség és a szubcelluláris frakciók elemzése arra utal, hogy patkány uterusban a FOXO1 két vizsgált helyének foszforilációja némileg eltérő szabályozás alatt áll.

4.3. Az E2-PI3K-Akt-FOXO jelátviteli út fiziológiai hatásai patkány uteruszban.

A PI3K-Akt útvonal igen ősi és konzervált jelátviteli út, aminek fontos szerepe van a metabolizmus és a sejtciklus szabályozásában. A sejtciklus regulációja az antiapoptotikus és a proapoptotikus folyamatok közti egyensúly függvénye.

Amennyiben az antiapoptotikus, valamint a proliferációs hatások (disszertáció további részében ezekre együttesen „survival” folyamatokként fogok hivatkozni) kerülnek túlsúlyba, fokozott sejtproliferáció és a sejtek kisebb arányú pusztulása figyelhető meg. A survival mechanizmusok túlsúlya figyelhető meg fiziológiás körülmények között a szövetek egyedfejlődés alatti növekedése, fejlődése, és a sérülések utáni regenerációja folyamán. Szintén megfigyelhető egészséges szervezetben bizonyos sejtek fokozott proliferációja az immunrendszer működése, és endometrium szövetben a női nemi ciklus során.

A sejtciklus fontos regulátorai a ciklinek. Ezeket mint a sejtciklus regulátorait (innen ered a nevük is) fedezték fel (Minshull J et al., 1989). A ciklinek a ciklin dependens kinázokat (Cdk) aktiválva regulálják a sejtciklust. A Cdk-ok szintje nem változik a sejtciklus különböző fázisai során, ellenben az azokat aktiváló ciklinek szintézise és lebomlása sejtciklus függő. A G1 fázis során a CD1 felszaporodik, hozzákötődik a Cdk4-hez, így egy aktív CD1-Cdk4 kináz komplexet hozva létre. Ez az aktív kináz komplex bizonyos fehérjéket foszforilálva aktiválja a sejt azon élettani folyamatait, amelyek az S-fázisba való átlépéshez és a DNS replikációra való felkészüléshez szükségesek. Az S és G2 fázis során más ciklinek szaporodnak fel, és a különböző ciklinek koordinált expressziója és lebomlása biztosítja a sejtciklus egymás utáni fázisokba való átlépését. A ciklin D1 a sejtciklus korai szakaszában, a G1-ben expresszálódik, így a sejtosztódás korai markereként használható.

A fejlődés során feleslegessé váló, illetve károsodott sejtek eliminációja a szervezetből apoptózissal (programozott sejthalál) történik, ami a sejtek regulált „öngyilkossága”. Az apoptózist beindíthatja bizonyos extracelluláris szignál molekulák (pl.: Fas1, TNF α) megfelelő receptorokhoz való kötődése, növekedési faktor megvonás, de beindíthatják endogén hatások is, mint például a szabad gyökök felszaporodása.

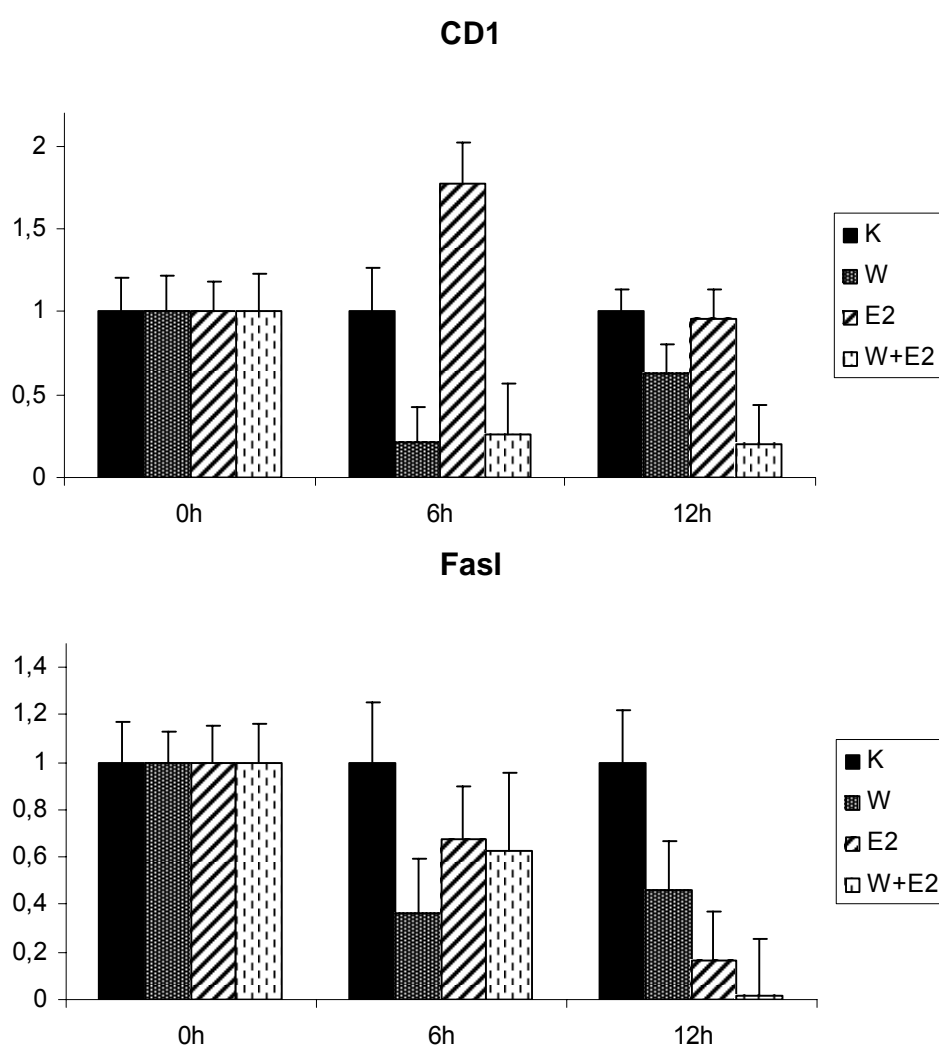
A sejthalál-faktorok megfelelő receptorokhoz kötődve a sejtmembrántól kiinduló jelátviteli kaszkádokat indítanak el. Ezek a jelátviteli kaszkádok transzkripciósfaktorokat aktiválnak, amelyek fokozzák a proapoptotikus hatású fehérjék expresszióját. Ez az apoptózis extramitokondriális útja. Az egyik legfontosabb sejthalál-faktor a Fas-ligand (FasL). Az apoptózis mitokondriális útjának kezdetén bizonyos extracelluláris szignálok hatására megemelkedik az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció, ez a mitokondriumok membránján pórusok (Permeability Transition pore, PT pórus) megjelenését válthatja ki, amiken keresztül citokróm-c jut a mitokondriumokból a citoszolba. A citokróm-c azután az endoplazmatikus retikulumból további Ca^{2+} felszabadulását váltja ki, ezzel erősítve az apoptotikus szignált. Ezen kívül a citokróm-c az apoptoszóma kialakításában, és így az apoptózis effektor fázisában is szerepet kap. A mitokondrium felszínén a PT pórusok megjelenése erősen függ a Bcl-2 fehérjecsaldó antiapoptotikus és proapoptotikus tagjainak egymáshoz viszonyított arányától. Proapoptotikus hatású Bcl-2 fehérje például a Bax, míg a Bcl-2 antiapoptotikus. Ezek mennyisége és foszforiláltsági foka fontos szabályozója az apoptózisnak. Az apoptózis extramitokondriális és mitokondriális útja közös effektor folyamatokat indít be, amelyek eredményeképpen membrán kompartmentkbe csomagolva, az extracelluláris tértől és a többi sejttől izoláltan bomlanak le a sejtet alkotó fehérjék és nukleinsavak.

Az uterusz egyik jellemző válasza az E2 kezelésre a vízimbibíció, azaz a szövetek víztartalmának erőteljes növekedése. Mivel már röviddel az E2 beadása után megfigyelhető, feltehetően nagyrészt nemgenomikus hatások állhatnak a háttérben. Korábban kimutatták, hogy a PI3K gátlása megakadályozza az uterusz E2 indukálta vízimbibícióját (Kazi AA, Koos RD, 2007). Azonban ők LY294002-t használtak, ami közvetlenül az ösztrogén receptoron is hat. Mi Wortmannint használva a PI3K bénítására azt vizsgáltuk, hogy van-e szerepe a PI3K-Akt útvonalnak az uterusz E2 indukálta vízimbibíciójában.

4.3.1. A CD1 expresszióját az E2 egy PI3K függő úton fokozza

A CD1 fontos szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában, a G1-S fázisok közti átmenetet serkenti (Lew DJ et al., 1991), és E2 hatására fokozódik a transzkripciója.

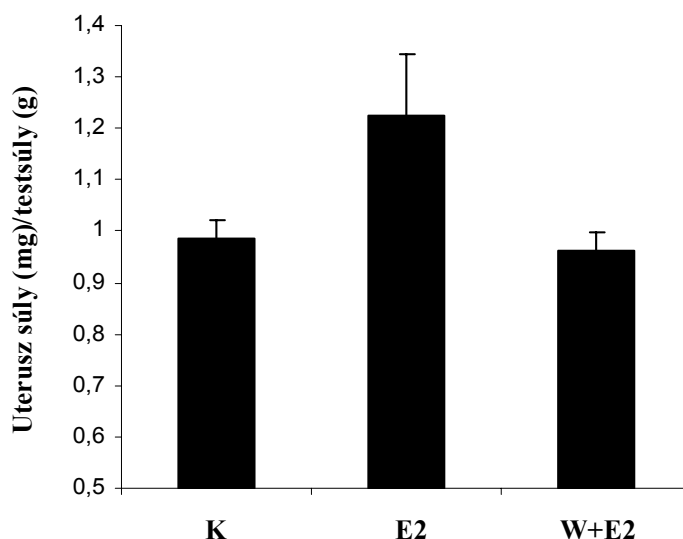
Ösztradiollal és Wortmanninnal kezeltünk ovariektomizált patkányokat, majd az uteruszokból RNS-t izoláltunk, és kvantitatív RT PCR-rel megnéztük, hogy hogyan alakult a CD1 és a FasI mRNS-ének szintje. Ösztradiol kezelés után hat órával mintegy 80%-kal megemelkedett a CD1 mRNS-ének mennyisége, majd 12 órával az E2 injekció után visszatért a kontroll értékre (13. ábra). Az E2 CD1 expressziót fokozó hatását Wortmannin teljesen legátolta, sőt, a CD1 mRNS szintje mind a Wortmannin, mind pedig az E2+Wortmannin kezelt állatokban a kontroll érték alá csökkent.



13. ábra CD1 és FasI mRNS szintjének változása Ösztradiol (E2, 10 µg/100 g tt), Wortmannin (W, 5 µg/állat), valamint E2 és Wortmannin (E2+W) hatására. Az E2+W kezelt állatok esetében a Wortmannint egy órával az E2 előtt adtuk be. Az állatokat 6 illetve 12 órával az E2 injekció után (a csak Wortmanninnal kezelt állatokat a Wortmannin kezelés után 7 illetve 13 órával) dekapitáltuk.

4.3.2. A Fasl expressziója E2 és a Wortmannin kezelés hatására is csökken

A CD1 vizsgálatánál használt mintákban meghatároztuk a Fasl mRNS szintjét is. A Fasl expresszióját Wortmannin jelentősen lecsökkentette hat órával az E2 kezelés után (13. ábra). Az E2 és az E2+Wortmannin kezelt átlatokban enyhe csökkenést figyeltünk meg. Tizenkét órával a kezelés után az E2 fasl expressziót gátló hatása erősebb lett, míg a Wortmanninnal kezelt uteruszok Fasl mRNS szintje megegyezett a hat órás értékkel. A Fasl expresszió legerősebb gátlását az E2-lal és Wortmanninnal is kezelt uteruszokban tapasztaltuk.



14. ábra Wortmannin hatása az ösztadiol (E2) indukálta vízimbibícióra 21 napos patkányok uteruszában. Az állatok E2-t 10 µg/100 g ts, i.p.) és Wortmannint (W, 1,4 µg/g ts) kaptak intraperitoneális injekció formájában. Az E2+W kezelt állatok esetében a Wortmannint egy órával az E2 előtt adtuk be. Az állatokat 2 órával az E2 injekció után dekapitáltuk, majd az uteruszok súlyát lemértük. Az egyes állatok uteruszának súlyát (mg) elosztottuk a testtömegével (g). Az oszlopábrát az így kapott értékek alapján készítettük. Az oszlopok 3-3 kísérlet átlagát +/- SEM mutatják.

4.3.3. A PI3K-Akt útvonalnak szerepe van az E2 kiváltotta vízimbibícióban

Az állatkísérletek előnye, hogy olyan, szerv szintű változásokat is vizsgálni lehet a segítségükkel, amelyeket a sejt kultúrás rendszereken nem. Ösztadiol adása után az uterusz víztartalma jelentősen megnő, ezt hívják vízimbibíciónak. Ennek a

folyamatnak a háttérben az E2 nemgenomikus hatásai állhatnak. Azt megvizsgálandó, hogy a munkánk eddigi részében ismertett molekuláris változások milyen hatással lehetnek egyes fenotípusos történésekre, megvizsgáltuk, hogy a PI3K gátlása milyen hatással van a patkány uterusz vízimbibíciójára. Az intrauterin Wortmannin adminisztráció, amit az eddigi vizsgálatainkban alkalmaztunk, csak az uterusz egyik szarvában gátolja hatékonyan a PI3K-t. Azonban a vízimbibíciót az uterusz súlyának változásával detektáljuk, és ehhez elengedhetetlen, hogy az egész uterusz ugyanazon hatásoknak legyen kitéve. Így az intraperitoneális Wortmannin injekció mellett döntöttünk. Így azonban lényegesen nagyobb mennyiségben kellett adnunk a Wortmannint, ezért kénytelenek voltunk kisebb állatokat használni.

Ehhez a kísérlethez fiatal, 21 napos patkányoknak adtunk intraperitoneális Wortmannin (1,4 µg/g tt.), majd egy órával később E2 (10 µg /100 g tt.) injekciót. Az állatokat hat órával az E2 injekció után dekapitáltuk, és az uteruszuk súlyát lemértük. Az uteruszok súlyát (mg) elosztottuk a testtömeggel (g). Az így kapott értékeket oszlopdiagrammon ábráztuk.

Amint a 14. ábra mutatja, az E2 magában adva az uterusz súlyának növekedését okozta. Ezt a súlynövekedést a Wortmannin kivédte.

4.3.4. Részösszefoglalás 3.

A fenti vizsgálatok azt mutatják, hogy patkány uteruszban az E2 Wortmannin szenitív módon fokozza a CD1 expresszióját. Ugyanakkor a CD1 E2 független expressziója is Wortmannin szenitívnek bizonyult, mivel a csak Wortmanninnal kezelt uteruszok CD1 mRNS szintje alacsonyabb, mint a kontroll állatoké.

A FasI expresszióját valamennyi kezelés gátolta. Úgy tűnik, hogy az E2 FasI expresszió gátló hatása később érvényesül, mint a Wortmanniné, és a Wortmannin nemhogy nem gátolja, hanem még erősíti is az E2 ezen hatását.

A molekuláris történések vizsgálatán túl megnéztük, hogy egy szerv szintű folyamatra, az E2 kiváltotta vízimbibícióra milyen hatása van a PI3K gátlásának. A vízimbibíció az uterusz egyik leggyorsabb fenotípusos válasza E2 kezelésre. Ösztradiol kezelés hatására megnőtt az uterusz súlya, de ez a súlynövekedés elmaradt, ha az E2 előtt egy órával Wortmannint kaptak az állatok.

4.4. Eltérések tapasztalhatók a human uterusz myometrium és myoma Akt rendszere között (Kovács K A et al., 2003)

A humán uterusz myoma a női genitális traktus leggyakoribb daganata. A reprodukív években fordul elő (Crum 1999), és a megbetegedés a nők mintegy 25%-át érinti. Érdekes megemlíteni azt, hogy patológiai vizsgálatok tanúsága szerint az előfordulás jóval magasabb, mintegy 77%-os (Cramer S F, Patel A, 1990). Annak ellenére, hogy a myoma benignus daganat és igen ritkán malignizálódik (Crum 1999) igen sok reprodukciós és nőgyógyászati probléma okozója lehet, mint pl. infertilitás, abortus, kismencedei fájdalom, vérzési rendellenesség (Buttram V C Jr, Reiter RC, 1981). Az USA-ban évente megközelítőleg 200,000 hysterectomia oka myoma (Gambone J C, Reiter R C, 1997).

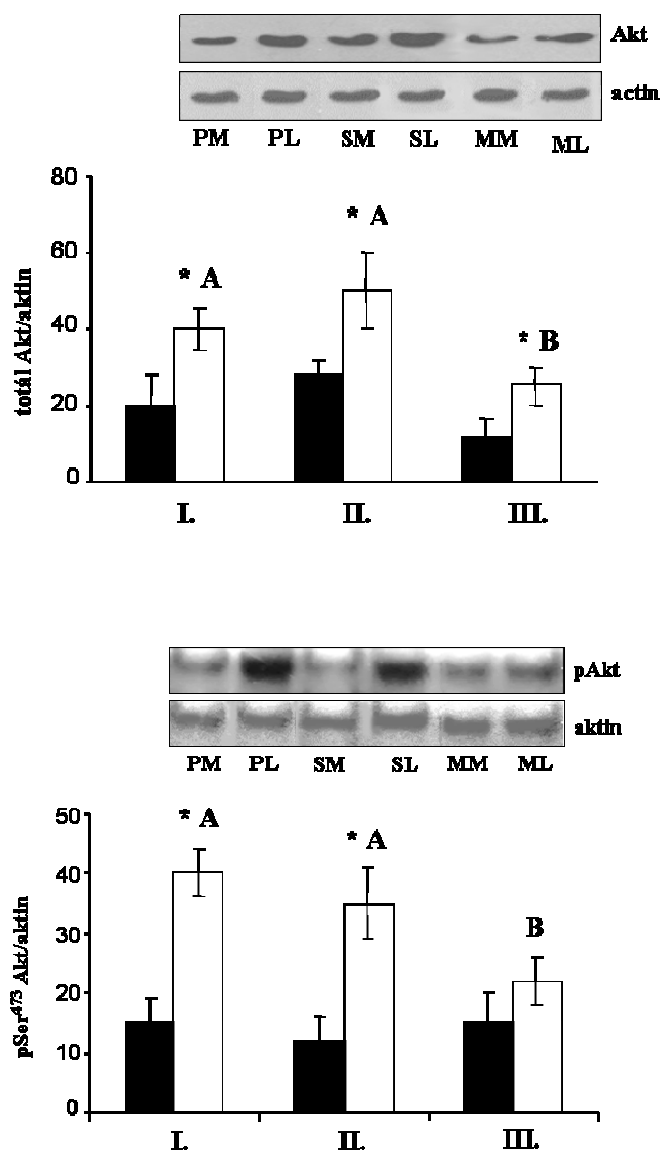
A daganat gyakoriságának ellenére kevés információ áll rendelkezésünkre a myoma etiológiáját illetően. A tumor egy myometrium sejt klonális expanziója révén alakul ki, 30 éves kor körül megnagyobbodik és menopausa után visszafejlődik. A myoma életkorfüggése kétségtelenné teszi az ovariális steroidok szerepét a tumor növekedésében. Bár a PI3K-Akt útvonal hatásait behatóan tanulmányozták endometrium eredetű sejteken és endometrium szövetmintákon, az útvonal szerepével kapcsolatban myometrium szövetben nincs adat.

Az Akt hatását az apoptózis mitokondriális útjára human uterusz myoma, és az ugyanazon uteruszból származó ép myometrium szövet szövet segítségével vizsgáltuk.

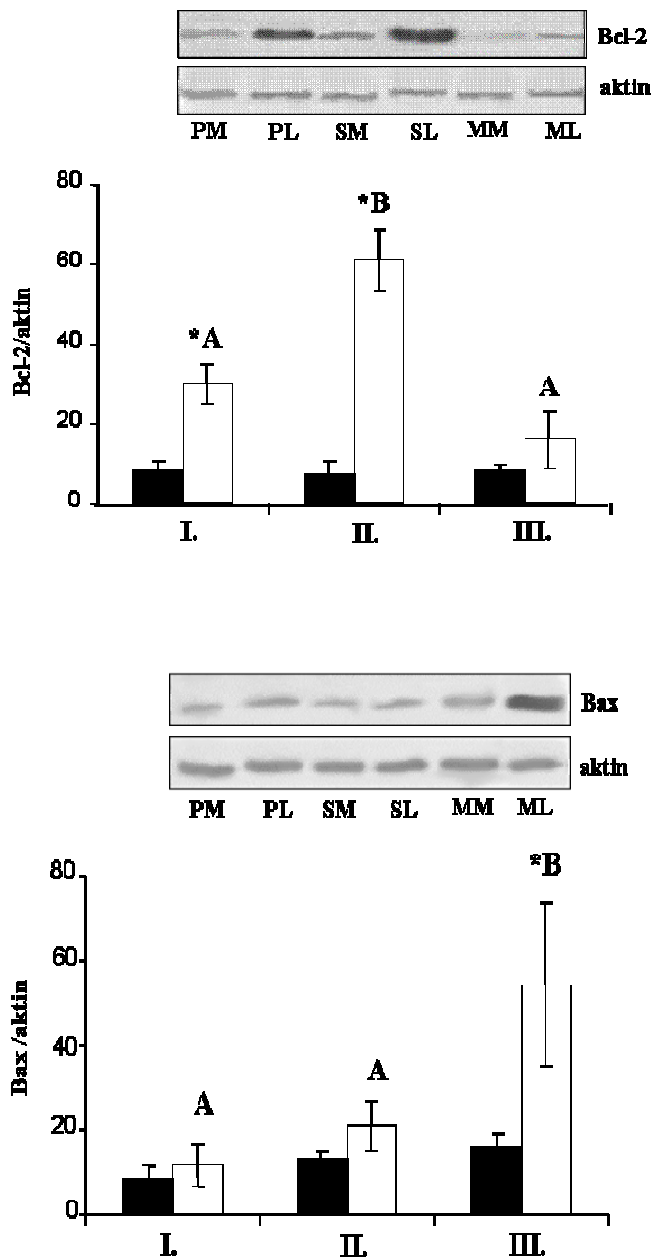
4.4.1. Az Akt eltérő mértékben expresszálódik és aktiválódik human uterusz myomában, mint a kontrollként használt ép myometriumban

Vizsgálatainkban elemeztük, hogy hogyan alakul a myomában és ugyanazon uteruszból származó, nem daganatos ún. „normál” myometriumban az Akt expressziója és foszforilációja.

Az Akt erősebben expresszálódott a myomákból származó mintákban, mint a szomszédos myometriumokban. A ciklus során nem tapasztaltunk változást a fehérje



15. ábra Az Akt és a pSer⁴⁷³ Akt szintjének alakulása emberi uterus leiomyomában (fehér oszlopok) és a szomszédos ép myometriumban (fekete oszlopok) a menstruációs ciklus alatt és menopauzában. I. Proliferációs fázis (n=24); II. Szekréciós fázis (n=24); III. Menopauza (n=15). Insert: reprezentatív blot: PM: proliferációs myometrium; PL: proliferációs leiomyoma; SM: szekréciós myometrium; SL: szekréciós leiomyoma MM: menopauzás myometrium; ML: menopauzás leiomyoma. A különböző betűkkel jelölt értékek szignifikánsan különböznek egymástól (p<0,05). A csillag a myometrium és a myoma között szignifikáns különbséget mutat.



16. ábra A Bcl-2 és a Bax fehérje szintjének alakulása emberi uterusz leiomyomában (fehér oszlopok) és a szomszédos ép myometriumban (fekete oszlopok) a menstruációs ciklus alatt és menopauzában. I. Proliferációs fázis (n=24); II. Szekréción fázis (n=24); III. Menopauza (n=15). Insert: reprezentatív blot: PM: proliferációs myometrium; PL: proliferációs leiomyoma; SM: szekréción myometrium; SL: szekréción leiomyoma MM: menopauzás myometrium; ML: menopauzás leiomyoma. A különböző betűkkel jelölt értékek szignifikánsan különböznek egymástól ($p < 0,05$). A csillag a myometrium és a myoma között szignifikáns különbséget mutat.

mennyiségében, viszont a menopausa kezdeti szakaszában az Akt expressziója szignifikánsan csökkent (15. ábra).

A pSer⁴⁷³Akt szintje alacsony volt valamennyi vizsgált myometrium szövetben. Ugyanez mondható el a menopauzás uterusból származó myomákról is, azonban a ciklus proliferációs és szekréción fázisában a myomákban fokozott Akt foszforilációt tapasztaltunk (15. ábra).

4.4.2. Az antiapoptotikus Bcl-2 és a proapoptotikus hatású Bax fehérje szintje eltérő a myomáman és a környező myometriumban

A Bcl-2 erőteljesen expresszálódott a myomákban menstruációs ciklus alatt, szintje a szekréción fázisban szignifikánsan magasabb, mint a proliferációsban. A myometriumokban valamint a menopauzás mintákban csak gyengén volt detektálható (16. ábra).

A Bax fehérje szintje menopauzás myomákban volt a legmagasabb, a többi mintában lényegesen gyengébben expresszálódott (16. ábra).

4.4.3. Részösszefoglalás 4.

A human minták vizsgálata azt mutatta, hogy a vizsgált antiapoptotikus hatású fehérjék (az Akt és a Bcl-2) expressziója szignifikánsan magasabb volt a myomákban, mint a velük szomszédos myometriumban. Az Akt aktivitása is magasabb volt a myomákban. A proapoptotikus Bax szintjében nincs különbség a myoma és a szomszédos myotrium között. Ugyanakkor menopauza után megnő a Bax mennyisége a myomákban. Mindezen változások jól egybevágóak azzal, hogy a myoma sejtek proliferációs aktivitása erősebb, mint a myotrium sejteké, viszont menopauza után a myoma méretbeli csökkenése figyelhető meg.

5. Következtetések

Az ivarérett emlősök uterusza ciklusos változásokon megy keresztül (ösztrozusz, illetve menstruációs ciklus, fajtól függően). Az ösztrozusz/menstruációs ciklus első felében a fokozott sejtosztódás eredményeként az endometrium megvastagodik. Az endometriumban zajló sejtproliferáció elsődleges regulátorai a fejlődő ovarialis tüszőkben termelődő ösztrogének.

Az ösztrogének női nemi hormonok. Szteránvázas vegyületek, amelyeknek a női nemi működés szabályozásán kívül szerepük van a férfi nemi működések, valamint egyéb fiziológiai folyamatok, mint például a csontanyagcsere, a kardiovaszkuláris rendszer és az idegrendszer működésének szabályozásában is. Emberben három biológiailag aktív ösztrogén fordul elő jelentősebb koncentrációban, az ösztradiol, ösztriol és az ösztron.

Bár az ösztrogéneket és legjellemzőbb hatásaikat már a 30-as években felfedezték, a hatásmechanizmusuk még sokáig tisztázatlan maradt. A vitát az ösztrogén receptor felfedezése döntötte el. 1985-ben sikeresen klónozták az első ösztrogén receptort, a human ER α -t. Ekkor általánosan elfogadottá vált, hogy az E2 az ER-okon, mint ligand függő transzkripciós faktorokon keresztül szabályozza bizonyos (ösztrogén reszponzív) gének transzkripcióját. E modell szerint az E2 az ER ligand-kötő doménjéhez kapcsolódik, ennek hatására a receptor konformációja megváltozik, addig rejtett koaktivátor kötőhelyek és dimerizációs felszínek válnak szabaddá. Az előbbiekhöz transzkripciós koaktivátorok kötődnek, míg az utóbbiak az ER dimerizációját segítik elő. A dimer forma affinitása lényegesen nagyobb a DNS-hez, mint a monomeré, ezért a dimer stabilan hozzákötődik a megfelelő DNS szekvenciákhoz (az ösztrogén reszponzív elemekhez). Az így létrejött komplexhez azután hozzákapcsolódik a központi transzkripciós apparátus, és elindul a transzkripció. Ez a mechanizmus ösztrogén reszponzív elemek jelenlétét feltételezi az adott gén promóter régiójában. Azonban az ösztrogén reszponzív gének mintegy harmadának promótere nem tartalmaz ilyen szekvenciákat, ezek transzkripcióját alternatív utakon regulálja az E2. Ilyen alternatív utak például a bevezetésben vázolt AP1 és SP1 útvonalak. Az ER egyes gének expressziójának gátlására is képes, azonban nem egy általános mechanizmussal, hanem szinte minden represszált génre

eltérő módon hat (Cvoro A et al., 2006; Jones D R et al., 2002; Murakami Y et al., 2005).

A PI3K-Akt jelátviteli út az egyik legfontosabb survival útvonal emlős sejtekben. A PI3K-t növekedési faktorok (pl.: EGF, Koyama N et al., 2003), és számos hormon, mint az inzulin (Giorgetti S et al., 1992), angiotenzin II (Ishimatsu S et al., 2006), leptinek (Martín-Romero C, Sánchez-Margalet V, 2001) aktiválják. Ezen receptorok tirozin kinázok közreműködésével aktiválják a PI3K-t. A PI3K aktivációja megemeli az inozitol-trifoszfátok szintjét, amik számos fehérjét aktiválva serkentik a survival-, és gátolják a proapoptotikus folyamatokat, valamint befolyásolják a sejt anyagcseréjét is.

Tehát a PI3K-Akt útvonal igen fontos szerepet játszik a sejtciklus és az apoptózis szabályozásában, és ezeknek a folyamatoknak kitüntetett szerepe van az emlős uterusz ösztrozus/menstruációs ciklusa során lezajló változásokban. Munkánkban a PI3K-Akt útvonalnak az uterusz E2 indukálta változásaiban betöltött szerepét vizsgáltuk.

Eredményeinket áttekintve megállapítható, hogy a PI3K-Akt jelátviteli út humán és patkány uteruszban kimutatható és funkcionál. E jelátviteli út szabályozásában szerepet játszanak a nemi szteroidok is. Adataink arra utalnak, hogy humán uteruszban a menstruációs ciklus során, patkány uteruszban pedig a nemi érés alatt jellegzetesen változik az aktivitása.

Ismert, hogy az uterusz ösztrogénérzékenysége a pubertás során alakul ki. Kaye és munkacsoportja fejlődésben lévő állatok uteruszát vizsgálva megállapította, hogy 15 napos kor alatt semmilyen hatása nincs egy egyszeri E2 injekciónak, 15 napos korban fokozza az uterusz vízimbibícióját, 20 napos kortól kezdve pedig a DNS szintézist és a sejtosztódást is (Kaye A M et al., 1972). A különböző életkorú állatokkal végzett kísérleteink, amelyekben az E2 hatására bekövetkező Akt aktivációt vizsgáltuk, ennek megfelelő eredményre vezettek: 11 napos állatok uteruszában az E2 nem volt hatással az Akt aktivációra, viszont 28 napos korban már – a felnőtt állatokhoz hasonlóan - fokozta azt. Ez arra utal, hogy az E2 nemgenomikus hatásait is csak megfelelő érettségű uteruszban képes kifejteni, és ez az érés a pubertás környékén fejeződik be. Az Akt aktivációját vizsgálva megállapítottuk, hogy E2 hatására a fehérje aktiválódott 28 napos ivaréretlen, és ivarérett állatokban is.

Az ER hatásának gátlására az ICI 182,780 nevű vegyületet használják (Wakeling AE, Bowler J, 1992). Megállapítottuk, hogy ICI 182,780 előkezelés gátolta az E2 Akt aktiváló hatását, azonban nem befolyásolja a bazális Akt foszforilációt. (Disszertációmban a sem E2-lal, sem pedig Wortmanninnal nem kezelt, 5 nappal korábban ovariectomizált állatokban mérhető fehérje szinteket bazális szintnek nevezem.)

A PI3K gátlására többnyire az LY294002-t, vagy a Wortmannint használják. Mivel az LY294002-ről kimutatták, hogy az ER-hoz kapcsolódva gátolja azt (Pasapera Limon AM et al., 2003), ösztrogén hatás vizsgálatánál vitatható a használata. Igaz ugyan, hogy a Wortmannin a PI3K-on kívül gátolja a Polo-like kinázt (Liu Y et al., 2005), és nagyobb koncentrációban a DNS-függő protein kinázt (Rosenzweig KE et al., 1997), a miozin könnyűlánc kinázt (Nakanishi S et al., 1992) valamint a foszfatidilinozitol 4-kinázt (Meyers R, Cantley LC 1997), azonban jelenlegi tudásunk szerint e fehérjéknek nincs szerepük az általunk vizsgált folyamatokban, így ennek használata mellett döntöttünk. Wortmannin kezelés teljesen megakadályozta az E2 indukálta Akt foszforiláció fokozódást, tehát az Akt foszforiláció PI3K függő úton megy végbe az uterusban. Megjegyzendő, hogy a Wortmannin a pAkt szintjét az E2-lal nem kezelt állatokban is csökkentette, tehát a bazális állapotban megfigyelhető Akt foszforiláció is PI3K függő. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy a bazális Akt foszforilációt ER független, de PI3K függő módon tartják fenn olyan endokrin és parakrin mediátorok, amelyek az ovariectomizált állatokban is jelen lehetnek (pl. a korábban említett inzulin, EGF). Mivel ez a bazális pAkt szint elég magas (E2 kezeléssel kb 80%-kal tudtuk megemelni, viszont a Wortmannin több mint 90%-át eltünteti), további kutatások szükségesek az ovariectomizált állatok uterusának PI3K-Akt rendszerét szabályozó tényezők azonosításához és élettani jelentőségük tisztázásához. Ugyanakkor az E2 kezelés hatására bekövetkező Akt foszforiláció fokozódás teljes mértékben (vagy legalábbis nagyrészt) ER és PI3K függő.

A FOXO1 ugyancsak foszforilált állapotban van kontroll állatokban is, mind a Thr²⁴, mind pedig a Ser²⁵⁶-csoporton, és mindkét csoport foszforilációja PI3K függő (bár a Thr²⁴-csoport Wortmanninra érzékenyebbnek tűnik, mint a Ser²⁵⁶-csoport). Ösztradiol hatására a pSer²⁵⁶-FOXO1 szintje gyorsan megemelkedik, a pThr²⁴-

FOXO1 szintje viszont csak 12 órával az E2 injekció után. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a fokozott Ser²⁵⁶-FOXO1 foszforilációért nemgenomikus mechanizmusok felelősek. A Thr²⁴-csoport foszforilációja viszont elég későn következik be ahhoz, hogy transzkripciós mechanizmusokat is feltételezzünk a háttérben. Akár a megfelelő kinázok, akár a FOXO1 expressziójának a szintje emelkedik meg, a pThr²⁴-FOXO1 szintje megemelkedhet. Azonban, ha a FOXO1 expressziója fokozódna, akkor a pSer²⁵⁶-FOXO1 szintnek is emelkednie kellene. Ehelyett azt látjuk a 9. ábrán, hogy a pThr²⁴-FOXO1 szint megemelkedésekor a pSer²⁵⁶-FOXO1 szintje a kontrollhoz közeli szintre csökkent vissza. Tehát ezen késői Thr²⁴ foszforiláció inkább a megfelelő kinázok expressziójának vagy az őket szabályozó jelátviteli utak aktivitásának a változásával magyarázható.

Akár az Akt, akár a FOXO1 foszforilációját vizsgáljuk, nem szabad figyelmen kívül hagyni a kérdéses csoportokat defoszforiláló foszfatázokat. Wortmannin kezelés gátolja a PI3K, és az általa regulált kinázok (pl.: Akt) aktivitását, de nincs irodalmi adat arra vonatkozóan, hogy hatással lenne a foszfatázok aktivitására. Egy adott csoport foszforilációs állapota a ráható kinázok és foszfatázok aktivitásának eredője. Ha gátoljuk a kinázokat, a foszfatázok aktivitása viszont változatlan marad, akkor a vizsgált csoportról a foszfatázok eltávolítják a foszfát csoportot. Amennyiben a kináz gátlása nélkül (tehát a kontroll állatokban) közel állandó szinten van az adott csoport foszforilációs szintje, akkor a kináz gátlásakor megfigyelhető foszforiláció csökkenés, ami a foszfatázok aktivitásának következménye, arányos a megfelelő kinázok eredeti (gátlás előtti) aktivitásával. Ezt figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy az Akt Ser⁴⁷³-as és a FOXO1 Thr²⁴-es csoportjának foszforilációja igen intenzív, mert Wortmannin kezelés után gyorsan lecsökken foszforilált formáik szintje. Hozzájuk képest a bazális pSer²⁵⁶-FOXO1 szint kevésbé érzékeny a PI3K gátlására. Ez azt jelenti, hogy az utóbbi csoport bazális foszforilációjának fenntartásában kisebb szerepet játszanak a PI3K függő kinázok. Tehát vagy kisebb intenzitással folyik a foszforilációja, vagy pedig nagyobb mértékben vesznek részt a bazális foszforilációs szint fenntartásában PI3K független kinázok.

Az ER-PI3K-Akt útvonal aktiválódásának a FOXO1 foszforilációjára gyakorolt hatását vizsgálva a Thr²⁴ és Ser²⁵⁶ csoportok foszforilációjának időbeli elkülönülését tapasztaltuk. Ez azért érdemel figyelmet, mert mindkét csoport szubsztrátja az Akt-

nak, és sejt kultúrák kísérletekben a Ser²⁵⁶ foszforilációját gyorsan követi a Thr²⁴ és - az általunk nem vizsgált - Ser³¹⁹ oldalláncok foszforilációja. A két csoport foszforilációjának eltérő szerepe lehet a FOXO1 regulációjában. A Ser²⁵⁶ foszforilációja olyan szerkezeti változást okoz a FOXO1 szerkezetében, hogy annak lecsökken az affinitása a DNS-hez. A mi vizsgálatunkban gyorsan bekövetkezett ezen oldallánc foszforilációja, ami feltételezhetően a FOXO1 gyors inaktivációjához vezet. A későbbi Thr²⁴ foszforiláció a FOXO1 nukleáris exklúziójához vezethet. Ezt támasztja alá, hogy a pSer²⁵⁶ és a pThr²⁴ FOXO1 intracelluláris eloszlását vizsgálva azt találtuk, hogy az előbbi nagyrészt a sejtmagban, az utóbbi pedig nagyrészt a citoplazmában gazdag frakcióban volt jelen. A 11. ábrán a pSer²⁵⁶ FOXO1 csak a sejtmag frakcióban, a pThr²⁴ FOXO1 pedig kizárólag a citoplazmában gazdag frakcióban detektálható. Ez azonban nem jelenti azt, hogy ezek a formák kizárólag az adott frakcióban találhatók meg. A FOXO1 Ser²⁵⁶ csoportjának foszforilációja, bár inaktíválja a FOXO1-et, önmagában nem elég a hatékony nukleáris exklúzióhoz. Ehhez a Ser³¹⁹, Ser²⁵⁶ és a Thr²⁴ csoportok mindegyikének foszforilálnia kell. Valószínűleg a FOXO1 foszforilálatlan és a csak a Ser²⁵⁶ -on foszforilált része a magban, míg a mindhárom regulációs helyen foszforilált része a citoplazmában található. Arra, hogy a pSer²⁵⁶-FOXO1-et csak a sejtmagban gazdag frakcióban tudtuk detektálni, vagy az lehet a magyarázat, hogy a FOXO1 Ser²⁵⁶-on foszforilált formájának nagy része nincs foszforilálva a Thr²⁴-en, tehát a sejtmagban helyezkedik el, vagy az, hogy a sejtfrakciók elválasztásához használt módszer során nagyobb a veszteség a citoplazma-, mint a sejtmag frakcióban. A FOXO1 intracelluláris eloszlását vizsgálva meg kell említeni, hogy a FOXO fehérjék a sejtmagban komplexet képezhetnek bizonyos fehérjékkel, ami elősegítheti a nukleáris lokalizációjukat. Kimutatták például, hogy a FOXO transzkripciós faktorok ligand függő módon kapcsolódhatnak az ER α -val (Schoor E R et al., 2001). Ez a kötődés egyben módosítja mindkét fehérje transzkripciós aktivitását is. A FOXO1 nukleáris retencióját fokozhatja a Sirt1-gyel (egy deacetilázzal) való komplex képzés (Frescas D. et al., 2005) is. A Sirt1 általi deacetiláció módosítja a FOXO funkcióját is: gátolja a FOXO proapoptotikus aktivitását, de serkenti az oxidatív stressz elleni védekezést, DNS javítást fokozó hatásait. A Thr²⁴ és Ser²⁵⁶ elkülönült foszforilációjának hátterében egy vagy több, eddig még nem azonosított kináz állhat. A 11. és 12.

ábrákat összehasonlítva megfigyelhetjük, hogy a Wortmannin a sejtmag frakcióban nagyobb mértékben csökkenti a pSer²⁵⁶-FOXO1 szintjét, mint a totál homogenizátumban. Ez utalhat arra, hogy a sejtmagban intenzívebb FOXO defoszforiláció zajlik, mint a citoplazmában. További kutatások szükségesek a különböző aktivációs helyek izolált foszforilációjának a fehérjék működésére gyakorolt hatásának kiderítésére.

A fenti molekuláris folyamatok hatását az uterusban zajló sejtosztódásra közvetett módszerekkel vizsgáltuk. Egyrészt az Akt egyes szubsztrátjainak (az antiapoptotikus hatású Bcl-2-nek és a proapoptotikus hatású Bax-nak) a szintjét vizsgáltuk proliferációs és szekréciós fázisban lévő, illetve menopauzás nőkből származó uterus mintákban. Másrészt E2-lal és Wortmanninnal kezelt patkányok uterusában vizsgáltuk az E2 érzékeny, proliferatív hatású ciklin D1 (CD1) és a FasI expresszióját.

Sem az Akt expressziója, sem pedig foszforilációjának szintje nem változott a myometriumban sem a ciklus egyes fázisai alatt, sem pedig a menopauza során. Ellenben a myomákban a szekréciós és proliferációs fázisban is erősebben expresszáldott, és a foszforilált formájának szintje is magasabb volt, mint a menopauzás mintákban. Az egyes fázisokból származó ép és kóros mintákat összehasonlítva azt láthatjuk, hogy a proliferációs és szekréciós fázisban a myomák Akt és pSer⁴⁷³-Akt szintje is magasabb a myomákban, mint a környező myometriumban. Azonban menopauza során ez a különbség eltűnik azáltal, hogy a myomákban a vizsgált molekulák koncentrációja lecsökken a myometriumokra jellemző szintre. Az is megfigyelhető, hogy nagyobb a különbség a myometriumok és a myomák pSer⁴⁷³-Akt, mint Akt szintje között. Ez a nagyobb különbség arra enged következtetni, hogy reprodukív korban a myomákban nemcsak az Akt expressziója, hanem az aktivációja is intenzívebb, mint a myometriumban. Egyes myometrium sejtek fokozott E2 érzékenysége áll a myoma kialakulásának háttérében. E sejtek a fiziológias E2 koncentrációra fokozott proliferációs aktivitással válaszolnak, és klonális expanzióval létrehozzák a myomát. Eredményeink alapján feltehető, hogy a fokozott E2 érzékenység hatására aktívabbá váló Akt rendszerük állhat a fokozott proliferációs képesség háttérében. Feltehetőleg a menopauza utáni E2 szint már az ilyen, magasabb E2 érzékenységgel bíró myomás sejtek számára sem

elegendő a sejtproliferáció fenntartásához és az apoptózis elkerüléséhez, és a myomák menopausa során történő regressziója erre vezethető vissza.

Az Akt-hoz hasonlóan, reprodukív korban a Bcl-2 fehérje szintje is magasabb a myomákban, mint a környező myometriumban, és a menopauzát kísérő E2 szint csökkenés hatására ennek a fehérjének a szintje is lecsökken a myomában, azonban itt a proliferációs és szekréciós myomák között is szignifikáns különbség van. Lehetséges, hogy az E2 Bcl-2 expressziót serkentő hatását a progeszteron fokozza. A myometriumban lényegesen alacsonyabb a Bcl-2 expresszió, és nem is változik sem a ciklus során, sem pedig a menopausa hatására. Úgy tűnik, hogy ép myometriumban a Bcl-2 expresszió nem E2 függő, és a myoma kialakulása során válik azzá. Annak kiderítése, hogy a Bcl-2 expresszió E2 függővé válása szükséges és elégséges oka a myoma kialakulásának, vagy pedig egy általánosabb változás következménye, további vizsgálatokat igényel.

Reprodukív korban a proapoptotikus Bax fehérje expressziója nem tűnik E2 érzékenynek. A ciklus során nem változik a szintje sem a myometriumban, sem pedig a myomában. Azonban a menopauzás uteruszok myomájában szignifikáns emelkedést mutat. Úgy tűnik, hogy a Bax nem játszik szerepet a myoma kialakulásában, viszont hozzájárul a myomák menopausa utáni regressziójához.

A CD1 expressziója E2 hatására fokozódik (Geum D et al., 1997). A CD1 promóter régiójában nem azonosítottak teljes ERE szekvenciákat, viszont tartalmaz AP1 és SP1 kötőhelyeket (ez utóbbi közelében egy fél ösztrogén-reszponzív elemet), valamint cAMP- reszponzív elemet (CRE). Ezek alapján az E2 CD1 expressziót fokozó hatását kifejtheti a bevezetésben ismertetett SP1 útvonalon, indirekt DNS kötődés útján, vagy pedig valamilyen extranukleárisan kezdődő útvonalon keresztül. Az, hogy Wortmanninnal gátolni lehetett az E2 indukálta CD1 expresszió fokozódást, arra utal, hogy az E2 egy extranukleárisan kezdődő, PI3K függő útvonalon fokozza a CD1 expresszióját. A Wortmannin hatására bekövetkező CD1 mRNS szint csökkenés a PI3K aktivitás csökkenését tükrözheti. De korábban kimutatták azt is, hogy Wortmannin hatására a CD1 mRNS-nek a féléletideje lerövidül (Dufourny B, 2000), így változatlan transzkripció aktivitás mellett is lecsökkenhet a CD1 mRNS mennyisége a szövetben.

Kísérleteinkben a FasI expresszióját mind az E2, mind pedig a Wortmannin csökkentette. Annak, hogy a PI3K gátlása növeli a FOXO1 aktivitását, látszólag ellentmond az, hogy a Wortmannin kezelés is csökkentette a FasI mRNS szintjét, mivel a promóterében található forkhead-box kötőhely, és a FOXO3 serkenti ezen keresztül a FasI expresszióját (Brunet A et al., 1999). Azonban, mint a legtöbb eukarióta gén, a FasI promótere is több transzkripciós faktor kötőhelyet tartalmaz, és az egyes transzkripciós faktorok szerepe az egyes gének aktivitásának szabályozásában sejttípusonként eltérő. Ezen különbségek a sejtek eltérő transzkripciós faktor készletének, és a sejtekben zajló jelátviteli utak sokféleségének köszönhetőek. A FasI a FOXO1 kötőhelyen kívül tartalmaz nuclear faktor κ B (NF κ B) kötőhelyet is. A NF κ B szintén egy transzkripciós faktor, aminek a regulációját nagyrészt egy másik fehérje, a gátló hatású I κ B végzi. A szabályozás az I κ B foszforilációján keresztül valósul meg. A foszforiláció elősegíti az I κ B degradációját, így a NF κ B felszabadul a gátlás alól, és hozzájárulhat az NF κ B kötőhellyel rendelkező gének transzkripciójához. Az I κ B-t az I κ B kinázok foszforilálják (IKK α és β). Kimutatták, hogy IKK α -t PI3K függő módon foszforilálja az Akt (Ozes ON et al., 1999). Az, hogy az Akt aktivitása milyen mértékben járul hozzá a NF κ B regulációjához, sejttípusonként eltérő (Gustin JA et al., 2004). Uterusz szövettel kapcsolatban nincs adat a NF κ B Akt érzékenységről. Az általunk tapasztalt Wortmannin kiváltotta FasI expresszió csökkenés a PI3K-Akt-I κ B útvonal csökkent aktivitásával előálló magasabb I κ B szintnek lehet a következménye.

Az E2-nek a FasI expressziójára lehet sekentő és gátló hatása is. Kimutatták a FasI expresszió E2 kezelésre bekövetkező emelkedését (Selam B et al., 2001), de a csökkenését is (Wu X et al., 2003), valamint azt, hogy E2 megvonás hatására fokozódik a FasI expressziója (Song J, 2002). Ezen eltérő irodalmi adatok, és az uterusz felépítésének összetett volta miatt nem tudjuk megmondani, hogy pontosan milyen mechanizmuson keresztül hat az E2 a FasI expressziójára ebben a szervben. Immunhisztokémiás és in situ hibridizációs technikák alkalmazásával, valamint siRNS technikákkal lehet majd a későbbiekben tisztázni a pontos útvonalakat.

Végezetül megnéztük, hogy a PI3K-Akt útvonal gátlása hogyan befolyásolja az uterusz E2 kiváltotta vízimbibícióját. Ez egy szerv szintű válasz, amit csak

állatkísérletes modelleken lehet vizsgálni. Eredményeink azt mutatják, hogy az E2 kiváltotta vízimbibícióban fontos szerepe van a PI3K útvonalnak, mert az E2 ezen hatását a Wortmannin sikeresen gátolta. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a vízimbibíciót az E2 nemgenomikus útvonalakon, például a PI3K-Akt útvonal aktiválásán keresztül váltja ki. Tehát az E2 genomikus és nem genomikus hatásai nem csak az intracelluláris események szintjén, hanem a szervek szintjén is egymással együttműködve, egymást kiegészítve működnek.

Állatkísérletes és human minták vizsgálatán alapuló eredményeinket összegezve megállapíthatjuk, hogy az egyedfejlődés során az Akt rendszer E2 érzékennyé válása egybeesik az E2-ER rendszer éréseivel. Az Akt foszforilációt részben az E2, részben egyéb hormonok szabályozzák, PI3K függő módon. Az E2 hatását az Akt foszforilációra uterusban az ER-ok mediálják. Az E2 által indukált CD1 expresszió fokozódásban fontos szerepe van a PI3K-Akt jelátviteli útnak. Az Akt szubsztrát FOXO1 Thr²⁴-es és Ser²⁵⁶-os csoportjának ösztrogén és PI3K érzékenysége is eltérő. A bizonyos rendszerekben FOXO által regulált FasL expressziójában emlős uterusban feltehetőleg nincs, vagy csak alárendelt szerepe van a FOXO1-nek. Az, hogy a fenti megállapítások némelyike eltér a korábbi, *in vitro* kutatások eredményeitől, megerősíti, hogy bár a sejt kultúrák rendszerek segítségével végzett kutatások nélkülözhetetlenek az életfolyamatok mögött álló molekuláris események feltérképezésében, önmagukban nem elégségesek az *in vivo* történések megismeréséhez. Az *in vivo* vizsgálatok, szövetanalízisek adatai egyrészt elengedhetetlenek tűnnek azoknak a molekuláris, hormonális interakcióknak, regulációs kaszkádoknak a megismeréséhez, amelyek meghatározóak a homeosztázis biztosításában, másrészt pedig hozzásegíthetnek a patológiás eltérések megismeréséhez, szerencsés esetben újabb terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez. Az *in vivo* történések megismerése azért is sürgető, mert már kifejlesztés alatt állnak olyan gyógyszerek, amelyek a PI3K-Akt útvonalat célozzák meg. Így nagyon fontos, hogy ezen útvonal élettani hatásait a lehető legpontosabban megismerjük.

6. Összefoglalás

Vizsgálataink elsődleges célja az E2 indukálta korai válaszreakciók egyikének, a PI3K-Akt jelátviteli út jellegzetességeinek elemzése *in vivo* körülmények között. Munkánk során kidolgoztunk egy olyan kísérletes modellt, amivel patkány uteruszban vizsgálhattuk a PI3K szerepét.

Megállapítottuk, hogy az Akt minden vizsgált életkorban (7, 14, 21, 28, 35 napos és felnőtt állatokban is) expresszálódik és foszforilálódik. Ösztradiol kezelés hatására az Akt foszforiláció fokozódik ivaréretlen (28 napos) és felnőtt patkányok uteruszában. Az E2 indukálta Akt foszforiláló gátolható mind az ER antagonistá ICI 182,780-nal, mind pedig a PI3K gátló Wortmanninnal, tehát ER és PI3K függő úton zajlik.

A FOXO1 transzkripció faktor expresszálódik ivarérett patkányok uteruszában. Ezen fehérje Ser²⁵⁶ és Thr²⁴-csoportjainak foszforilációja eltérően válaszol E2 kezelésre és a PI3K Wortmanninnal történő gátlására. A Ser²⁵⁶-csoport foszforilációja korábban fokozódik, mint, a Thr²⁴-é. Ugyanakkor az utóbbi érzékenyebb a PI3K gátlására. Wortmannin kezelés hatékonyabban csökkenti a pThr²⁴-FOXO1-et, mint a pSer²⁵⁶-FOXO1 szintjét.

A FOXO1 Ser²⁵⁶-on foszforilált formája elsősorban a magban detektálható mind a kontroll, mind pedig az E2 kezelt állatok uteruszában. Ezzel szemben a Thr²⁴-en foszforilált forma a citoplazmában helyezkedik el.

Az Akt és a FOXO1 bizonyos mértékig foszforilálódik kontroll állatokban is, így az E2-on kívül más faktorok is fontos szerepet játszhatnak a regulációjukban.

A CD1 expresszió E2 kezelés hatására Wortmannin érzékeny módon fokozódik, tehát az E2 ezen hatásában szerepe van egy PI3K-függő útvonalnak. A FasI expresszióját az E2 kezelés és a PI3K gátlása is csökkenti.

A human myometrium és myoma szövetminták vizsgálata során azt találtuk, hogy a vizsgált survival faktorok (Akt, pSer⁴⁷³Akt és Bcl-2) szintje magasabb a myomában, mint a környező myometriumban, és a menopausa után lecsökken. A proapoptotikus hatású Bax fehérje szintje a myomában a menopausa után megemelkedik. Ezek a változások összhangban vannak azzal, hogy menopausa után a myoma regressziója figyelhető meg.

Munkánk jelentősége abban rejlik, hogy in vivo rendszereken vizsgáltuk a PI3K-Akt-FOXO1 útvonalat. Bár számos munka foglalkozott korábban ezen útvonal felderítésével, viszonylag kevés olyan volt köztük, ami az uterusban betöltött szerepét vizsgálta. Az állatkísérletekből és a human szövetminták vizsgálatából nyert adatok ezen rendszerek összetettsége miatt nehezebben magyarázhatók molekuláris részletességgel, mint az in vitro kísérletek eredményei. Azonban éppen ez az összetettség, az, hogy az uterusban zajló változásokat in vivo vizsgáljuk, ahol számos, részben még ismeretlen faktor szabályozása alatt áll, közelebb vihet bennünket a vizsgált útvonal szervezetben betöltött fiziológiai és patológiai szerepének megismeréséhez.

7. Köszönetnyilvánítás

Ez alkalommal is szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik munkámat támogatták és lehetővé tették PhD értekezésem elkészítését.

Köszönöm Prof. Dr. Lénárd László akadémikusnak Programvezetőmnek, valamint Prof. Dr. Vértes Marietta témavezetőmnek, akiknek a segítsége meghatározó volt disszertációm létrejöttében.

Köszönettel tartozom a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról Dr. Kovács Kálmánnak és azoknak a munkatársaknak, akik kollaborációs munkánkban részt vettek. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Sümegi Baláznak, és a Biokémiai Intézet dolgozóinak, amiért munkámhoz értékes gyakorlati segítséget nyújtottak.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet Izotóp laboratóriumában dolgozó munkatársaknak, elsősorban Dr. Vértes Zsuzsannának és Dr. Környei Józsefnek, akik tanácsaikkal, módszertani ismereteikkel pótolhatatlan segítséget nyújtottak nemcsak a disszertáció elkészítésében, hanem az orvosi élettani gondolkodás megértésében és kialakításában is.

Végezetül szeretném megköszönni szüleimnek a segítségüket.

8. Irodalomjegyzék:

- Alvarez B, Martínez-A C, Burgering BM, Carrera AC.
Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals. *Nature*. 2001; 413(6857):744-7.
- Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS.
AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*. 1997; 277(5328):965-8.
- Ball KL.
p21: structure and functions associated with cyclin-CDK binding. *Prog Cell Cycle Res*. 1997; 3:125-34.
- Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, McCormick F, Feng J, Tsichlis P.
Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene*. 1998; 17(3):313-25.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME.
Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999; 96(6):857-68.
- Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME.
Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol*. 2001; 21(3):952-65.
- Buttram VC Jr, Reiter RC.
Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management. *Fertil Steril*. 1981; 36(4):433-45. Review.
- Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ.
Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*. 1997 ; 45(3):607-17.
- Cramer SF, Patel A.
The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol*. 1990; 94(4):435-8.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA.

Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995; 378(6559):785-9.

Crum CP.

The molecular biology of neuroendocrine cervical carcinoma: are we witnessing early or late events? *Gynecol Oncol*. 1999;72(1):1-2.

Cvoro A, Tzagarakis-Foster C, Tatomer D, Paruthiyil S, Fox MS, Leitman DC.

Distinct roles of unliganded and liganded estrogen receptors in transcriptional repression. *Mol Cell*. 2006; 21(4):555-64.

Deprez J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, Rider MH.

Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J Biol Chem*. 1997; 272(28):17269-75.

Dufourny B, van Teeffelen HA, Hamelers IH, Sussenbach JS, Steenbergh PH.

Stabilization of cyclin D1 mRNA via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *J Endocrinol*. 2000; 166(2):329-38.

Feng J, Park J, Cron P, Hess D, Hemmings BA.

Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 2004; 279(39):41189-96.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr.

Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*. 2000; 14(10):1649-60.

Frescas D, Valenti L, Accili D.

Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem*. 2005; 280(21):20589-95.

Gambone JC, Reiter RC.

Hysterectomy: improving the patient's decision-making process. *Clin Obstet Gynecol*. 1997; 40(4):868-77. Review.

Gaub, M.P., Bellard, M., Scheuer, I., Chambon, P., Sassone-Corsi, P.

Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fosjun

complex. *Cell*. 1990; 63, 1267–1276.

Geum D, Sun W, Paik SK, Lee CC, Kim K.

Estrogen-induced cyclin D1 and D3 gene expressions during mouse uterine cell proliferation in vivo: differential induction mechanism of cyclin D1 and D3. *Mol Reprod Dev*. 1997; 46(4):450-8.

Gilley J, Coffey PJ, Ham J.

FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol*. 2003; 162(4):613-22.

Giorgetti S, Ballotti R, Kowalski-Chauvel A, Cormont M, Van Obberghen E.

Insulin stimulates phosphatidylinositol-3-kinase activity in rat adipocytes. *Eur J Biochem*. 1992; 207(2):599-606.

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P.

Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 1986; 320(6058):134-9.

Gronemeyer H, Turcotte B, Quirin-Stricker C, Bocquel MT, Meyer ME, Krozowski Z, Jeltsch JM, Lerouge T, Garnier JM, Chambon P.

The chicken progesterone receptor: sequence, expression and functional analysis. *EMBO J*. 1987; 6(13):3985-94.

Gu Q, Moss RL.

17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. *J Neurosci*. 1996; 16(11):3620-9.

Gustin JA, Ozes ON, Akca H, Pincheira R, Mayo LD, Li Q, Guzman JR, Korgaonkar CK, Donner DB.

Cell type-specific expression of the I κ B kinases determines the significance of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling to NF- κ B activation. *J Biol Chem*. 2004; 279(3):1615-20.

Hall JM, McDonnell DP.

The estrogen receptor beta-isoform (ER β) of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*. 1999; 140(12):5566-78.

Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR.

Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res.* 2000; 87(8):677-82.

Hewitt SC, Harrell JC, Korach KS.

Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. *Annu Rev Physiol.* 2005; 67:285-308.

Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM.

Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* 1985; 318(6047):635-41.

Honda K, Sawada H, Kihara T, Urushitani M, Nakamizo T, Akaike A, Shimohama S.

Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res.* 2000; 60(3):321-7.

Huang H, Tindall DJ.

Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci.* 2007; 120(Pt 15):2479-87. Review.

Ishimatsu S, Itakura A, Okada M, Kotani T, Iwase A, Kajiyama H, Ino K, Kikkawa F.

Angiotensin II augmented migration and invasion of choriocarcinoma cells involves PI3K activation through the AT1 receptor. *Placenta.* 2006; 27(6-7):587-91.

Jiang BH, Liu LZ.

AKT signaling in regulating angiogenesis. *Curr Cancer Drug Targets.* 2008; 8(1):19-26.

Jones DR, Schmidt RJ, Pickard RT, Foxworthy PS, Eacho PI.

Estrogen receptor-mediated repression of human hepatic lipase gene transcription. *J Lipid Res.* 2002; 43(3):383-91.

Kazi AA, Koos RD.

Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Endocrinology.* 2007;148(5):2363-74.

Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE.

Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* 2000; 14, 142–146

Kaye AM, Sheratzky D, Lindner HR.

Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus; age dependence and estradiol stimulation. *Biochem. Biophys. Acta* 261 (1972) 475–480

Kops GJ, Medema RH, Glassford J, Essers MA, Dijkers PF, Coffe PJ, Lam EW, Burgering BM. Control of cell cycle exit and entry by protein kinase B-regulated forkhead transcription factors. *Mol Cell Biol.* 2002 A ; 22(7):2025-36.

Kops GJ., Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz K.W, Coffe PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 2002 B; 419, 316–321.

Kovács KA, Lengyel F, Környei JL, Vértés Z, Szabó I, Sümegi B, Vértés M. Differential expression of Akt/protein kinase B, Bcl-2 and Bax proteins in human leiomyoma and myometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 87(4-5):233-40

Koyama N, Kashimata M, Sakashita H, Sakagami H, Gresik EW. EGF-stimulated signaling by means of PI3K, PLCgamma1, and PKC isozymes regulates branching morphogenesis of the fetal mouse submandibular gland. *Dev Dyn.* 2003; 227(2):216-26.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(12):5925-30.

Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(3):1595-606.

Labied S, Kajihara T, Madureira PA, Fusi L, Jones MC, Higham JM, Varshochi R, Francis JM, Zoumpoulidou G, Essafi A, Fernandez de Mattos S, Lam EW, Brosens JJ. Progestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium. *Mol. Endocrinol.* 2006; 20, 35–44.

Lavery DN, McEwan IJ. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J.* 2005; 391(Pt 3):449-64.

Lee YH, Coonrod SA, Kraus WL, Jelinek MA, Stallcup MR.

Regulation of coactivator complex assembly and function by protein arginine methylation and demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(10):3611-6.

Lengyel F, Vértés Z, Kovács KA, Környei JL, Sumegi B, Vértés M.

Expression and activation of Akt/protein kinase B in sexually immature and mature rat uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 91(4-5):285-8.

Lengyel F, Vértés Z, Kovács KA, Környei JL, Sumegi B, Vértés M.

Effect of estrogen and inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase on Akt and FOXO1 in rat uterus. *Steroids*. 2007; 72(5):422-8.

Lew DJ, Dulic V, Reed SI.

Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell*. 1991; 66(6):1197-206.

Li L, Haynes MP, Bender JR.

Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(8):4807-12.

Liang J, Slingerland JM.

Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*. 2003; 2(4):339-45. Review.

Liu Y, Gao H, Marstrand TT, Ström A, Valen E, Sandelin A, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K.

The genome landscape of ER{alpha}- and ER{beta}-binding DNA regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(7):2604-9.

Liu Y, Shreder KR, Gai W, Corral S, Ferris DK, Rosenblum JS.

Wortmannin, a widely used phosphoinositide 3-kinase inhibitor, also potently inhibits mammalian polo-like kinase. *Chem Biol*. 2005; 12(1):99-107.

Martín-Romero C, Sánchez-Margalet V.

Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. *Cell Immunol*. 2001; 212(2):83-91.

Martinez-Gac L, Marques M, Garcia Z, Campanero MR, Carrera AC.

Control of cyclin G2 mRNA expression by forkhead transcription factors: novel mechanism for cell cycle control by phosphoinositide 3-kinase and forkhead. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(5):2181-9.

Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A.

Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(20):11285-90.

Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM.

AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 2000; 404:782-787.

Meyers R, Cantley LC.

Cloning and characterization of a wortmannin-sensitive human phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem*. 1997; 272(7):4384-90.

Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F.

Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J*. 1996; 15(6):1292-300.

Minshull J, Pines J, Golsteyn R, Standart N, Mackie S, Colman A, Blow J, Ruderman JV, Wu M, Hunt T.

The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. *J Cell Sci Suppl*. 1989; 12:77-97. Review.

Monroe DG, Secreto FJ, Subramaniam M, Getz BJ, Khosla S, Spelsberg TC.

Estrogen receptor alpha and beta heterodimers exert unique effects on estrogen- and tamoxifen-dependent gene expression in human U2OS osteosarcoma cells. *Mol Endocrinol*. 2005; 19(6):1555-68.

Morley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK, Schwartz JL.

A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology*. 1992; 131(3):1305-12.

Murakami Y, Otsuki M, Kusumoto K, Takeuchi S, Takahashi S.

Estrogen inhibits interleukin-18 mRNA expression in the mouse uterus. *J Reprod Dev*. 2005; 51(5):639-47.

Nakanishi S, Kakita S, Takahashi I, Kawahara K, Tsukuda E, Sano T, Yamada K, Yoshida M, Kase H and Matsuda Y.

Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem*. 1992; 267(4): 2157-2163.

Norris JD, Fan D, Stallcup MR, McDonnell DP.

Enhancement of estrogen receptor transcriptional activity by the coactivator GRIP-1 highlights the role of activation function 2 in determining estrogen receptor pharmacology J Biol Chem. 1998; 273(12):6679-88.

Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW.

Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. Science. 1995; 270(5240):1354-7.

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB.

NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. Nature. 1999; 401(6748):82-5.

Paech, K., P. Webb, G. G. J. M. Kuiper, S. Nilsson, J.-Å. Gustafsson, P. J. Kushner, and T. S. Scanlan Differential ligand activation of estrogen receptors ER and ER at AP1 sites. Science 1997; 277:1508-1510

Pasapera Limon AM, Herrera-Munoz J, Gutierrez-Sagal R, Ulloa-Aguirre A.

The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 binds the estrogen receptor and inhibits 17beta-estradiol-induced transcriptional activity of an estrogen sensitive reporter gene. Mol Cell Endocrinol. 2003; 200(1-2):199-202.

Rosenzweig KE, Youmell MB, Palayoor ST, Price BD.

Radiosensitization of human tumor cells by the phosphatidylinositol3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 correlates with inhibition of DNA-dependent protein kinase and prolonged G2-M delay. Clin Cancer Res. 1997; 3(7):1149-56.

Salvatori L, Pallante P, Ravenna L, Chinzari P, Frati L, Russo MA, Petrangeli E.

Oestrogens and selective oestrogen receptor (ER) modulators regulate EGF receptor gene expression through human

ER alpha and beta subtypes via an Sp1 site. Oncogene 2003; 22:4875-4881.

Schmidt M et al.

Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. Mol. Cell. Biol. 2002; 22, 7842-7852.

Schmoll D, Walker KS, Alessi DR, Grempler R, Burchell A, Guo S, Walther R, Unterman TG.

Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J Biol Chem.* 2000; 275(46):36324-33.

Schuur ER, Loktev AV, Sharma M, Sun Z, Roth RA, Weigel RJ.
Ligand-dependent interaction of estrogen receptor-alpha with members of the forkhead transcription factor family. *J Biol Chem.* 2001; 276(36):33554-60.

Selam B, Kayisli UA, Mulayim N, Arici A.
Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biol Reprod.* 2001; 65(4):979-85.

Shibata H, Spencer TE, Onate SA, Jenster G, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW.
Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res.* 1997; 52:141-64; discussion 164-5. Review.

Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK.
Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* 2000; 407(6803):538-41.

Smith CL, Onate SA, Tsai MJ, O'Malley BW.
CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(17):8884-8.

Song J, Rutherford T, Naftolin F, Brown S, Mor G.
Hormonal regulation of apoptosis and the Fas and Fas ligand system in human endometrial cells. *Mol Hum Reprod.* 2002; 8(5):447-55.

Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB.
Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(11):5998-6003.

Tran H., Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace Jr., AJ, DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME.
DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science.* 2002; 296, 530–534.

Tremblay GB, Tremblay A, Labrie F, Giguère V.

Dominant activity of activation function 1 (AF-1) and differential stoichiometric requirements for AF-1 and -2 in the estrogen receptor alpha-beta heterodimeric complex. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(3):1919-27.

Trencia A, Perfetti A, Cassese A, Vigliotta G, Miele C, Oriente F, Santopietro S, Giacco F, Condorelli G, Formisano P, Beguinot F.

Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(13):4511-21.

Troussard AA, Mawji NM, Ong C, Mui A, St -Arnaud R, Dedhar S.

Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *J Biol Chem.* 2003; 278(25):22374-8.

Vasudevan N, Kow LM, Pfaff D.

Integration of steroid hormone initiated membrane action to genomic function in the brain. *Steroids.* 2005 May-Jun;70(5-7):388-96.

Wakeling AE, Bowler J.

ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992; 43(1-3):173-7.

Weihua Z, Saji S, Makinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, Gustafsson JA.

Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(11):5936-41.

Weinberger C, Giguère V, Hollenberg SM, Thompson C, Arriza J, Evans RM.

Human steroid receptors and erb-A gene products form a superfamily of enhancer-binding proteins. *Clin Physiol Biochem.* 1987;5(3-4):179-89.

Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM.

The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature.* 1986; 324(6098):641-6.

Wu X, Pang ST, Sahlin L, Blanck A, Norstedt G, Flores-Morales A.

Gene expression profiling of the effects of castration and estrogen treatment in the rat uterus. *Biol Reprod.* 2003; 69(4):1308-17.

Yamaguchi H, Wang HG.

The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene*. 2001; 20(53):7779-86.

Yang H, Zhang Y, Zhao R, Wen YY, Fournier K, Wu HB, Yang HY, Diaz J, Laronga C, Lee MH.

Negative cell cycle regulator 14-3-3sigma stabilizes p27 Kip1 by inhibiting the activity of PKB/Akt. *Oncogene*. 2006; 25(33):4585-94.

Yao R, Cooper GM.

Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*. 1995; 267(5206):2003-6.

A témához kapcsolódó tudományos közlemények:

Folyóirat cikkek:

Lengyel F, Vertes Zs, Kovacs KA, Kornyei JL, Sumegi B, Vertes M.

Effect of estrogen and inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase on Akt and FOXO1 in rat uterus. **Steroids** 2007; 72(5):422-8. IF: 2,849

Kovacs KA, **Lengyel F**, Vertes Zs, Kornyei JL, Gocze PM, Sumegi B, Szabo I, Vertes M.

Phosphorylation of PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) protein is enhanced in human fibromyomatous uteri. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 2007;103(2):196-9. IF: 2,825

Lengyel F, Vertes Zs, Kovacs KA, Kornyei JL, Sumegi B, Vertes M.

Expression and activation of Akt/protein kinase B in sexually immature and mature rat uterus. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 2004;91(4-5):285-8. IF: 2,715

Vertes Zs, **Lengyel F**, Oszter A, Kornyei JL, Sumegi B, Vertes M.

Effect of estradiol on expression and activation of Akt protein in rat hypothalamus exposed to chronic [D-Met², Pro⁵]-enkephalinamide treatment. **Steroids** 2004;69(4):263-70. IF: 2,337

Kovacs KA, **Lengyel F**, Kornyei JL, Vertes Zs, Szabo I, Sumegi B, Vertes M.

Differential expression of Akt/protein kinase B, Bcl-2 and Bax proteins in human leiomyoma and myometrium. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 2003;87(4-5):233-40. IF: 2,596

Folyóiratban megjelent előadás kivonatok:

Lengyel F., Vértes Zs, Környei JL, Kovács KA, Sümegi B, Vértes M
Akt/protein kinase B and phosphatase PTEN in rat uterus. **Acta Physiologica Hungarica Vol 93 (2-3) p206, 2006**

Lengyel F., Vértes Zs, Környei J, Kovács AK, Sümegi B, Vértes M
The role of forkhead transcription factors in the mechanism of estrogen action. **Acta Physiologica Hungarica Vol 92 (3-4) p276, 2005**

Kovacs, KA., Lengyel F., Vértes Zs., Környei JL. Gócze, MP, Sümegi B, Szabó I.,
Vértes, M.
Some aspects of non-genomic estradiol action in human uterus during menstrual cycle and at menopause. **Climacteric 8: suppl.2 p110, 2005**

Előadások:

Lengyel Ferenc, Vértes Zsuzsanna, Kovács A. Kálmán, Környei L. József, Sümegi Balázs, Vértes Marietta
Ösztrogén receptor függő, két lépcsős FOXO1 inaktiváció patkány uterusban (poszter) **A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXXI. Vádorgyűlése, Pécs, 2007**

Lengyel Ferenc, Vértes Zsuzsanna, Kovács A. Kálmán, Környei L. József, Sümegi Balázs, Vértes Marietta
Akt/protein kináz B és PTEN foszfatáz patkány uterusban (poszter) **A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXX. Vádorgyűlése, Szeged, 2006**

Kovacs, KA., Lengyel F., Vértes Zs., Környei JL. Gócze, MP, Sümegi B, Vértes, M Szabó I.
Differential expression of Forkhead (FKHR) transcription factors in human endometrium and myometrium. **12th World Congress of Gynecological Endocrinology, Florence 2006 abstr.12**

Lengyel Ferenc, Környei József, Vértes Zsuzsanna, Kovács Kálmán A., Sümegi Balázs, Vértes Marietta

Forkhead transzkripciós proteinek szerepe az ösztradiol hatásmechanizmusában (poszter) **A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXIX. Vádorgyűlése, Budapest, 2005**

Kovács KA, **Lengyel F**, Vértes, Zs, Környei, JL, Gőcze, PM, Sumegi, B. Szabó I., Vértes M.

Some aspect of non-genomic action in human uterus during menstrual cycle and at menopause, **11th World Congress on the Menopause, Abstr.Book 0162 Buenos Aires, Argentina 2005, 18-22 October**

Ferenc Lengyel, Zsuzsanna Vértes, Kálmán A. Kovács, József L. Környei, Balázs Sumegi, Marietta Vértes

Akt/protein kinase B and phosphatase PTEN proteins in rat uterus (poszter) **12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal 2004, 31 Augustus - 4 September Abstr.: P456**

Kovács KA, **Lengyel F**, Környei JL, Vértes Zs, Sumegi B, Szabó I, Vértes M. Differential expression of PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosoma 10) proteins in human leiomyoma and myometrium. **12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal 2004, 31 Augustus - 4 September Abstr. p1175**

Vértes Zs., **Lengyel F.**, Környei J.L., Kovács K.A., Sümegi B., Vértes M.: PI3K/Akt and estradiol signaling in rat estrogen sensitive tissues. **12th International Congress of Endocrinology, 2004, Lisbon, Portugal, Abstracts: P1176**

Kovács KA., **Lengyel F.**, Környei JL, Gócze P., Szabó I.

PTEN expresszió változásának és szerepének vizsgálata human uterus myometriumban és myomában. **Magyar Szülészeti és Nőgyógyászati Endokrinológiai Társaság III. Kongresszusa, p- 48 Harkány 2004**

Kovács KA., **Lengyel F.**, Környei JL, Gócze P., Szabó I.

Receptor függő, nem genomikus ösztradiol hatás szerepe human uterus myoma pathogenezisében. **Magyar Nőorvos Társaság Dél-nyugat Magyarországi Szekciójának VI. Kongresszusa, p.17-18.,Siófok, 2004.**

Lengyel Ferenc, Környei József, Vértes Zsuzsanna, Kovács Kálmán A., Sümegi Balázs, Vértes Marietta

Akt/PI3K jelátvitel in vivo vizsgálata patkány uterusban. **A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXX. Vándorgyűlése, Pécs, 2003 (poszter)**

Kovács KA., Lengyel F., Környei, JL., Szabó I.

Akt/protein kináz B vizsgálata human uterus myometriumban és myomában. Magyar Nőorvos Társaság Dél-nyugat Magyarországi Szekciójának V. Kongresszusa, Zalakaros, 2003

Egyéb tudományos közlemények:

Környei J.L., Kovács K.A., Vértes Z., Gócze P.M., **Lengyel F.**, Vértes M.: Ópiát-progeszteron kölcsönhatás eltérések a humán myometrium simaizomsejtek proliferációjának szabályozásában. **A Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlése, 2007, Pécs**

Környei JL, Kovács KA, Vértes Zs, Gócze PM, **Lengyel F**, Vértes M

Altered opiate-progesterone interaction in the regulation of proliferation of human uterine leiomyoma cells. Acta Physiologica Hungarica Vol 93 (2-3) p196, 2006

Környei JL, Vértés Zs, **Lengyel F**, Kovács KA, Gócze PM, Vértés M
Opiate-progesterone interaction in the regulation of the proliferation of human
myometrial and endometrial cells. **Acta Physiologica Hungarica Vol 92 (3-4)**
p274, 2005

Környei J.L., Zelkó A., **Lengyel F.**, Vértés Z., Kovács K.A., Vértés M.: Ópioid
peptidek és progeszteron kölcsönhatása patkány uterus sejtek proliferációjának
szabályozásában. **A Magyar Élettani Társaság LXVIII. Vándorgyűlése, 2004,**
Debrecen

Környei J.L., Vértés Z., Kovács K.A., Gócze P.M., **Lengyel F.**, Vértés M.:
Ontogeny of opioid peptide action in rat uterine cells. **36th Annual Meeting of the**
Society for the Study of Reproduction, Cincinnati, Ohio, USA, Biology of
Reproduction 68: Suppl. 1.: p.217., 2003

Környei J.L., Vértés Z., Kovács K.A., Gócze P.M., **Lengyel F.**, Vértés M.:
Életkorfüggő opioid peptid hatás patkány uterus sejtekben. **A Magyar Élettani**
Társaság LXVII. Vándorgyűlése, 2003, Pécs