

**Zárójelentés – Szakmai beszámoló 2008****OTKA T-046695 (2004-2008)****Témavezető: Dr. Vértés Marietta****Membrán estrogen receptorok sejtszintű hatásainak vizsgálata humán uterus hormonális szabályozásában és daganatos elváltozások patomechanizmusában**

Az ösztradiol hatásmechanizmusát illetően, az elmúlt évtized során az érdeklődés fokozottan a nem genomikus úton megvalósuló hatások felé fordult, mert az adatok alapján úgy tűnt, hogy ezek a mechanizmusok nemcsak a gyorsválaszok kialakulásáért felelősek, hanem meghatározó szerepet játszanak szteroid hormonok genomikus és nem genomikus utjainak összekapcsolásában is. Elsősorban szív-keringési rendszeren végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy az ösztradiol (E2) membrán receptorokat aktiváló hatása és a lipid szenzitív kináz, Akt/PKB jelátviteli út között szoros a kölcsönhatás és jelentős szabályozó tényezője számos molekuláris eseménynek.

Akt /PKB (protein kináz B) cytoplazmában elhelyezkedő enzim, amit foszfatidilinozitol trifoszfát (PI3 K) kináz aktivál a serin<sup>473</sup> vagy a threonin<sup>308</sup> aminosav molekulák foszforilációjával. Az aktivált Akt jelentős szerepet játszik a sejtciklus és apoptózis szabályozásában. Az Akt sejtmagba történő transzportja után foszforilálja az ösztrogén receptort a Ser<sup>167</sup> pozícióban és ennek révén befolyásolja az E2 receptor transzkripció hatását. A PI3K-Akt aktivitását a PTEN szabályozza. A PTEN gén a protoonkogének családjába tartozik, celluláris terméke egy enzim, a PTEN foszfatáz, aminek hatására a PI3K/Akt jelátviteli út gátlás alá kerül. A gátlás mértéke a PTEN foszfatáz foszforilációjától függ, ugyanis az enzim csak defoszforilált állapotban aktív. Az Akt igen fontos substrátjai a proapoptotikus FKHR( FOXO1) transzkripció faktorok. Ezek a molekulák Akt hatására foszforilálódnak és a magból a cytoplasmába transzportálódnak, miközben proapoptotikus hatásuk gátlódik.

Az utóbbi években a PI3K/Akt jelátviteli út sok kutatás tárgyát képezte. Ezen vizsgálatok elsősorban különböző tulajdonságokkal rendelkező sejt kultúrákon történtek, és a főbb jelátviteli utak megismerését eredményezték. A PI3K/Akt jelátviteli út számos sejtben számos regulációs mechanizmusban vesz részt, sejtszaporodást, apoptosist, metabolikus változásokat, idegrendszeri hatásokat szabályoz. Relatív kevés adat ismert azonban a PI3K/Akt jelátviteli út szerepéről a reprodukciós rendszer működésében.

Jól ismert tény, hogy a multicelluláris szervezetekben kialakuló hatások, szabályozási mechanizmusok jóval összetettebbek. Különböző sejttípusok, és a közöttük kialakuló multifaktoriális kölcsönhatások vesznek részt az adott szerv homeosztázisának fenntartásában, vagy különböző patológiás elváltozások kialakulásában. A jelenleg rendelkezésünkre álló technikai, módszertani lehetőségek inkább a sejt kultúrák vizsgálatoknak kedveznek, noha egyre sürgetőbb igény jelentkezik olyan molekulák megismerésére, gyógyszerek kifejlesztésére, amelyekkel lehetőség nyílik a sejtelettani folyamatok élő szervezetben történő módosítására. Ha ezeknek a kihívásoknak eleget akarunk tenni, akkor meg kell ismernünk a működését a szabályozási mechanizmusoknak in vivo vagy ex-vivo szöveti szinten is.

Jelen munkánkban a fent leírtakat figyelembe véve PTEN-ER-PI3K-Akt-FOXO1 jelátviteli út jellegzetességeit vizsgáltuk in vivo patkány uterusban, valamint ex

vivo human uterusból származó szövetmintákban a menstruációs ciklus és menopauza alatt egészséges és patológiás elváltozások során.

Különös figyelmet fordítottunk a myomás uteruson végzett vizsgálatokra. Terveink szerint a PI3K/Akt jelátviteli út sajátosságait a fiziológiás változások feltérképezése mellett, daganatos humán uterus szövetekben is vizsgálni terveztük. Kéttípusú daganat vizsgálatát terveztük, a jóindulatú myoma és rosszindulatú corpus carcinoma. Az utóbbi szövetek vizsgálatát nem tudtuk megfelelően kivitelezni. Az ok, a megfelelő szövetminták hiánya volt, elsősorban a preoperatív Mintegy 16 corpus carcinomás mintát kaptunk diagnosztikus kürettékből, amelyek mennyisége nem volt elegendő több fehérje meghatározására, illetve kérdéses eredmények esetén ismétlésekre, a műtét után pedig a besugárzott szövet nem volt alkalmas a molekuláris vizsgálatokra. Az így kapott eredmények nem voltak elegendők a megfelelő konklúziók levonására, hypothesisek felállítására.

### **Módszerek**

A vizsgálatokat humán uterus szövetekben, patkány uterusban és hypothalamusban végeztük.

Humán uteruson végzett vizsgálatainkat hysterectómiás műtétekből származó myoma és homológ myometrium szöveten végeztük. Endometrium minták pedig vagy hysterectómiás uterusból, kürettből, vagy biopsziából származtak.

A betegek a műtét előtt legalább két hónapig hormonális kezelésben nem részesültek. A mintavétel napján, a műtéti beavatkozás előtt vett vérből az ösztradiol, progeszteron ill. FSH szinteket meghatároztuk. A betegek reproduktív ciklus stádiumait részben hormonértékek, részben a patológus által megállapított adatok alapján állapítottuk meg. Azokat a mintákat, amelyeknél a két adat (hormon szint, ill. patológusi vélemény) nem egyezett, azt kizártuk a vizsgálatokból. A vizsgálatok az érintett betegek hozzájárulásával és a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Humán Etikai Bizottsága engedélyével történtek.

### **Patkány szöveteken végzett vizsgálatok**

Humán szöveteken végzett vizsgálatok természetéből fakadó korlátok miatt, az eredmények értékelése, következtetések levonása szükségessé tette a megfelelő állatkísérleteket is. Vizsgálatainkhoz fejlődésben lévő és felnőtt nőstény Wistar patkányokat használtunk. A patkányokat standard körülmények között tartottuk. A felnőtt állatokat öt nappal a kísérletek előtt enyhe éter narkózisban ovariektomizáltuk. A kísérleteket a PTE Állatetikai Bizottságának engedélyével végeztük (Lengyel 1,2)

A vizsgálati anyagokat a megfelelő előkészítés (tisztítás, izolálás) után folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és szállítottuk az analíziseket végző laboratóriumba és ott -80°C-on tároltuk a felhasználásig.

### **Western blot**

A fehérjék expresszióját és aktivitását Western blot technikával határoztuk meg, a releváns közleményeinkben leírt módszer szerint, a meghatározásokhoz használt antitestek jellegzetességeit az I. táblázat mutatja

	gyártó	Katalógus szám	A felismerő epitóp*	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 <sup>473</sup> -Akt**	Sigma, St. Louis, MO, USA	P 4112	Az Akt 1 Ser <sup>473</sup> -on foszforilált formáját	ember, patkány, egér, marha
anti-pSer <sup>473</sup> -Akt***	Cell Signaling Technology Inc.,	9271	Az Akt Ser <sup>473</sup> -on foszforilált formáját	ember, patkány, egér, hörcsög, csirke
anti-pThr <sup>308</sup> -Akt	Sigma, St. Louis, MO, USA	P 3862	Az Akt 1 (és feltehetőleg az Akt 2) Ser <sup>473</sup> -on foszforilált formáját	ember, patkány, egér, marha, csirke
Anti-pThr <sup>24</sup> -FOXO1	Cell Signaling Technology Inc.,	9464	A FOXO1 Thr <sup>24</sup> -en foszforilált formáját	ember, patkány, egér
anti-pSer <sup>256</sup> -FOXO1	Cell Signaling Technology Inc.,	9461	A FOXO1 Ser <sup>256</sup> -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 $\alpha$	Santa Cruz Biotechnology	Sc7207	Az ER $\alpha$ 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

### Kvantitatív RT PCR

Az mintákból TRIzol reagenssel total RNS-t izoláltunk, ezzel reverz transzkripciót végeztünk. A kész cDNS tisztaságát hagyományos PCR segítségével ellenőriztük. A kvantitatív PCR-hoz SyBr Green Supermixet használtunk a termék leírásának megfelelően. Befejezés után melting curve analízist végeztünk. A kapott eredményeket a  $\Delta\Delta C_T$  Livak módszerrel értékeltük. A felhasznált primerek szekvenciáját az II. táblázat mutatja.

II. táblázat

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' AAGGGTGTAACGACGCTC 3'		
QT PCR-hoz	Beta aktin forward primer	5' AGCCATGTACGTAGCCATCC 3'		
	Beta aktin reverse primer	5' AGCGCGTAACCCTCATAGAT 3'		
	Ciklin D1 forward primer	5'TAGGGCTGGTAGCATGAGGT 3'		NM_171992
	Ciklin D1 reverse primer	5' CACGGTCCCTACTTCCAAAC 3'		

Részletes módszertani leírások az eredményeket közlő cikkekben megtalálhatók.

### **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.

## **Eredmények**

### **1. Akt/PKB expresszió és aktiváció jellegzetességek uterusban.**

Kovacs, KA et al. 2004, 2007, Lengyel, F et al. 2004, 2007

#### **Az Akt patkány uterusban PI3K függő módon foszforilálódik**

A vizsgálatokban PI3 kináz gátlásának hatását elemeztük az Akt foszforilációra E2 hatására vagy anélkül.

Intrauterin Wortmannin (5 µg/állat) hatására az a pAkt-Ser473 szint szignifikánsan csökkent a vehikulummal kezelt uterusához viszonyítva. E2 kezelés indukált pAkt szint emelkedés sem volt megfigyelhető, mutatván, hogy ovariektomizált patkányok uterusában az Akt PI3K függő úton foszforilálódik és a PI3K gátlás megakadályozza az E2 Akt aktiváció létrejöttét.

#### **Az Akt aktivitás E2, ER és PI3K függő patkány uterusban**

Az E2 dózisfüggő hatásának vizsgálatát 60 napos ovariektomizált patkányok uterusában vizsgáltuk 1, 10, 100 µg/tt.100g E2 i.p beadása után. Az Akt minden állatban expresszálódott, és szintjét az E2 kezelés nem befolyásolta. A pSer<sup>473</sup>-Akt szintje szignifikánsan fokozódott két órával az E2 injekciót követően. A hatás 10 és 100 ug E2 adásakor szignifikánsan nem különbözött egymástól, a hatás már 2 órával az E2 beadása után megfigyelhető volt és 24 órás érték még mindig emelkedést mutatott. 1ug/100g tt. E2 hatására szintén fokozódott a pAkt-Ser473 szint, de a hatás latenciája hosszabb volt, mint a nagyobb dózisok esetében.

''Tiszta'' antiösztrogen ICI 182,780 előkezelt állatokban az E2 nem fokozta a pAkt-Ser473 szintet az uterusban, önmagában alkalmazva pedig hatástalan volt.

Intrauterin Wortmannin (PI3K gátló) (5 µg/állat) hatására a pAkt-Ser473 szint szignifikánsan csökkent a vehikulummal kezelt uterusához viszonyítva. E2 kezelés indukált pAkt szintemelkedés sem volt megfigyelhető

#### **Az Akt fejlődő állatok uterusában is expresszálódik, és életkorfüggő érzékenységgel foszforilálódik**

Akt protein 7, 14, 21, 28 és 35 napos patkányok uterusában azonos mértékben expresszálódik, a foszforilációja (pSer473- és pThr308-Akt) azonban az életkor

előrehaladtával fokozódik. 11 napos korban az Akt foszforilációt az E2 kezelés (10µg/tt.100g i.p.) még nem befolyásolta, viszont a 28 és a 60 napos (ovariectomizált) állatok uterusában fokozta, a két utóbbi életkorban az Akt foszforiláció mértéke nem különbözött.

*Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy a PI3K/Akt jelátvitel uterusban igen aktív, funkcionáló ER rendszerrel együtt működik, már a korai postnatális életben megjelenik és az ösztradiol hatásmechanizmusának érésekor, a hüvely nyílás ideje körül éri el teljes funkcionális kapacitását. Azaz az ösztradiol hatásmechanizmusában a nemgenomikus úton megvalósuló PI3K/Akt jelátvitel a reprodukciós rendszer működésében feltételezhetően az egész életsorán működik.*

### **Ösztradiol receptor-alpha (ERalpha) expresszió fokozódik myoma szövetben**

ERalpha expressziója a menstruációs ciklus alatt mintegy megduplázódott a myomában a kontrol homolog myometriumokhoz képest. Menopauzában a nagyfokú különbség a két szövet között eltűnik, bár myomában még mindig magasabb értékek maradnak, de ez az eltérés, az adatok meglehetősen nagy szórása miatt statisztikailag nem volt szignifikáns. A myometrium mintákban ciklus függő különbségek nem voltak kimutathatók (Kovács 2004)

### **E2 befolyásolja az Akt expresszióját és foszforilációját a myometriumban és myomában**

Az Akt erősebben expresszáldott a myomákból származó mintákban, mint a myometriumokban. A ciklus során nem tapasztaltunk változást a fehérje mennyiségében, viszont a menopausa kezdeti szakaszában az Akt expressziója szignifikánsan csökkent mindkét típusú szövetben.

Az Akt aktivitása, a pSer<sup>473</sup>-Akt szintje, a párhuzamosan meghatározott ERalpha értékekhez hasonlóan alacsony volt valamennyi vizsgált myometrium szövetben. Ugyanez mondható el a menopauzás uterusból származó myomákról is, azonban a ciklus proliferációs és szekréciós fázisában a myomákban az Akt foszforiláció szignifikánsan fokozódott a többi szövetmintákban mért értékhez viszonyítva.

### **Az Akt fokozza az ERalpha foszforilációját és nucleáris lokalizációját**

Az ERalpha molekulában több foszforilációs hely figyelhető meg, a foszforilációért felelős kinázok specifikusak és a hatás szintén specifikus. Az ERalpha-Ser167 foszforilációért az Akt felelős, és hatására fokozódik a receptor affinitása a DNS-hez illetőleg a koaktivátorokhoz.

Myomában, az Akt és ER foszforiláció párhuzamosan változott a menstruációs ciklus alatt és menopauzában. Myometriumokban fosfoER kimutatható volt, de igen alacsony szinten. A pER elsősorban nucleáris lokalizációt mutatott

*Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az ERalpha szint valamint a menstruációs ciklus alatti magas szexuális steroid szintek lehetnek felelősek az Akt fokozott aktivitásáért, aminek hatására az ER foszforiláció mértéke jelentősen fokozódik,*

*s ennek következtében az elsősorban nuclearisan elhelyezkedő pER liganddal vagy ligand nélkül E2 hatást fejt ki és a magban egy sejtciklust serkentő hyperösztrogenizált környezetet alakít ki.*

## **2. Akt befolyásolja uterusban egyes sejtciklus és apoptózis szabályozásában szereplő molekulák expresszióját**

(Kovacs, KA et al. 2004, Lengyel F PhD értekezés 2008)

### **Patkány uterusban a Ciklin D1 expressziója változik E2 és a Wortmannin kezelés hatására**

Ösztradiollal és Wortmanninnal kezeltünk ovariectomizált patkányokat, majd az uterusokból RNS-t izoláltunk, és kvantitatív RT PCR-ral megnéztük, hogy hogyan alakult a Ciklin D1 mRNS-ének szintje.

E2 kezelés után hat órával mintegy 80%-kal megemelkedett a Ciklin D1 mRNS-ének mennyisége, majd 12 órával az E2 injekció után visszatért a kontroll értékre. Az E2 cyclin D1 expressziót fokozó hatását Wortmannin teljesen legátolta, sőt, a Ciklin D1 mRNS szintje mind a Wortmannin, mind pedig az E2+Wortmannin kezelt állatokban a kontroll érték alá csökkent.

### **Az Cyclin D1, az antiapoptotikus Bcl-2 és a proapoptotikus hatású Bax fehérje szintje különbözik myomában a menstruációs ciklus alatt és menopauzában**

Elsősorban sejt kultúrákból nyert irodalmi adatok arra utalnak, hogy az Akt aktivitás fokozódásának hatására a sejtciklus fokozódik és az apoptosis mértéke, csökken. A jelentős mértékű Akt aktivitás fokozódás a myomás szövetekben

Felvetette a sejtciklus fokozódásért felelős Cyclin D1, az antiapoptotikus Bcl-2, és a proapoptotikus Bax protein szintek vizsgálatának a szükségességét párhuzamosan az Akt foszforilációjával. Eredményeink szerint a Cyclin D1 és a Bcl-2 expressziója a menstruációs ciklus alatt a pAkt szinthez hasonlóan, jelentősen, a kontroll myometrium szövetekben mért értékek többszörösére fokozódott. A menopauzás uterusokban pedig a myometriális szintre csökkent. A Bax protein a pAkt értékekhez hasonlóan ellentétesen változott, a menstruációs ciklus alatt alacsony volt, míg menopauzás myomában mintegy háromszorosára fokozódott.

*Feltételezzük hogy a myomában megfigyelhető, feltehetően E2/ERalpha indukált Akt aktivitás a cyclin D1 és Bcl-2 expresszió fokozódásán keresztül a sejt képződés/apoptozis egyensúlyt a sejt túlélés irányába billenti, és a daganat növekszik. Menopauzában az E2/ERalpha szintek csökkenése és ennek következtében kialakuló Akt foszforiláció csökkenés a proapoptotikus hatásoknak kedvez, amire utalhat a BAX protein expresszió fokozódás is, és ez a mechanizmus szerepet játszhat a myoma regressiójában.*

### **Endometriumban az Akt aktivitás a ciklus alatt az ER szinttel párhuzamosan változik.** (Wilhelm, F et al. 2006, 2007, 2008)

ER alpha és pAkt-Ser473 a proliferációs fázisban volt a legmagasabb, majd 25% ill. 40% csökkenést mutattak a szekréciós fázisban. A foszforilált ER (pER-Ser167) szint is igen jelentős volt, különösen a proliferáció alatt, szekréciós fázisban pedig igen jelentősen, 70%-al lecsökkent, feltehetően a progeszteron antösztrogen hatására.

### **Postmenopauzában az E2 nongenomikus hatása a vér E2 szintjétől függő**

Postmenopauzában az ösztrogén hatása folytatódhat, mert az ovariális ill. mellékvesében képződött sexual steroidok konvertálódnak biológiailag kevésbé aktív ösztrogénné. A hormonális háttér változásai zavart okozhatnak a postmenopauzális endometrium homeosztázisában, aminek eredményeként az endometriumon különböző elváltozásokat okozhatnak. A megváltozott hormonális milió okozta zavarok vizsgálata és megismerése úgy a prevenció mint a kezelések fontos elemei lehetnének. Az E2 hatás vizsgálatában a nongenomikus hatás ismerete postmenopauzás endometrium vonatkozásában még hiányos.

Vizsgálatainkban elsősorban a vér E2 szint és a ERalpha/PI3K/Akt jelátvitelt elemeztük, mint az egyik központi szignált az E2 nemgenomikus hatásaiban.

A betegek életkora 58-75 év között volt, a vér E2 szint 8-230 pMol/L értékek között változott.

Az ERalpha expresszió menopauzában alacsonyabb volt mint a ciklus alatti proliferációs fázisban és jelentősen ingadozott függetlenül az általunk vizsgált paraméterek mindegyikétől (serum E2 szint, életkor, BMI index). Az ER(Ser167) és Akt foszforilációja magasabb vér E2 szintnél (>50pmol/L) fokozódott. A pAkt pozitívan korrelált se E2 koncentrációval (r: 0.811, p<0.001) és pERalpha értékekkel (r: 0.879, p<0.001).

Szerény számú HRT kezelésben részesülő betegeknél (n:20) vizsgáltuk a kezelés hatásait. Azoknál a betegeknél, akik E2 (n: 5) vagy E2+progeszteront (n:9) kaptak, a pAkt szint jelentősen fokozódott, kisebb mértékű, de statisztikailag nem szignifikáns mértékben a pERalpha szint is emelkedett. 6 beteg tibolon kezelésben részesült, náluk a vizsgált paraméterek nem változtak.

*Az eredmények arra utalnak, hogy a postmenopausális endometrium érzékeny akár az endogén, akár exogén sex steroidokra. A válaszban nongenomikus válaszok is kialakulhatnak és a változások következményeként sejtproliferáció vagy apoptózis zavarok léphetnek fel. Steroid kezelések alkalmazásánál meggondolandó lenne az említett paraméterek preventív céllal történő vizsgálata.*

### 3. PTEN aktivitás vizsgálata uterusban

(Kovács, KA et al. 2006, 2007, Lengyel, F et al. 2004, 2006, Vértes M et al 2007)

A PTEN gén a protoonkogének családjába tartozik, celluláris terméke egy enzim, a PTEN foszfatáz, aminek hatására a PI3K/Akt jelátviteli út gátlás alá kerül. A gátlás mértéke a PTEN foszfatáz foszforilációjától függ, ugyanis az enzim csak defoszforilált állapotban aktív. Számos daganat pathomechanizmusában a PTEN proteinek szerepet játszanak, PTEN expresszió zavara, vagy posztranszlációs módosulása, foszforilációja az adott sejtpopulációban a sejt survival mechanizmusok dominanciáját okozhatja. A PTEN szerepét a PI3K/Akt útvonal szabályozásában myomában nem vizsgálták.

#### **PTEN protein foszforilációja fokozott humán myomás uterusban.**

Total PTEN protein expresszió nem különbözött myoma vs myometriumból származó mintákban. Ugyancsak nem volt különbség a menstruációs ciklus fázisaiból és menopauzás uterusokból származó szövetekben. Ezzel ellentétben a PTEN foszforilált módosulata, pPTEN-Ser380, a pAkt változásokkal megegyező módon a menstruációs ciklus alatt szignifikánsan fokozódott a myomás szövetekben a myometriumokkal összehasonlítva. A myometriumban ciklus fázisoktól függő és pAkt-tól független változásokat találtunk, a proliferációs fázisban a pPTEN szint szignifikánsan magasabb volt mint a szekréciós fázisban.

#### **PTEN protein expressziója és foszforilációja különbözik a myomás és nem myomás uterusból származó myometriumban**

Feltételeztük, hogy a PTEN foszforiláció a myomás uterusból származó myometriumban más mechanizmussal történik, mint a myomában. Kérdésként vetődött fel, hogy ez a különbség szerepet játszhat-e a myoma kialakulásában? Kérdésünkre választ remélve megvizsgáltuk és összehasonlítottuk a pAkt/pPTEN változásokat nem myomás és myomás myometriumban.

Az Akt és PTEN proteinek expressziója minden vizsgált szövetben kimutatható volt. A két típusú myometriumban megfigyelhető változások szinte egymás tükörképét adták. Az aktív PTEN mennyisége a nem daganatos uterus myometriumban a ciklussal változik, proliferációs fázisban igen magas, nincs ilyen változás a daganatos uterus myometriumban. Az aktív Akt mennyisége a nem daganatos uterus myometriumban a szekréciós fázisban fokozódik, és nem változik a daganatos myometriumban.

A változások arra utalnak, hogy az Akt és a PTEN protein aktivitása nem daganatos myometrium szövetben a vér sexual steroid szintjétől függ, a myomás uterus myometriumban pedig a hormon szintektől független.

*Eredményeink felvetik, hogy a myomás uterus myometriumban az ER/Akt/PTEN jelátviteli rendszer hormon érzékenysége megváltozik, az így megváltozott myometriális sejt környezetben, különböző, még nem ismert noxák hatására, megváltozik a sejt képződés/sejthalál egyensúlya és myomás göbök alakulhatnak ki.*



### **PTEN protein expresszálódik és foszforilálódik patkány uterusban.**

PTEN expresszió fejlődő (7 – 35 napos) és ivarérett, ovariektomizált állatok uterusában kimutatható. Ellentétben az Akt expressziójával, a PTEN expressziója a kor előrehaladtával csökkent. A két fehérje foszforilációja az életkor előrehaladtával ugyanúgy változott, mint az expressziójuk. Ösztadiol kezelés a PTEN foszforilációját nem befolyásolta egyik korcsoportban sem.

*Eredményeink azt mutatják, hogy patkány uterusban – bár az egyedfejlődés során az Akt és a PTEN expressziója fordítottan változik – a PTEN nem játszik jelentős szerepet az ösztadiol által kiváltott Akt foszforiláció fokozódásában.*

### **4. FOXO1 protein expressziója és aktivitása human uterusban**

**Kovács, KA et al. 2005,2006,2007, 2008. Lengyel F et al 2007, 2008**

*A közelmúltban megjelent adatok arra utalnak, hogy a sejtépződés és az apoptózis szabályozásában a proapoptotikus, sejtciklust gátló és apoptózist serkentő FOXO, korábban Forkhead (FKHR) transzkripciós faktorok családja igen jelentős szerepet játszik. FOXO transzkripciós faktorok az ösztadiol (E2) nem-genomikus hatásában meghatározó szerepet játszó Akt/PKB cél (target) molekulái. Az aktivált Akt/PKB foszforilálja a FOXO proteineket, azok inaktíválódnak és a magból a citoplazmába szállítódnak. A FOXO proteinek szerepe humán uterusban eddig nem ismert.*

### **A FOXO1 expresszálódik, és E2 hatására PI3K függő úton foszforilálódik patkány uterusban**

FOXO1 proteineknek in vivo két Akt érzékeny a foszforilációs lehetősége van, a Thr<sup>24</sup> és Ser<sup>256</sup>. Mindkettő változásait Western blottal vizsgáltuk PI3K gátlás ill. E2 kezelés után.

A pSer<sup>256</sup>-FOXO1 szintje alacsony volt a vehiculummal kezelt állatokban. Kettő és hat órával az 10ug/100 g tt. E2 injekció után szignifikáns emelkedést mutatott majd 12 órával az E2 injekció után a kontroll értékre csökkent. A FOXO1 24-es treonil csoportjának foszforilációja nem emelkedett két órás E2 kezelés hatására, viszont 12 és 24 órával az E2 kezelés után fokozódott. Wortmannin kezelés szinte teljesen legátolta a 24-es treonil foszforilációját, míg a 256-os szeril csoportét csak mintegy 50%-ban.

### **A FOXO1 két foszforilált formájának intracelluláris eloszlása különbözik egymástól**

A következőkben intraperitoneális E2 és/vagy intrauterin Wortmannin kezeléssel átesett állatok uterusából izoláltunk sejtmagban gazdag és citoplazmában gazdag frakciókat. A csak E2-lal kezelt uterusban a sejtmag frakcióban erős jelet kaptunk a pSer<sup>256</sup>-FOXO1 ellenes antitesttel. Az E2-lal és Wortmanninnal is, valamint a csak Wortmanninnal kezelt uterusokban csak gyenge jelet kaptunk. A DMSO (a Wortmannin oldószere) nem befolyásolta a jel erősségét. A citoplazma frakcióban valamennyi alkalmazott kezelés hatására nagyon alacsony pSer<sup>256</sup>-FOXO1 szintet detektáltunk. A pThr<sup>24</sup>-FOXO1 csak a citoplazmában gazdag frakcióban volt jelen.

### **A FOXO1 protein expressziója fokozott a myomában és függ a reprodukív ciklus fázisaitól.**

A FOXO1 protein expressziója és foszforilációja különbözött myoma és a homolog myometrium között, és függött a menstruációs ciklus fázisaitól ill. menopauzától. A szekréciós és proliferációs fázisokban myomában a FOXO1 szint magasabb mint a myometriumban, menopauzában ez a különbség eltűnik. Hasonló, de jóval erősebb, statisztikailag szignifikáns változás figyelhető meg a foszforilált (pSer256)FOXO1 szintekben. A myomákban a proliferációs és szekréciós fázisban kapott értékeknek csak ~32% és ~54% volt mérhető homolog myometriumok megfelelő fázisaiban. Menopauzás uterusból származó szövetekben a myometriumban magasabb volt a pFOXO szint mint myomában.

### **A foszforilált FOXO1 proteinek subcelluláris megoszlása szövetspecifitást és reprodukív ciklustól történő függést mutatott myomában és myometriumban**

A pFOXO-Ser256 megoszlása a mag és cytoplasma között más volt myomában mint a kontrol myometriumokban. Myomában a ciklus alatt a magban volt kimutatható, a mag:cytoplasma arány a proliferációs fázisban 2,2, a szekréciós fázisban 2,4 és menopauzában 0,61 volt. A cytoplasmáris pFOXO szint myometriumban volt magasabb mint a megfelelő myoma szövetekben, menopauzában közel az egész pFOXO1 a cytoplasmában lokalizálódott. A pFOXO1 mag:cytoplasma aránya a myometriumban 0,59, 1,09 és 0,02 volt a proliferációs, szekréciós és menopauzás mintákban. A pSer<sup>256</sup>-FOXO1 and of pSer<sup>473</sup>-Akt változások a myomás mintákban egymással jól megegyező tendenciája mutatható ki a menstruációs ciklus stádiumaiból származó mintákban. Érdekesnek tartjuk megjegyezni, hogy nucleáris pFOXO1 mindkét szövetben a szekréciós fázisban magasabb volt mint a proliferatívban, ugyanakkor ezzel a változással megegyező Akt foszforiláció a myometriumban nem volt kimutatható.

*Feltételezhető, hogy a myomás myometriumban a FOXO1 foszforiláció Akt független folyamat, amit a szekréciós fázisban a progeszteron indukál és szükséges a myometriumban az uterusban ebben a fázisban létrejövő decidualizációs változásokhoz .*

### **14-3-3 $\gamma$ protein expresszió erősen csökkent myomában a menstruációs ciklus alatt**

A foszforilált FOXO1 protein nucleáris exklúziója fontos eleme a FOXO1 hatás szabályozásának. A nucleo-cytoplasmikus transport mechanizmusában speciális elemek, nucleáris pórusok vesznek részt és működésük szabályozásában különböző "kis" proteinek játszanak szerepet. Ezen regulációs molekulák között található a Crm-1 and 14-3-3 protein családot. A nucleáris pórusok és a az őket szabályzó molekulák működésében bekövetkező változások, az irodalmi adatok szerint több különböző daganat kialakulásában oki tényezőként szerepelhetnek.

A pFOXO1 fokozott nucleáris lokalizációja myomában felvette azt a lehetőséget, hogy ezen változásban a nucleo-cytoplasmikus transport szabályzó molekulák működésének zavara is szerepet játszhat. Ezen hypothézisünk helyességét vizsgálva, előkísérletként analizáltuk a 14-3-3 protein expresszióját.

14-3-3  $\gamma$  protein myomában a menstruációs ciklus alatt nagyon alacsony volt, és ez az érték 7-8-szorosára fokozódott a menopauzás uterusból származó myoma-mintákban. Myometriumban a 14-3-3 protein expresszió jelentősen magasabb volt elsősorban a szekréción fázisban, majd ez az érték 40%-al csökkent menopauzában.

*A FOXO1 proteinek hatásainak szabályozása szövetspecificitást mutat, reprodukzív ciklustól függ, és fontos szerepe van az E2 sejtproliferációra gyakorolt hatásában, illetve bizonyos patológiás eltérések kialakulásában.*

*A fenti adatokat összefoglalva megállapíthatjuk, hogy myomában a FOXO1 protein apoptozist serkentő és sejtciklust gátló hatása meghibásodott, gátolt. A gátlásért több mechanizmus lehet felelős, pl. az Akt indukált fokozott és folyamatos foszforiláció, gátolt nucleocytoplasmikus transport, a fokozott pERalpha által kiváltott E2 aktivitás a magban stb. A változások következtében a myomás sejtekben sejttúlélést biztosító (prosurvival) programok előtérbe kerülnek és daganatok növekedését serkenthetik. Ezen zavarok korrekciójára vagy prevenciójára alkalmas molekulák terápiás lehetőségeket rejthetnek magukban.*

### **3. D-Met2-Pro5 enkephalinamide kezelés hatása PI3K/Akt jelátviteli útra patkány hypothalamusban és uterusban**

(Vértés Zs et al, 2004, Környei et al 2005)

Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy D-Met2-Pro5-enkephalinamide (ENK) kezelés tónusosan gátolja az E2 sejtproliferációs hatását.

**Jelen vizsgálatainkban** ENK hatását elemeztük az E2 indukált PI3K/Akt aktivitásra. Ovariektomizált patkányoknak ENK tartalmú ozmotikus minipumpát implantáltunk s.c. A minipumpák 5 ug/h ENK-t vagy naloxont (NAL) jutattak az állatok szervezetébe egyenletesen 72 órán keresztül. A kontrolloknak vehiculumot tartalmazó minipumpákat implantáltunk. A kísérlet vége előtt 2 órával a patkányok i.p. 10ug/100 g tt. E2 kezelésben részesültek

**ENK kezelés gátolta az E2 indukált Akt foszforilációt a hypothalamusban és uterusban**

Akt expresszió a hypothalamusban és uterusban egyaránt kimutatható, expressziójának mértéke nem változott sem a kezelt, sem a kontrol csoportokban. Kontroll állatokban E2 hatására a foszfo-Akt (Ser473) szint a hypothalamusban 52%-al, míg az uterusban 61% fokozódott. 24 órával ENK implantálás után a hypothalamusban az E2 indukált pAkt szintfokozódás nem volt megfigyelhető, de ha az ENK mellett az állatoknak antagonistá naloXont is implantáltunk, akkor a pAkt E2 érzékenysége visszatért. Uterusban hasonló tendenciójú változásokat kaptunk, azzal a különbséggel, hogy az ENK gátló hatása az E2 pAkt stimulációra, hosszabb latencia idő után, 48 órával az implantáció után volt kimutatható.

### **ENK kezelés az ERalpha, ERbeta expressziót és E2 kötődését is befolyásolja**

Hypothalamusban ENK implantáció után 48 órával az ERalpha expressziója csökkent, míg az ERbeta expresszió ellentétesen változott, mint a 24 és 48 órás implantált patkányokban emelkedett, 72 órával kezelés után tért vissza a kiindulási szintre. Az H3E2 kötődésben 48 órás implantáltaknál a nucleáris nagy kapacitású, kis affinitású receptorok száma szignifikánsan csökkent. Uterusban az ERalpha a hypothalamusban tapasztalt változásokkal azonos módon változott, az ERbeta pedig nem reagált a kezelésekre.

### **E2/PI3K/Akt jelátvitel élettani szerepe uterusban**

(Vértes, Zs 2005, 2008, Wilhelm et al. 2007, Lányi et al. 2008.)

Az alábbi kezdeti vizsgálatokban az Akt aktiváció lehetséges élettani szerepét megismerését tűztük ki célul. Az elmúlt évek során az Akt sokrétű szabályozó szerepéről rendkívül sok adat jelent meg, ezek az irodalmi adatok saját eredményeinkkel együtt újabb lehetőségekre hívták fel a figyelmünket, amelyekkel az adataink biológiai, endokrinológiai szerepeit, gyakorlati felhasználásait tovább bővíthetjük az elkövetkezendő években.

**Termodinamikai változások vizsgálata.** Ezekben a vizsgálatokban a myometrium termodinamikai változásainak paramétereit elemeztük. Kezdeti adataink szerint Akt aktivitás változásai terhességi időfüggést mutatnak humán és patkány myometriumban egyaránt. Humán uterus myometriumban termodinamikai mutatói különböztek a menstruációs ciklus ill. menopauzálás és terhes uterusban. Patkány uterusban az izomzat kontraktilis elemeinek postnatális fejlődésével párhuzamosan a termal stabilitás fokozódik.

Ezek a változások felvetik, hogy az izomzat mechanikai változásai összefügghetnek és szerepet játszhatnak a myometrium kontraktilitásának szabályozásában és a kontraktilitás zavaraiiban (pl. fenyegető abortus, atónia uteri).

**Anyagszerevezavarok és uterinális PI3K/Akt jelátvitel kapcsolata.** A PI3K/Akt jelátvitel fontos szerepet játszik a szervezet energiafolyamatainak a szabályozásában. A ghrelin fokozza a hypophysis GH szekréciót, gátolja az inzulin hatást. Csatlakoztunk egy vizsgálatossorozathoz (PTE, AOK, Gyerekklinika), amelyben a terhesség során az anyai és főtális vérben elemeztük a ghrelin változásait párhuzamosan több (inzulin, GH,

cortisol, leptin) hormonális rendszer változásaival (Lányi et al.2008). Ezeket a vizsgálatokat tervezzük kiterjeszteni az Akt jelátvitel analízisekre is. Arra kérdésre keressük a választ, hogy egyes anyagcserezavarok és a reprodukciós rendszer megbetegedései között van-e kapcsolat.

#### A kutatás témájában eddig megjelent közlemények összegzése

Folyóiratcikk	külföldi, idegen nyelvű folyóiratban	8 db	IF = 19,41
Absztrakt	külföldi, idegen nyelvű folyóiratban	3 db	IF = 3,75
Absztrakt	hazai kiadású, idegen nyelvű folyóiratban	5 db	
Konferencia kiadvány,	angol nyelvű	10 db	
	magyar nyelvű	1 db	
		Össz.: 27 db	

Dr. Lengyel Ferenc 2008-ban sikeresen megvédte “Az uterusban folyó sejtképződés szabályozásában szerepet játszó tényezők hatásmechanizmusa” c. PhD értekezését.

#### Megjegyzések.

- Személyi változások igen jelentősek és zavaróak voltak. A technikai segéd személyzetből 2004-ben két munkatársat nyugdíjaztak. Helyettük kaptunk egy asszisztent, 3-4 hónapig tartott a betanítása.
- 2008-ban egy állatkísérletben igen jártas szakasszisztensünket nyugdíjaztak. Helyette nem vehettünk fel senkit.
- Oktatási terheink igen jelentősen fokozódtak, ami a diplomásokra rótt igen nagy terhet.

Anyagi elvonások a projekt kezdetén megnehezítették a kezdést, de 2006-ben nyertünk egy ETT támogatást, 2 500 Eft-ot, ami az OTKA támogatással együtt alapszinten tudta fedezni a költségeket. Új módszerek bevezetésére nem volt módunk a rendelkezésünkre álló anyagiak miatt.

2008 augusztusában kértünk és kaptunk az OTKA-tól költség átcsoportosítási engedélyt, aminek segítségével a legtöbbet használt régi blottoló készülékünket lecserélhettük és felújíthattuk munkacsoportunk számítógépes háttérét. Az engedélyt ezen az úton is szeretném megköszönni.