

Az ösztrogén jelátvitel jelentősége a neutrofil granulociták szabályozásában és emlőrák sejtvonalon

Doktori értekezés

Dr. Marczell István

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Békési Gábor PhD, ny. főorvos

Hivatalos bírálók: Dr. Hosszúfalusi Nóra PhD, főorvos
Dr. Hubina Erika PhD, főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Blázovics Anna DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vajdovich Péter PhD, tanszékvezető egyetemi docens
Dr. Kukor Zoltán PhD, egyetemi adjunktus

Budapest

2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezető	5
1.1 A szteroidok.....	5
1.1.1. Szerkezet és osztályozás	5
1.1.2. A szteroidok jelátviteli útvonalai.....	6
1.2 Az ösztrogén jelátvitele	10
1.2.1. Ösztrogén magreceptorok felépítése és működése	11
1.2.2. A membrán ösztrogén receptorok.....	13
1.3. Az ösztrogén szerepe a különböző vizsgálati modellekben	19
1.3.1. Emlőráksejtek	19
1.3.2. Neutrofil granulociták.....	24
2. Célkitűzések	28
3. Módszerek	29
3.1. Az MCF7 sejtekkel végzett vizsgálatok során alkalmazott módszerek	29
3.1.2 Sejttenyésztés	29
3.1.3. Kezelések.....	29
3.1.4. Expressziós vizsgálatok:.....	30
3.1.5. Képkötő vizsgálatok	32
3.2. A neutrofil granulociták vizsgálata során alkalmazott módszerek.....	33
3.2.1. Sejtszeparáció	33
3.2.2. Protein foszforiláció és útvonal analízis.....	34
3.2.3. Az fMLP stimuláció hatására jelentkező szuperoxid produkció mérése.....	36
4. Eredmények	37
4.1. Az MCF7 sejtvonalon végzett vizsgálatok eredményei	37
4.1.1. A microarray adatok meta-analízise	37

4.2.2. A génexpressziós változások validálása ösztrogén, ösztrogén-BSA és G1 kezelések után rtPCR-ral	37
4.2.3. Képképző vizsgálatok	40
4.2. A neutrofilekkel végzett vizsgálatok eredményei	43
4.2.1. A protein foszforilációs vizsgálatok eredményei	43
4.2.2. Szuperoxid produkció és a különböző kináz inhibitorok hatása	46
5. Megbeszélés.....	47
5.1. Az emlőráksejtekkel végzett vizsgálat megbeszélése	47
5.2. A neutrofilekkel végzett vizsgálatok eredményeinek megbeszélése.....	53
6. Következtetések.....	57
7. Összefoglalás	58
8. Summary.....	59
Irodalomjegyzék	60
Saját publikációk jegyzéke	72
Köszönetnyilvánítás	74

Rövidítések jegyzéke

ATCC - American Type Culture Collection*

BSA – szarvasmarhaszérum-albumin

cAMP – ciklikus adenzin monofoszfát

CCND1- ciklin D1gén

CHO – kínai hörcsög ovárium sejtvonal

KCNK5 – Kálium-csatorna K alcsalád, 5-ös tag gén

CTGF – kötőszöveti eredetű növekedési faktor

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DBD – DNS kötő domén

DHHC 7/21 – palmitoil aciltranszferázok

DMSO - dimetil szulfoxid

E2-BSA – ösztrogén-szarvasmarhaszérum-albumin komplex

EDTA – etilén diamin tetra-acetát

EGF(R) – extracelluláris növekedési faktor (receptor)

ER – ösztrogén receptor

ERBB2/HER2 - erb-b2 receptor tirozin kináz 2

ERK – extracelluláris receptor tirozin kináz

ER α/β – ösztrogén receptor α/β

fMLP – N-formil metionil-leucil-fenilalanin, egy kemotaktikus bakteriális peptid

G1 – GPER agonista

G15 – GPER recertor antagonist

GABA – gamma-amino-vajsav

GAPDH - gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz

GCRMA - Guanine Cytosine Robust Multi-Array Analysis

GEO – Gene Expression Omnibus

GPER (GPR30) – G-protein kapcsolt ösztrogén receptor

GTP – guanozin trifoszfát

HB-EGF – heparin kötő EGF

HRE – hormon reszponzív element

HRP – tormaperoxidáz

IGFR – inzulinszerű növekedési faktor receptor
IPA – Ingenuity Pathway Analyser
KDM4B – lizin-specifikus demetiláz 4B
LBD – ligand kötő domén
LDL – alacsony denzitású lipoprotein
MAP kináz – mitogén aktivált protein kináz
MCF7 – „Michigan Cancer Foundation-7” emlőrák sejtvonal
mER – membrán asszociált klasszikus ösztrogén receptor
MMP – mátrix metalloproteáz
MPO – myeloperoxidáz enzim
MYC- myc transzkripció faktor
NADPH oxidáz - nikotinamid adenin dinukleotid foszfát oxidáz
NLS – nukleáris lokalizációs szignál
NO – nitrogén monoxid
OD – optikai denzitás
PFA – paraformaldehid
PI3K – foszfatidilinozitol 3-kináz
qRT-PCR kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakció
RAC – Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Ras – „rat sarcoma”
ROS – reaktív oxigén gyök
RPL13A – riboszómális protein L13a
RPMI – „Roswell Park Memorial Institute” médium
SERM – szelektív ösztrogén receptor modulátor
SPF - specific pathogen free, kórokozóktól mentes
STRING - Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins**
SOS - Son of Sevenless homológ
TIA- tranziens iszkémiás attack
WASP - Wiskott–Aldrich syndrome (WAS) family of proteins

* Egy privát, non-profit szervezet, mely referencia mikroorganizmusok, sejtvonalak és egyéb anyagok beszerzését, hitelesítését, termelését, megőrzését, fejlesztését és forgalmazását felügyeli.

** Egy gén és protein interakciók analizésére szolgáló szoftver

1. Bevezető

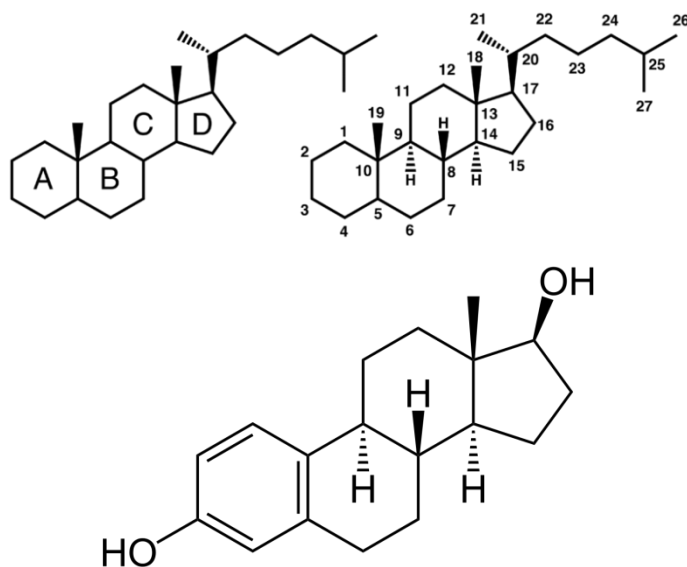
1.1 A szteroidok

1.1.1. Szerkezet és osztályozás

A szteroid vegyületeket alkotó ciklopentano-fenantrén, másnéven szteránváz vagy gonánváz egy 17 szénatomból álló szerves molekula, melyet három hattagú és egy öttagú gyűrű alkot. (1. ábra) A szteránvázat alkotó szénatomok számtalan konformációs és szubsztitúciós lehetősége teremti meg azt a szerkezeti változatosságot, ami miatt e vegyületek különösen alkalmasak jelátviteli folyamatok során. Bár a szteránváz vegyületek szintézise elsősorban az eukariótákra jellemző, vannak arra bizonyítékok, hogy már egyes, 3,8 milliárd évvel ezelőtti élt mikroorganizmusok is termeltek szteroid vegyületeket. (1) Napjainkban több száz természetes szteroidot ismerünk, melyek a gombafélék sejtfalát alkotó ergoszteroltól a rovarok vedlési hormonjaként azonosított ekdizonig számos funkciót betölthet. Az élővilágban előforduló szteroidok osztályozására alkalmazzák az ún taxonómiai osztályozást.

A természetes szteroidok mellett azonban mára több ezer mesterséges szteroidot tartunk nyilván, melyek egy része jól ismert a klinikai orvosi gyakorlatban is. E vegyületeket csoportosítására leggyakrabban a szerkezeti beosztást használják.

Az emberi szervezet működéseinek szabályozásában résztvevő humán szteroidok, azon belül is a legjelentősebb csoport, a szteroid hormonok felosztására egy harmadik, elsősorban a szervezetben betöltött funkció alapján történő beosztás terjedt el. Érdeemes megjegyezni, hogy a humán szteroid hormonok hatásai szerteágazóak, továbbá az egyes vegyületek receptor affinitása is átfedő, tehát a funkcionális csoportok a legjellemzőbb, semmint a kizárólagos hatást jelölik. Ezek alapján megkülönböztetünk glükokortikoidokat, mineralokortikoidokat, androgéneket, ösztrogéneket és progesztagéneket. A hasonló struktúra és receptor felépítés miatt sokan egy hatodik csoportot is itt említenek. A kérdéses vegyületcsoporthoz tartozó D-vitamin és származékai esetében máig nem egyértelmű, hogy hormonként vagy vitaminként leíróbb őket számontartani. A dolgozatban bemutatott munka egy női nemi hormon, az ösztrogének közé sorolt 17- β -ösztradiol hatásait taglalja.



1. ábra

A szteránváz jelölései valamint a 17β -ösztradiol szerkezete

1.1.2. A szteroidok jelátviteli útvonalai

A szteroidok hatásainak és hatásmechanizmusának részletesebb megismerése évszázadok kutatómunkájának eredménye volt. (2) A szteroid kutatás modern korszakát Clever és Karlson 1960-ban publikált cikke nyitotta meg, melyben az ekdizon rovarlárvákra kifejtett hatását vizsgálták. (3) A megfigyelést - a kromoszómák megduzzadását - a szteroidok intracelluláris magreceptorainak felfedezésével sikerült a későbbiekben sikeresen magyarázni. Ezt követte a mára közismertté vált magreceptorokon keresztüli, géntranszkripcióra kifejtett szteroid jelátviteli modell kidolgozása, melyről a következő fejezetben részletesebben is szó lesz.

A génátírásra kifejtett elhúzódó, lassú hatás mellett megfigyelhető azonnali szteroid hatásokról az osztrák-magyar származású Selye János 1942-ben az elsők között publikált. A progeszteron anesztetikus hatása, melyet Selye patkányokon figyelt meg, néhány másodperccel a hormon beadását követően jelentkezik, tehát semmiképpen sem magyarázható transzkripció szabályozáson alapuló mechanizmusokkal. (A szteroid

jelátvitel összetettségéről árulkodik egyébként, hogy Selye kísérletét máig nem sikerült teljeskörűen megmagyarázni. (4))

Ugyan mára számos hasonlóan rövid válaszidejű szteroid hatást sikerült leírni, az ezek mögött meghúzódó jelátviteli struktúrák megismerése egy máig végtelenül érdekes, de hatalmas kihívás az orvostudomány számára.

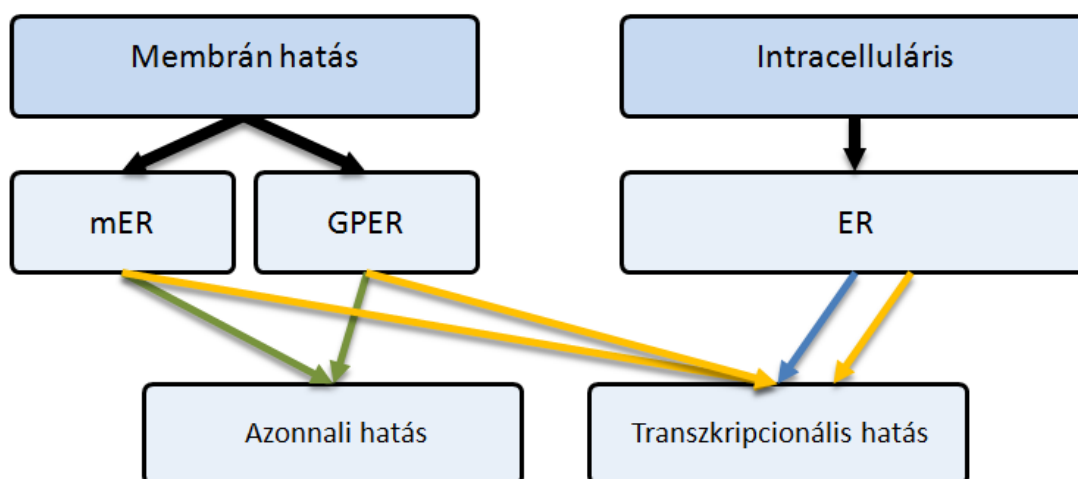
Sokáig az említett „azonnali” szteroid hatásokat kizárólag magreceptor által iniciált folyamatokkal igyekeztek magyarázni. Sikerrel igazolták például, hogy az ER α (ösztrógen receptor α) képes aktiválni egy tirozin kináz/p21ras/MAP-kináz (mitogén aktivált protein kináz) útvonalat, s így az ösztrógen azonnali változásokat indukál az adott sejtben. (5) Számos esetben azonban lehetetlen megmagyarázni a megfigyelt hatást az ER α jelátvitelével, így reményteljes fordulatot hozott az ösztrógen hatásmechanizmusát vizsgáló kutatásokban, amikor 1996-ban felfedeztek egy másik ösztrógen receptort, az ER β -t. A két receptor eltérő szerepéről és együttműködéséről számos publikáció látott napvilágot, noha a klinikai eredmények nem minden esetben váltották be a hozzájuk fűzött reményeket. A magreceptorok működésének mechanizmusairól szintén szó lesz a következő, az ösztrógen jelátvitelét bemutató fejezetben.

Az azonnali hatások megértése felé tett hatalmas lépés volt a sejtfelszíni, illetve egyéb membrán struktúrákban található szteroid receptorok azonosítása. E receptorok többféle szerkezeti csoportba oszthatóak, szerepük a központi idegrendszerből az immunsejtekig számos esetben tűnik meghatározónak a szteroid jelátvitel kapcsán. A dolgozatomban bemutatott munka során az ösztrógen membrán receptorok szerepét vizsgáltuk, mind funkcionális, mind szerkezeti szempontokat figyelembe véve.

Összefoglalva elmondható, hogy a szteroidok magreceptorokon keresztül képesek a génexpressziót megváltoztatni, s ezáltal a sejtek működését igen változatos módon befolyásolni. A folyamatban résztvevő klasszikus szteroid magreceptorok ligand dependens transzkripciós faktoroknak tekinthetők, melyek széleskörű változásokat hoznak létre az expressziós mintázatban. E hatásokon túl a szteroidok képesek ezen magreceptorokon és ezektől eltérő szerkezetű membrán asszociált receptorokon keresztül gyors változásokat is indukálni a célsejtekben. E hatások kifejlődéséért felelős jelátviteli utak első elemei legtöbb esetben a sejtek membránjában található szteroid membrán receptorok.

A különböző szteroidhatások nevezékτανában egy időben kisebb zavar alakult ki a bemutatott sokszínűség miatt, azonban elkerülésére mára megfogalmaztak egy egységes terminológiát. (6) A szteroid hatásokat a válaszidő alapján két - egyes források szerint három - csoportra oszthatjuk. Az **azonnali hatások** (*rapid*) a milliszekundumoktól másodpercekig terjedő időintervallumban bekövetkező változások, míg **hosszútávúnak** (*long term*) azon reakciókat nevezzük, melyeknek kialakulása órákig, esetenként napokig tart. Néhol a két intervallum között létrejött, 24 óránál nem szükségképpen hosszabban megfigyelhető hatásokra **középtávú** (*intermediate*) hatásként hivatkoznak. (6)

Az említett terminológia alapján **genomiális** hatásnak olyan hatást nevezünk, mely bármilyen módon géntranszkripció változásokat okoz függetlenül attól, hogy részt vesz-e nem klasszikus, membrán asszociált receptor a jelátvitelben. **Nem genomiális** egy hatás, mely új mRNS szintézise nélkül, a sejt már meglévő apparátusának működését befolyásolja. Bár a jelátviteli utak sajátosságai ligandonként és sejtípusonként is eltérnek, a fentebbiek alapján megfogalmazható egy átfogó séma, mely segít átlátni a különböző időben és módon jelentkező hatások és a jelátviteli utak közötti kapcsolatot.

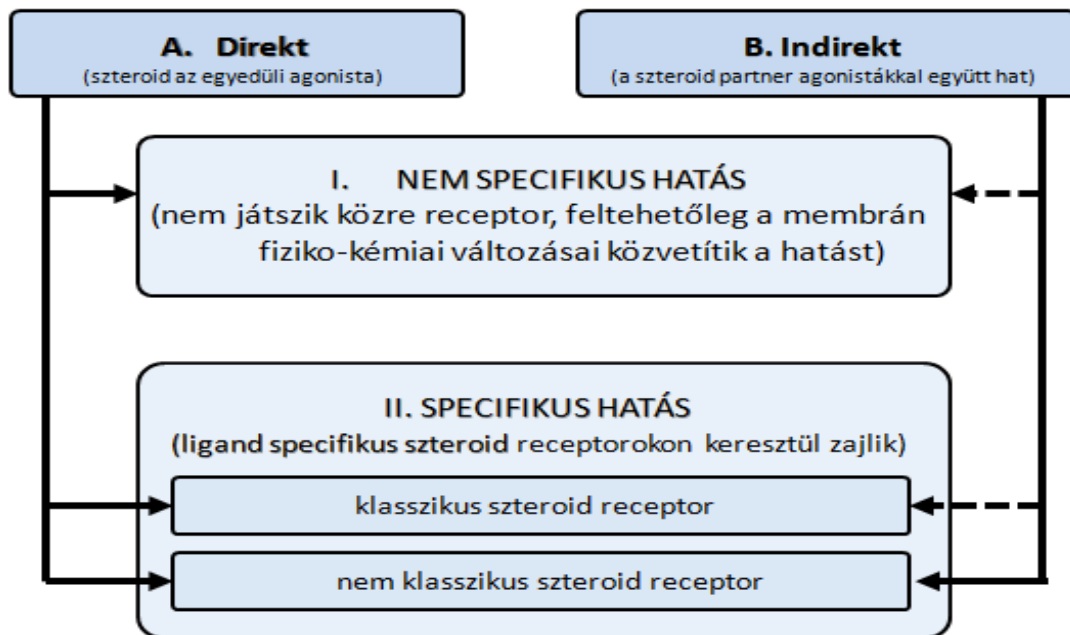


2.ábra

Az ösztrogén támadáspontjainak és hatásának felosztása

Az ábrán a színes nyilakkal jelöltem az egyes hatások fennállásának hosszát. A zöld nyíl az azonnali, a sárga a középtávú, a kék a hosszútávú hatást jelöli. (Rövidítések: mER - membrán asszociált klasszikus ösztrogén receptor; GPER - G-protein kapcsolt ösztrogén receptor; ER ösztrogén magreceptor)

A modern tudományos kutatások során jellemzően a receptor mediált hormon hatások vizsgálata áll előtérben, noha egyéb fiziko-kémiai hatásmechanizmusok is léteznek. Ezek rendszerezésére először tett kísérletet a „First International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones” („Első nemzetközi találkozó a szteroid hormonok azonnali válaszairól”) címet viselő konferencia, melyre 1998-ban került sor a németországi Mannheimben. A konferencia során került kidolgozásra az klasszifikáció, mely a szteroid hatások jelátviteli útvonalait hivatott osztályozni. (7)



3. ábra

A szteroidok hatásmechanizmusait bemutató Mannheim-klasszifikáció

A fenti ábrával kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy több olyan hatásmechanizmus is feltüntetésre került, melyek egyelőre csak mint elméleti lehetőség merültek fel. A már bemutatottaktól eltérő, és megfigyelt mechanizmusból

tulajdonképpen kettő van: a nem specifikus szteroid hatások, valamint az indirekt szteroid hatás.

A **nem specifikus szteroid hatások** jelentőségét sokan és sokszor kérdőjelezték meg, hiszen ezen jelenség léte ugyan nem vitatott, ám kiváltásához csaknem minden esetben a fiziológiás koncentrációt jóval meghaladó mennyiségben kell hogy jelen legyen a vizsgált szteroid. A vizsgálatok során a sejtmembrán fluiditásának és a benne található membránreceptorok mikrokörnyezetének megváltozását, tehát fiziko-kémiai változásokat tapasztaltak. [8]

Az **indirekt szteroid hatások** közé azok az esetek tartoznak, amikor a szteroidok nem önmagukban, hanem valamilyen koagonistával együtt fejtenek ki hatást. Efféle jelenségeket egyes neuroszteroidok esetében sikerült kimutatni. Ezek a központi idegrendszeri szteroidhatások legnagyobbbrészt nem szteroid receptorokon valósulnak meg, hanem különböző ioncsatornákon keresztül. A vizsgált neuroszteroid hatások közül a legtöbb figyelmet a szteroidok és a GABA-A (gamma-amino-vajsav) receptor közötti interakció kapta. A neuroszteroidok allosztérikus koagonistaként képesek a GABA-A receptoron agonistaként és antagonistaként is modulálni a GABA, valamint az ezen a receptoron ható pszichoaktív szerek (például a benzodiazepinek vagy a barbiturátok) hatásait. (8) A mechanizmust egyebek mellett a menstruációs ciklussal párhuzamosan megfigyelhető, a női hormonháztartással összefüggő pszichológiai változások szabályozásában tartják jelentősnek. (9)

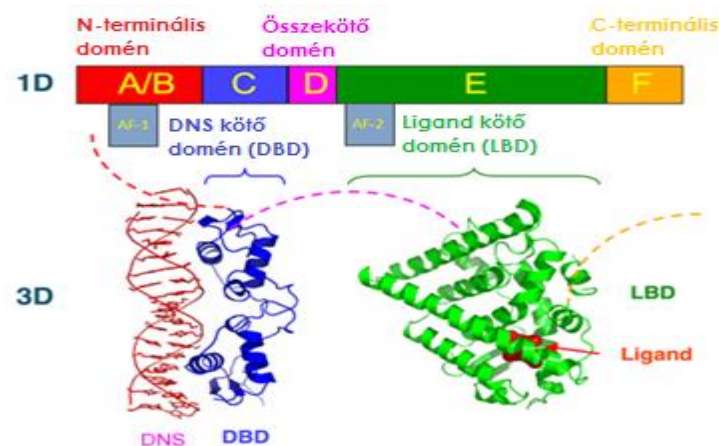
1.2 Az ösztrogén jelátvittele

A szteroidok hatásmechanizmusainak kutatásában az ösztrogén kitüntetett szereppel bír, valószínűleg több információ áll rendelkezésre ezzel az egy hormonnal kapcsolatban, mint a többi szteroiddal együttvéve. Ennek oka sokrétű, közrejátszik az ösztrogén keringési rendszerre kifejtett hatása, mely a kardiovaszkuláris halálozás gyakorisága miatt érthető módon nagy jelentőségűvé teszi az ezzel kapcsolatos kutatásokat. Közrejátszik az is, hogy a menopauza utáni hormonszint csökkenés egyfajta természetes módon hoz létre ösztrogén hiányos állapotot, s így a hormon hatásai könnyebben vizsgálhatóak. E folyamat ráadásul érthető módon önmagát erősíti, hiszen ahogy az ösztrogénnel kapcsolatos eredmények gyűlnek, úgy szaporodnak a megválaszolásra váró új kérdések is. Az ösztrogén jelátvittele többféle szerkezetű, ligand

affinitású, lokalizációjú receptort foglal magába. Ezek feltérképezéséhez fontos megérteni, hogy az ösztrogén jelátvitelében szerepet játszó receptor struktúrákra manapság mint egy komplex rendszer elemeire érdemes tekinteni, semmint párhuzamos jelátviteli utakra. E felfogás persze nem csupán e rendszerre érvényes, inkább csak példája a biológiai rendszerek modern, hálózatelméleti megközelítésének.

1.2.1. Ösztrogén magreceptorok felépítése és működése

A klasszikus szteroid receptoroknak is nevezett intracelluláris szteroid receptorok a magreceptorok családjába tartoznak. Annak ellenére, hogy a szteroid hormonok, a retinsav vagy a D3-vitamin nem mutatnak szoros szerkezeti homológiát, receptoraik mégis azonos családba sorolhatóak, aminek oka a receptorstruktúrák közötti analógia. E receptorcsalád tagjai ugyanis mind öt doménből épülnek fel: egy változékony **N-terminális egység**ből, egy dupla cink-ujj motívumot tartalmazó DNS kötő egységből (**DBD**), egy **összekötő régió**ból, mely döntően a sejten belüli transzportot befolyásolja, egy ligandkötő egységből (**LBD**), valamint egy **C-terminális domén**ből. A receptorokon legalább két aktivációs szubdomén (**AF-1** és **AF-2**) is található az N-terminális alegységen, illetve az LBD-n (4. ábra).



4. ábra

A szteroid magreceptorok szerkezete

(AF-1/2 – aktivációs szubdomén 1 és 2)

(forrás: https://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_receptor)

Érdekes megfigyelés, hogy az N-terminális A/B domén ligandkötés nélkül is képes a gén transzkripciót befolyásolni, ám ez a hatás gyenge, és jóval kevesebb gént érint, mint a ligand mediált hatás. Ennek közvetítésében a DNS kötő C-domén játszik döntő szerepet, mely a DNS ösztrogén reszponzív elemeihez kötődve felelős a transzkripciós hatás kialakításáért. A C-domént egy ún. összekötő régió köti a E-doménhez, mely nem csak a ligand megkötéséért felelős, de számos transzkripciós kofaktor is ezen keresztül fejt ki hatását, illetve ligandkötés esetén az E-domén is részt vesz a transzkripciós hatáshoz szükséges kötődés kialakításában. A C-terminális F-domén jelentősége pontosan nem tisztázott, szerkezete az alfa és béta izoformák esetében eltérő, szerepe egyes gyógyszerek, például a tamoxifen hatásának közvetítésében van. (10)

A fent leírt ösztrogén magreceptoroknak több izoformája is ismert, melyek alternatív RNS hasítás révén jönnek létre. Jelenleg legalább három ER α és öt ER β izoforma ismert, melyek egyedi funkciójáról csak foltszerű ismereteink vannak.(11)

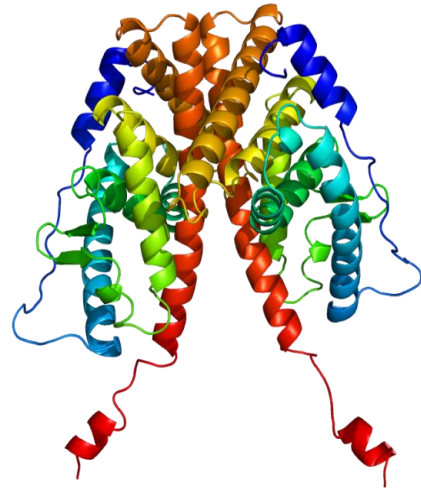
Az ösztrogén magreceptorok a ligandkötést megelőzően döntően a citoplazmában találhatóak, hősokk fehérjékhez kötött, inaktív állapotban. A receptorok csak a ligand kötődését követően vándorolnak a citoplazmából a sejtmagba, nukleáris lokalizációs szignálok (NLS, nuclear localization signal) köszönhetően. A receptorok DNS kötő domainjén található elsődleges lokalizációs szignál mellett a ligandkötő domainen is található egy hasonló, másodlagos nukleáris lokalizációs szignál. Ezt a másodlagos szignált a hősokk protein fedi, és csak a ligand kötődésének hatására létrejövő konformációváltozás eredményeként válhat szabaddá, a ligandkötés feltétele a receptor sejtmagba kerülésének. A dimerizálódás után a sejtmagba kerülő receptorok gyakran koaktivátor regulátor fehérjékhez asszociálódva kötődnek végül a DNS receptorkötésre alkalmas részéhez. A DNS ezen részét HRE-nek (hormone response element) nevezzük. A receptor dimerizálódással hozható összefüggésbe, hogy a HREk palindrom, szimmetrikus DNS szekvenciák. Ezek általában a gének promoter régiójában helyezkednek el, és az adott gén transzkripciójának szabályozásában vesznek részt. (12, 13)

1.2.2. A membrán ösztrogén receptorok

1.2.2.1. Membrán kötött klasszikus ösztrogén receptor (mER)

Talán a legismertebb membrán kötött ösztrogén receptor az mER (5.ábra), mely az ösztrogén magreceptorokkal azonos géntermék. Utóbbi állítást számos vizsgálat tanúsítja. Igazolt, hogy az ER (ösztrogén receptor) negatív CHO (Chinese hamster ovary) sejteken végzett vizsgálatok tanúsága szerint ER α transzfekciót követően a sejtekben a receptor mind a magban, mind a sejtmembránban megjelenik (14), míg ER α/β homozigóta KO (knock-out) sejtekben mindkét receptor populáció kimutathatatlanul válik. (15) A két receptor molekulatömegében, ösztrogén affinitásában megegyezik (16, 14), illetve monoklonális antigén vizsgálatok igazolják, hogy epitópjaikban is nagyfokú azonosságot mutatnak. (17) Tömegspektrometriás vizsgálatok szintén megerősítik az egyezést. (18) Ezen eredmények tükrében mára elfogadott tehát, hogy a mER populáció az intracelluláris receptorok membránba helyeződésével jön létre. A membránhoz horgonyzódás mechanizmusának megértésével kapcsolatban sokáig az jelentette a legnagyobb problémát, hogy mivel az ösztrogén magreceptor nem rendelkezik megfelelő hidrofób régióval, membránba épülése nem magyarázható egyszerű fizikai jelenségként. Az áttörést Pedram és munkatársai szolgáltatták (19), mikor sikerrel mutatták ki, hogy a Golgi-apparátusban található két enzim, a DHHC-7 és DHHC-21 képesek a receptort a 447-es pozíciójú cisztein oldalláncon palmitoilsavval konjugálni, s így lehetővé tenni a receptor membránhoz horgonyzását. A két enzim bármelyikének gátlása a membránba helyeződést a kettős gátláshoz hasonlóan csökkenti, így vélhetően azok együttműködése szükséges a folyamat végbemeneteléséhez.

Több vizsgálat egybehangzó eredménye alapján mER receptor populáció a teljes ösztrogén receptor készlet kb. 5-10%-át alkotja (20, 18, 14), de továbbra sem ismert, hogy mi határozza meg a palmitoilsavas konjugáció volumenét. Első hallásra talán kevésnek hangozhat a membrán receptor populáció mérete, ám érdemes megjegyezni, hogy az



5. ábra

Az mER 3 dimenziós modellje
(forrás: https://en.wikipedia.org/wiki/Estrogen_receptor)

átlagos magreceptor iniciált transzkripciós hatás kialakulása során a magreceptor populációnak szintén csak kb. 10-15%-a aktiválódik. (21)

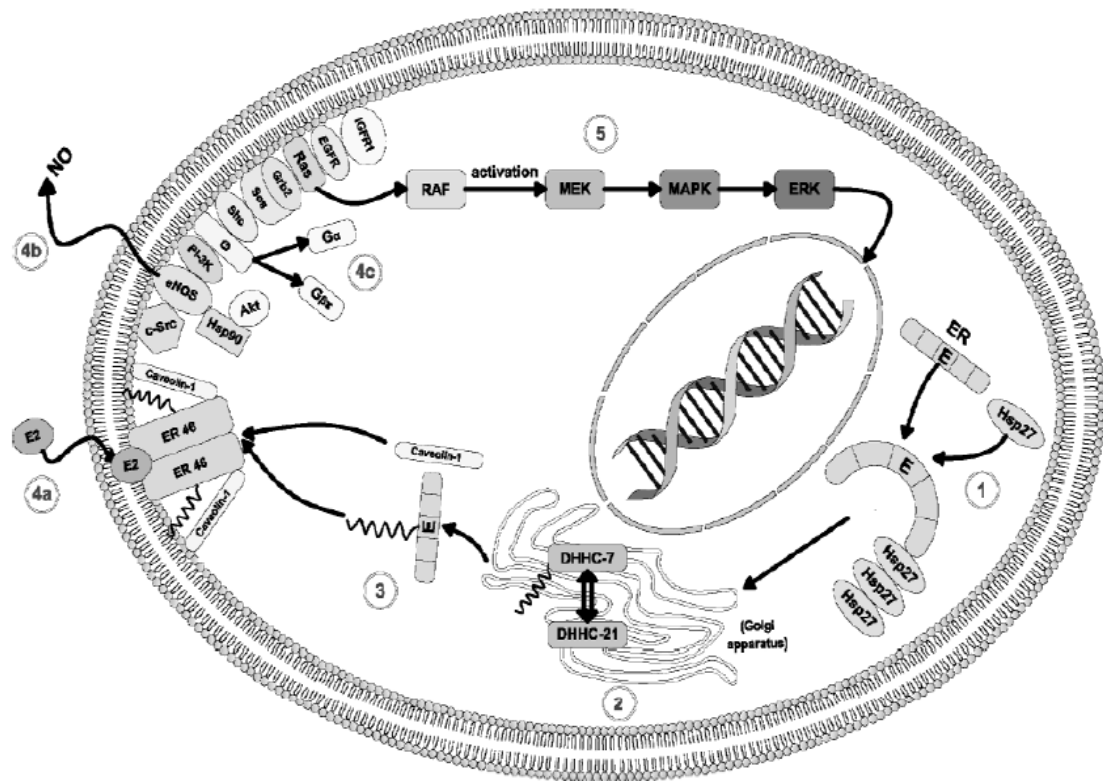
A receptorok a konjugációt követően a membrán speciális, kaveolának nevezett struktúráiban helyezkednek el. A kaveolák a lipid raftok csoportjába tartozó, 50-100 nm nagyságú, palack alakú membrán betűrődések, melyek a membrán egyéb területeitől eltérő lipid és fehérje struktúrákat tartalmaznak. Funkciójuk mind a jelátvitel, mind az egyéb sejtfunciók terén megkülönböztetett. A membrán struktúrák kulcsfontosságú alkotóeleme a kaveolinnak nevezett fehérje, mely a membrán ösztrogén receptorok megfelelő működéséhez is elengedhetetlen. A kaveolin-1 a receptor E domain 522-es szerin oldalláncához kapcsolódva segíti a membránhoz horgonyzódást. Ezt támasztja alá, hogy a hidrofil aminosavat hidrofób alaninnal helyettesítve a membrán ösztrogén receptorok száma több, mint 62%-os csökkenést mutat. (16) A kaveolin fehérje bizonyítottan meghatározó a szignoszóma jelátviteli folyamataiban, hiszen például hippokampális neuronokban a kaveolin-1 jelenléte az mER mGluR1 glutamát receptorokkal történő interakciójával jár együtt, míg a kaveolin-3 esetében az mGluR2/3-mal való kapcsolódás mutatható ki. (22-24)

Feltételezések szerint a magreceptorokhoz hasonlóan a membrán kötött ösztrogén receptorok esetében is megvalósul a jelátvitelhez a receptorok dimerizációja, mely vélhetően mind hetero- mind homodimerizációt jelenthet. (15) A receptorok nem rendelkeznek saját enzimikus aktivitással, működésükhöz számos egyéb jelátviteli struktúra jelenléte is szükséges, melyek a receptorral együtt alkotják a szignoszómának nevezett funkcionális egységet (6. ábra). A szignoszómák felépítésében sejtípustól függően részt vehet a c-Src (protoonkogén nem receptor tirozin-kináz) (25), az adaptor fehérje Shc (a MAPK útvonal egyik aktivátora) (26), a MAPK útvonal első elemeként is ismert Ras, a kaveolin-1 (16), a PI3K (27), több receptor tirozin kináz (28, 29), csakúgy mint egyes G-proteinek (15), az inzulin-szerű növekedési faktor receptor IGFR (29), továbbá az epidermális növekedési faktor receptor EGFR (30, 31, 29)

A fentiek alapján érthető, hogy a receptorok jelátvitelét a szignoszómák felépítése nagyban befolyásolja, s ez megteremti az ösztrogén hatás szövetspecifitásának alapjait is, mivel mint már említésre került, a szignoszómák összetétele sejtípusonként eltérő lehet. A legjobban ismert szignoszóma a NO szintáz is magába foglaló, endothelsejtekben található ösztrogén receptoré (6. ábra). A receptor

a membránhoz horgonyzódás során egyebek mellett a c-Src-vel (Rous sarcoma oncogene cellular homolog) alkot komplexet (32), illetve az mER a PI3K (foszfatidil-inozitol 3-kináz) direkt aktivációjára is képes a p85 α regulátor alegységen keresztül. (33)

Az mER fiziológias szerepének megismerése felé jelentős lépést jelentett az in vivo modellek kidolgozása. Többféle egér-modellt is kidolgoztak a receptor funkciójának vizsgálatára, s az ezekkel végzett vizsgálatok alapján a membrán iniciált ösztrogén jelátvitel mind az egyedek reproduktív szerveinek fejlődésében, mind azok megfelelő működésében nélkülözhetetlen szerepet játszik. A receptor a fentiekén túl egyéb területeken is jelentősnek bizonyult, melyek közül kiemelkedik a kardioprotektív hatás, illetve az emlőrákok proliferációjának szabályozása. (34-36)



6. ábra

Az mER membránba helyeződése és jelátvittele (37)

(**IGFR1**- inzulinszerű növekedési faktor receptor1, **EGFR**- extracelluláris növekedési faktor receptor, **Ras**- Rat sarcoma protein, **Grb2**- növekedési faktor receptor kötött protein 2, **Sos**-„son of sevenless” protein, **Shc**- SHC transzformáló protein, **PI3K**- foszfatidilinozitol 3-kináz, **eNOS**-endoteliális NO szintáz, **Hsp90**-hősokk fehérje 90, **ER46**-ösztrógen receptor 46, **E2**-ösztradiol, **DHHC7/21**- palmitoil aciltranszferázok, **Hsp27** – hősokk protein 27, **RAF**- „Rapidly Accelerated Fibrosarcoma” kináz, **MEK**- Mitogen-activated protein kinase kinase, **MAPK**- mitogén aktivált protein kináz, **ERK**- extracelluláris receptor tirozin kináz, **NO** – nitrogén monoxid)

1.2.2.2. G-protein kapcsolt ösztrógen receptor (GPER, GPR30)

A receptort kódoló GPER gén három exonból áll, és a 7p22.3 régióban helyezkedik el. A receptor egy hét transzmembrán régiót tartalmazó, G-protein kapcsolt

ösztrogén receptor, mely a G-protein kapcsolt receptorok (*GPCR*) családján belül a rodopszin-szerű receptorok közé tartozik. 375 aminosavból áll, teoretikus molekulatömege kb. 41 kDa. 2000 előtt a receptort árva receptorként tartották számon, ekkor került először látótérbe, mint potenciális ösztrogén membrán receptor. (38)

A receptor sejten belüli elhelyezkedéséről ellentmondások az eredmények. Bár a *GPCR*-ok általában a plazmamembránban helyezkednek el, mára ismert, hogy intracelluláris membránokban is megtalálhatóak (39), különösen, ha ligandjuk lipofil, mint ahogy a *GPER* esetében is. Prossnitz és munkatársai (38) szubcelluláris markerekkel dolgozva úgy találták, hogy a *GPER* csak az endoplazmás retikulumban és az azzal kontinuos sejtmembránban található. Ezzel szinte egyidőben két másik vizsgálatban (40, 41), melyekben a receptor különböző epitópjai ellen jelzett, poliklonális antitesteket használtak, ezzel ellentétes eredményt kaptak, vagyis sikerült kimutatniuk a receptort a sejtmembránban is. Megint más vizsgálatok szerint a receptor a Golgi-apparátusban és az endoplazmás reticulumban helyezkedik el. (42, 43) Az eredmények értékelésekor azonban nem szabad elfelejtenünk, hogy a receptor mint más proteinek is, képződése során mindenképpen megjelenik az endoplazmás retikulumban és a Golgi-apparátusban, ám ez nem jelenti automatikusan, hogy ezekben a membránokban már funkcióval is bír. Összességében elmondható, hogy bár jelátviteli szempontból nem közömbös a lokalizáció, de mivel az ösztrogén könnyedén bejut a citoszolba, az intracellulárisan elhelyezkedő receptor sem jelent elvi akadályt egy gyorsan kialakuló szteroidválasz tekintetében. A receptor membránba ágyazódása után az N-terminális rész extracellulárisan helyezkedik el, és amennyiben ez a membrán a plazmamembrán, a terminális régióban található, aszparaginsavban gazdag rész glikozilálódott állapotban van.

A *GPER* szöveti expressziójának feltérképezése ezidáig igen ellentmondásos eredményeket szült annak ellenére, hogy northern blott, RT-PCR, RNase protection assay vizsgálatokkal is megpróbálták a kérdés végére járni. (44-49) A korábbi eredményekkel szemben, melyek a *GPER* széleskörű expresszállódását mutatták, a LacZ transzlációs fúziós fehérje segítségével végzett vizsgálatokban a gén csak bizonyos endotélsejt szubpopulációkban, agyi erek simaizomsejtjeiben, a központi idegrendszer egyes sejtjeiben és a mellékvese velőben fejeződik ki. (46) Mizukami és munkatársai szerint a

korábbi, széleskörű expresszióról szóló eredményeket az endothelsejtekből származó GPER magyarázza, tehát nem valós expressziós mintázatról tanúskodnak. (50)

A GPER ösztrogén kötését a receptor expressziós mintázata és az ösztrogén mediált jelátvitel hasonló lokalizációja vetette fel (51-54), továbbá az a megfigyelés, hogy ösztrogén érzékenységükben eltérő mellrákos sejtek között a génexpressziós mintázatban a GPER csak az ösztrogénre reagáló sejtekben fejeződött ki. A kapcsolatot azóta többféleképpen is sikerült igazolni.

Prossnitznak és munkatársainak (38) sikerült egy nagy receptor affinitású, fluoreszcensen jelzett ER agonista etinilösztadiol származékot előállítani. Ez a vegyület számos előnnyel bír a másutt használt tríciummal jelzett ösztrogénhez képest, például lehetőség van nagy felbontású konfokális fluoreszcens mikroszkópos felvételek készítésére, mely lehetővé tette a GPER pontos szubcelluláris lokalizálását. Az említett vizsgálatban kapott festődési mintázatok homológiát mutattak egyes korábbi GPER ellenes antitestekkel végzett receptor kimutatásokkal. (42) Több tanulmányban, többek közt Prossnitzék kísérletében is vizsgálták a receptor ligand specificitását. Az ő eredményeik szerint a GPER K_i értéke 17β -ösztadiolra nézve körülbelül 6nM. Ehhez hasonló eredmények jelentek meg modell membránnal végzett kísérletek kapcsán is (3nM). (41) A tesztek során egyéb szteroidok affinitását is vizsgálták, s azt találták, hogy az ösztroon és az ösztriol alacsony affinitással bír, míg a progeszteron, a tesztoszteron, a kortizol és a 17α -ösztadiol nem kötődött a receptorhoz. Hatá szerkezeti vizsgálatok szerint az ER antagonistá tamoxifen GPER agonistaként hat, hasonlóan egy alig ismert ösztrogén antagonistá vegyülethez, az ICI182,780-hoz, mely szintén nagy affinitást mutatott a GPER iránt. (51, 41)

A receptor ligand specificitásának vizsgálatában, és általában a GPER jelátvitelének megismerésében mindenképpen mérföldkőnek számít néhány eredmény. Bologának és munkatársainak sikerült szelektív GPER agonistát azonosítani, melyet G1-nek neveztek el. Ez az eredmény azért jelentős, mert a szelektív agonista birtokában leválasztható a GPER közvetítette hatás a hagyományos ösztrogén receptorok ($ER\alpha$ és $ER\beta$) útján megvalósulókról. (55) Ugyancsak nagy előrelépést jelentett a GPER antagonistá G15 felfedezése, mely Dennis és munkatársainak nevéhez fűződik. (56)

1.2.2.3. ER-X

Több közlemény is beszámol olyan membrán ösztrogén receptorokról, melyek az eredmények alapján valószínűleg a klasszikus ösztrogén receptor poszt-transzlációs módosulása során alakulnak ki. Toran-Allerand és munkatársai egy átmenetileg ER-X-nek elnevezett membrán asszociált ösztrogén receptorról számoltak be, melyet a neokortexben, illetve az uterusban sikerült kimutatniuk. A 62-63 kDa-os molekulát az ER α E és C doménjét célzó antitestekkel detektálható. Az ER-X eredményeik alapján az ER α -nál nagyobb affinitást mutat mind a 17 α -ösztradiol, mind a 17 β -ösztradiol iránt. (57)

Számos közlemény számol be olyan splice variáns ösztrogén receptorokról is, melyek hatásai elsősorban a központi idegrendszerben figyelhetők meg. Az ezekkel kapcsolatos ismereteink sajnos hiányosak, így nehéz ezeket jelenleg élettani szempontból kontextusba helyezni. (58)

1.3. Az ösztrogén szerepe a különböző vizsgálati modellekben

1.3.1. Emlőráksejtek

Az emlőrák esetében az ösztrogén jelátvitel különösen nagy klinikai jelentőséggel bír, melynek alapja daganatsejtek gyakran megfigyelhető ösztrogén érzékenysége. A leggyakoribb szövettani típus, a duktális karcinómák kb. 70%-a mutat ösztrogén receptor pozitivitást, s e daganatok kb. 50%-a ösztrogén dependens, vagyis a daganat proliferációját az ösztrogén facilitálja. A gyógyszeres kezelés során az ösztrogén termelődését akadályozó aromatáz gátlók mellett a szelektív ösztrogén receptor modulátoroknak (SERM - selective estrogen receptor modulator) ezért nagy jelentősége van. Az elsőként alkalmazott hatóanyag a tamoxifen volt, mely 40-50%-al képes csökkenteni a recidívák, illetve az ellenoldali daganatok kialakulásának valószínűségét. (59) Az antiösztrogén kezelések során fellépő mellékhatások (pl. thromboembolizáció, endometrium karcinóma) mellett komoly problémát jelent a szerekkel szemben kialakuló rezisztencia is. (60) A rezisztencia összefüggést mutat a receptorok számával, elhelyezkedésével és azok szabályozásával.

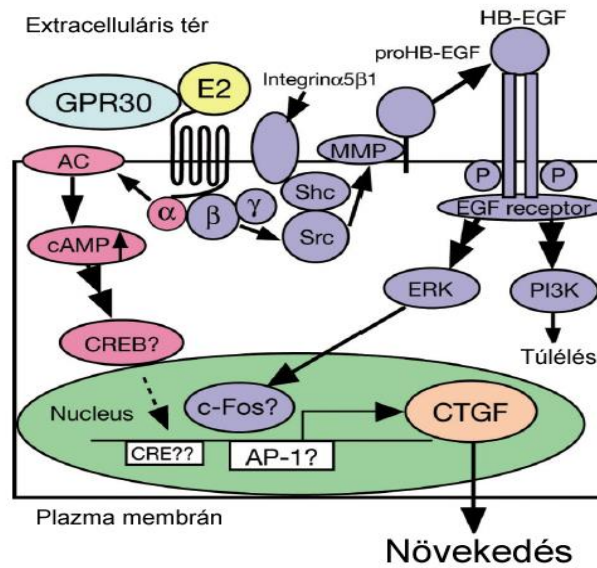
A klasszikus modellben az ösztrogén proliferatív hatását a DNS ösztrogén reszponzív elemeihez kötődő, dimerizálódott, számos regulátor proteinnel együttműködő ösztrogén magreceptorok közvetítik. A magreceptorokon keresztül kifejtett transzkripció hatás különböző mérések alapján a teljes genom kb. egyharmadát érintheti. Ilyen volumenű transzkripció választ még modern rendszerekkel is nagyon nehéz átfogóan elemezni. A napjainkban egyre népszerűbb hálózatelméleti szemlélet az, ami középtávon értelmezhetővé tehet ekkora gráfokat. Egy nemrégiben publikált, számos microarray vizsgálat adatait összesítő meta-analízis során, melyet MCF7 sejteken végeztek, 15 korai, proliferációval összefüggő és 20 késői, sejtosztódással, DNS javítással, rekombinációval összefüggésbe hozható, ösztrogén aktivált útvonalat azonosítottak. (61) Újabb eredmények tükrében úgy tűnik, hogy a fenti transzkripcionális hatás közvetítésében a magreceptorok mellett membrán receptorok is szerepet játszanak. Egyre több közlemény áll rendelkezésre, amely kifejezetten a membrán iniciált expressziót vizsgálja, s ezek alapján a membrán receptor specifikus ösztrogén agonisták proliferatív hatása - in vitro - az ösztrogénével vetekszik. A jelátvitelben mind a GPER, mind az mER részt vesz. (62-64)

A GPER-t (G-protein kapcsolt ösztrogén receptor) expresszáló MCF7 és más emlőrák sejtvonalakon végzett vizsgálatok alapján a receptor szerepet játszik a daganatok ösztrogén általi proliferációjának szabályozásában, illetve ezen keresztül az anti-ösztrogén kezelésekkel szembeni rezisztencia kialakulásában is. (65-67) Több munkacsoport is igazolta, hogy a daganatos sejtek GPER expressziója általában magasabb, mint a normál sejteké. (68, 69, 42) Emlőrákokra vonatkozó, retrospektív klinikai vizsgálataik során Luo és munkatársai kimutatták, hogy a GPER fokozott expressziója korrelációt mutat egyéb, rossz prognosztikai faktorokkal, úgymint HER-2 expresszió, tumornövekedés és a metasztatizálási hajlam. (70) Egy klinikai vizsgálatban a GPER pozitív daganatoknál tapasztalt fokozott GPER expresszió rosszabb túléléssel járt együtt. (71, 72)

A fenti megfigyelések mögött álló mechanizmusokat többen próbálták feltérképezni. (51, 73-75) E vizsgálatok alapján a receptor ER negatív daganatsejtekben is képes az EGFR transzaktivációjára, mely a MAP kináz aktiváción keresztül vezet a proliferáció, a sejt migráció és túlélés indukciójához. Az EGF receptor transzaktivációjának mechanizmusa mára viszonylag jól leírt. Az ösztrogén a GPR30-hoz

kötődik, mely ezáltal képes aktiválni a három alegységből álló G-proteint. Az aktivált G-protein α -alegysége az adenil cikláz aktiválódását indukálja, ami a cAMP szint emelkedéséhez vezet. A β - és γ -alegységek pedig az Src tirozin kinázt aktiválják, ami az Shc adaptor fehérjén keresztül kötődik az $\alpha 5\beta 1$ nevű integrinhez. Ez a komplex aktiválja a mátrix metalloproteáz enzimet (MMP), így az képes hasítani a pro-HB-EGF-et, minek következtében a HB-EGF (*Heparin binding EGF*) az extracelluláris térbe jut. A HB-EGF ezt követően egyfajta autokrin/parakrin mediátorként kötődik az EGF receptorhoz, és aktiválja azt. Az aktiválódott EGF receptor a PI3K-t (*foszfatidilinozitol-3-kináz*) és az ERK-t (extracellular signal-regulated kinase) aktiválja. (76, 77) Az EGFR receptoron keresztüli MAP kináz aktiváció számos fontos gén expresszióját befolyásolja, erről részletesebben a későbbiekben még szó lesz.

Egybehangzó eredmények szerint a GPR30 útján történő ERK aktiváció egy növekedési faktor, a CTGF (connective tissue growth factor) extracelluláris térbe történő szekrécióját is facilitálja, az így növekedési faktor szintén részt vesz a mellrák sejtek proliferációjának serkentésében. (78)



7. ábra

A GPR30 jelátvittele emlőrák sejtekben

(AC - aktivációs komplex, GPR30 (újabban GPER) – G-protein kapcsolt ösztrogén receptor, E2 – ösztradiol, HB-EGF – heparin kötő EGF-szerű növekedési faktor, ERK – extracelluláris receptor tirozin kináz, CREB – cAMP rezponzív element kötő fehérje, cAMP – ciklikus adozin monofoszfát, CTGF - kötőszöveti eredetű növekedési faktor, MMP, Shc – SHC transzformáló protein, Src – celluláris Src kináz, AP-1 – aktivátor protein1) (Y. Mizukami cikkéből magyarra fordítva. (50))

A GPER a MAP kinázok útján aktiválja a c-fos útvonalat is. (75) A 62kDa-os c-fos protein egy proto-onkogén, mely a c-junnal heterodimert alkotva az AP-1 (Activator Protein-1) komplexet hozza létre. A komplex a DNS AP-1 specifikus régióhoz kötődve aktivál számos daganat fejlődéssel kapcsolatos útvonalat, melyek az emlőrák mellett más daganatok esetében is kulcsfontosságúak. (79) A GPER aktiváció a daganatsejtek migrációját is serkenti, melynek közvetítői a CTGF (connective tissue growth factor), a CXCR1 (CXC receptor-1) (80), a cyclin E illetve a NOTCH útvonal. (81, 78, 82) (7. ábra)

A GPER iniciált alternatív ösztrogén jelátviteli út szerepét az emlőráksejtek tamoxifen rezisztenciájának kialakulásában is igazolták. A tamoxifen a GPERen agonistaként hat, és a receptor a fent részletezett módon, tehát döntően az EGF receptoron keresztül proliferatív szignált közvetít. (83, 84) Ignatov és munkatársai igazolták, hogy

tamoxifen rezisztens sejtvonalak esetében a GPER expresszió növekedésével egyidejűleg a daganatok G1-re adott proliferatív válasza is kifejezettebb. (72) Ugyanezen munkacsoporthoz köthető az a megfigyelés is, hogy tartós G1 kezeléssel a tamoxifen rezisztencia kialakítható, miközben a GPER receptorok száma jelentősen megnő. (71) In vivo pedig a GPER pozitív daganatok tamoxifen kezelése fokozott GPER expresszióhoz vezet, és ezzel párhuzamosan romlik a betegek túlélése. Az újonnan kifejlesztett GPER antagonistá G-15 javítja a tamoxifen rezisztens daganatsejtek endokrin kezelésre adott válaszát és csökkenti azok proliferációját. (72)

A GPER mediálta hatások egy részét egyébként nemcsak a daganatos sejtekben, de a daganat asszociált fibroblasztokban (cancer associated fibroblast – CAF) is ki lehet mutatni.(85) Hypoxia indukált GPER expresszió növekedés például nem csak a daganatsejtek, hanem a daganat asszociált fibroblasztok proliferációját és migrációját is fokozta. (85) Azt is kimutatták, hogy a GPER receptor aktiváció növeli az antiösztrógen kezelések során sajnos nem ritkán fellépő endometriális karcinómák proliferációját. A tamoxifen egy GPER agonista, ezért nem kizárható, hogy endometriális tumorok gyakoribbá válását a GPER receptor is elősegíti. (74) A GPER agonista hatású G1 a gyulladásszerű daganatsejtek invázióját is fokozza. (65)

A membrán asszociált klasszikus ösztrogén receptor (mER) szintén szerepet játszik az emlőráksejtek ösztrogén indukált proliferációjának közvetítésében. A receptor – hasonlóan a normál szövetben tapasztaltakhoz – a daganatsejtekben is szignálszómákban helyezkedik el, ezek összetétele alapján pedig feltételezhető, hogy a receptor ezeken keresztül szerepet játszik a programozott sejthalál, a DNS javítás és a sejtsztódás folyamataiban. A c-Src (31), a PI3K (86), a MNAR/PELP (modulator of nongenomic actions of the estrogen receptor), az Shc (SH2-containing collagen-related protein) (31, 87), az angiotensin II receptor - AT1 (88) mellett az EGF receptor is megtalálható a kaveolákban. (31)

Az EGFR transzaktiváció hatásai között külön említést érdemel a MAPK/ERK aktiváció, mely számos proliferációval, differenciációval, sejthalállal összefüggő útvonalat szabályoz. (89) Az EGFR receptoron keresztüli JNK aktiváció és következményes Bcl2 inaktiváció (90) a pro-apoptotikus Bad (Bcl-2-associated death promoter) komplex formációját lehetetleníti el. Ezt megerősítő in vitro eredmény, hogy az ösztrogén gátolja

az emlőráksejtek UV fény és paclitaxel indukált apoptózisát. (91) Ismert az is, hogy az mER aktiválja a PI3K/Akt útvonalat is, mely szintén közvetít anti-apoptotikus hatásokat. (37, 87)

A DNS javító mechanizmusokat az mER szignalizáció a sejtciklus szabályozáson keresztül befolyásolja. Az ösztrogén membrán receptor aktiváció az Akt mediált TopBP1:ATR komplex formációjának gátlásán, valamint a Chk1 kináz gátlásán keresztül akadályozza a DNS javítást. (86) A két receptor típus (GPER, mER) esetében egyaránt elmondható tehát, hogy jelentős szerepet játszik a tumorok proliferációjának szabályozásában. (21)

1.3.2. Neutrofil granulociták

Az ösztrogén immunrendszerre kifejtett hatása szerteágazó, mind pro-, mind anti-inflammatorikus hatásokat magába foglal. A hormon neutrofil granulocitákra kifejtett hatásait vizsgáló tanulmányok többsége az érlemeszesedés témakörében íródott, noha szép számmal találunk olyan eredményeket is, melyek az ösztrogén általánosabb, anti-inflammatorikus hatásait bizonyítják. (92, 93) A neutrofil granulociták ösztrogén hatások során megfigyelt sejtválaszainak rövid válaszideje alapján csaknem biztos, hogy a jelátvitelben a magreceptorok mellett a membrán receptoroknak is szerepe van. Több vizsgálat is igazolta, hogy az ösztrogén magreceptorok mellett a neutrofilek mind membrán asszociált klasszikus ösztrogén receptorokkal (mER), mind a G-protein kapcsolt ösztrogén receptorral rendelkeznek. (94, 95)

A neutrofilek szerepe az **érlemeszesedés** elhúzódó gyulladós folyamataiban vitathatatlan. Az ateroszklerotikus lézió kialakulásában, progressziójában és a már létrejött plakk destabilizálásában egyaránt fontos szerepet játszanak. (96) A hiperlipidémiás és más atherogén metabolikus állapotokban a neutrofil szám szoros korrelációt mutat az ateroszklerotikus plakk formációval. Neutrofil granulociták hiányában a többi immunsejt száma is drasztikusan csökken az ateroszklerotikus léziók területén. (97, 96)

A plakkok kialakulását a neutrofilek döntően két, összefüggő úton facilitálják. Egyrészt az aterogenezis során fennálló lassú gyulladós folyamatok pro-inflammatorikus mediátorokon keresztüli szabályozásával. Különösen igaz ez a monocita-makrofág rendszerre, melynek aktivációja jelen ismereteink szerint elsődleges a patogenezis során.

(98-100) Az aktiváció folyamatában elsősorban a neutrofilek által termelt kemokinek, lipid mediátorok és a komplement rendszer bizonyos elemei vesznek részt. (96)

Az érlelmeszedéssel összefüggő másik fontos mechanizmust a neutrofilek által termelt reaktív oxigén gyökök (ROS) jelentik, melyek több úton is hozzájárulnak az aterogenezis folyamatához. A granulocita ROS termelést elsősorban a lipoxigenáz, myeloperoxidáz (MPO) és NADPH oxidáz enzimek végzik. A kibocsátott szabadgyökök az oxidált LDL képződésen keresztül hozzájárulnak a makrofágok habos-sejtté alakulásához, ily módon magához az ateroszklerotikus plakk kialakulásához.(96) A neutrofilek által termelt és kibocsátott granulocita eredetű MPO a makrofágok mannóz receptorain keresztül felvételre kerül, s azokat további szabadgyök, illetve pro-inflammatórikus mediátor (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 and GM-CSF) termelésre készíti.(101)

Az ösztrogén ismert vaszkuloprotektív hatásának egyik eleme a hormon neutrofilekre kifejtett anti-inflammatórikus hatása, mely mindkét fenti mechanizmust érinti, és mind *rövid*, mind *hosszútávon* megfigyelhető.

Rövid távon a 17- β -ösztradiol csökkenti a neutrofilek különböző kemokinekre adott immunválaszát (102-104), gátolja a neutrofilek diapedézisét (103, 105-107), illetve szintén azonnali hatások révén csökkenti a ROS termelést. (108) Az azonnali ösztrogén hatások talán legtöbbször vizsgált modellje a neutrofil granulociták NO szintézisének ösztrogén általi serkentése. Ez utóbbi ösztrogén hatás azért is érdekes, mert jelátvitelére nagy valószínűséggel membrán ösztrogén receptorokhoz köthető. (109, 95) Jelen ismereteink szerint a membrán receptorok valószínűleg másodlagos hírvivő molekulákon keresztül serkentik a NO termelődését. (110) E feltételezést támasztja alá, hogy az ösztrogén ilyen hatása membrán impermeabilis ösztrogén-BSA kezelést követően is megfigyelhető. (109) Említésre érdemes, hogy a fentiekén túl az ösztrogén serkenti az nNOS transzkripcióját is, mely a neutrofilek NO termelésének kulcs enzime. (110)

A *hosszútávú* hatások között a magreceptorok indukálta transzkripcionális válasz mellett szintén tetten érhető a membrán receptorok génexpressziós hatása is. Blesson és munkatársai HL-60 neutrofil granulocita sejtmoddellen végzett génexpressziós vizsgálataik során kimutatták, hogy mind 17- β -ösztradiol kezelés, mind szelektív GPER receptor agonista kezelés hatására hasonló transzkripcionális válasz figyelhető meg. A vizsgálatban a GPER specifikus G1 iniciálta hatások részben átfedtek az ösztrogén

hatásaival, részben egyéb géneket reguláltak. A microarray vizsgálatok során azonosított és validált gének GSE (Gene Set Enrichment (111)) analízise gyulladással és immunfolyamatokkal, valamint kardiovaszkuláris megbetegedésekkel összefüggő funkciók érintettségét igazolja. (94) Az ösztrogén neutrofilekre kifejtett hatását vizsgálva több közlemény is megerősítette, hogy a hormon számos olyan gént regulál, mely fontos szerepet játszik a neutrofilek toborzásában és aktivációjában. (112, 113)

Az ösztrogének csoportjába tartozó szteroidok legfontosabb szerepe a női reprodukciós szervek fejlődésének és működésének szabályozása, ugyanakkor mint láttuk, számos egyéb fiziológiai és patofiziológiai folyamatban is részt vesznek. E folyamatok közül az ösztrogén emlőrák proliferációban betöltött szerepe, illetve neutrofilekre kifejtett hatása képezi dolgozatomban fő témáját. A kapcsolat az említett két terület között a szabályozásban részt vevő receptor struktúra, az ösztrogén membrán receptorok rendszere, azok feltételezhető kiemelt szerepe.

Emlőrák sejtvonalon végzett vizsgálatunk homlokterében a membrán iniciált ösztrogén jelátvitel proliferatív hatásának vizsgálata állt. E hatást több munkacsoportnak is sikerült igazolnia, háttéréről azonban keveset tudunk. (114, 63, 64) A bemutatott munka során a génextpresszió keresztül monitoroztuk az egyes ösztrogén származékok proliferatív hatását. A membrán iniciált jelátvitel összehangolt morfológiai és funkcionális vizsgálatával kerestük a választ arra kérdésre, hogy vajon leválasztható-e a membrán iniciált hatás a magreceptorokéról. A membrán receptorok szelektív gátlására alkalmazott módszerünk a ligand mediált receptor internalizáción alapult. A jelenség során a membrán asszociált receptor ligand kötődés olyan konformáció változást szenved el, melynek eredményeképp a receptor végül internalizációra kerül. A membránlefűződés során létrejött vezikulum a későbbiekben fuzionálhat lizoszómával, mely a receptor degradációjához vezet, illetve visszaépülve a membránba, reciklálódhat. A jelenség fiziológiai szerepe jól ismert a membrán iniciált jelátviteli utak szabályozásában, egyfajta negatív visszacsatolási mechanizmusként működve védi a sejtet a túlstimulációtól. E jelenség ösztrogén receptorok esetében ezidáig nem bizonyított, noha mineralokortikoid membrán receptoroknál például a két receptor készlet szinergisztikus együttműködése ismert. (115). Az ösztrogén membrán receptor internalizációjának gátlásával kíséreltük meg a membrán iniciált jelátvitelt szelektíven befolyásolni.

Az általunk használt neutrofil modellben az ösztrogén szuperoxid termelést mérséklő hatásáért felelős jelátviteli útvonalat kívántuk feltérképezni, protein foszforiláción alapuló vizsgálómódszerrel.

2. Célkitűzések

Dolgozatomban az ösztrogén jelátvitelét vizsgálva az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

1. Mely kulcs géneken keresztül monitorozható az ösztrogén proliferatív hatása MCF7 sejtekben?
2. Milyen hatással van az ösztrogén, a membrán impermeábilis ösztrogén-BSA illetve a GPER agonista G1 ezen kulcs gének expressziójára?
3. Megfigyelhető e a membrán ösztrogén receptoroknál a ligand mediált internalizáció jelensége?
4. Ezen receptorok internalizációjának gátlása, hogyan hat a kiválasztott gének transzkripciójára?
5. Az ösztrogén milyen jelátviteli útvonalon csökkenti az fMLP indukálta szuperoxid produkciót neutrofil granulocitákban?

3. Módszerek

3.1. Az MCF7 sejtekkel végzett vizsgálatok során alkalmazott módszerek

3.1.2 Sejttenyésztés

Az MCF7 emlőrák sejt vonalat a Semmelweis Egyetem II.sz. Patológiai Intézet adományozta munkacsoportunknak. A sejteket a vonatkozó ATCC (American Type Culture Collection) tenyésztési protokollnak megfelelően, RPMI-1640-es (Sigma-Aldrich, Cat.No.: R8758-500ML) tápoldatban tenyésztettük, melyet 10% marha szérum albuminnal, illetve antibiotikummal (penicillin (100 E/ml) és sztreptomocinnel (100 µg/ml)) egészítettünk ki. A sejteket 37°C-os inkubátorban tenyésztettük, 5%-os CO₂ tartalmú, párasított inkubátorban. A kezeléseket megelőzően a sejteket 24 órán keresztül szérum és antibiotikum mentes tápoldatban inkubáltuk.

3.1.3. Kezelések

A kezdeti **E2-BSA**-val végzett vizsgálatok eredményeit utólag sok kritika érte, amiért sok esetben nem vették figyelembe, hogy az albuminhoz kötött ösztrogén komplex bomlékony, ezért idővel szabad ösztrogén jelenik meg az oldatban. A potenciális hiba kiküszöbölésére egy általánosan alkalmazott filtrációs technikát alkalmaztunk közvetlenül a kezeléseket megelőzően (116), illetve tömegspektrometriás vizsgálattal igazoltuk, hogy csak jelzett mennyiségű szabad ösztrogén van jelen az oldatban. Az E2-BSA-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foszfát pufferben (PBS) oldottuk fel, három különböző koncentrációjú oldatot létrehozva. A három koncentrációhoz (10⁻¹⁰M, 10⁻⁹M, 10⁻⁸M) szükséges E2-BSA mennyiség kiszámolásához a gyártó által ajánlott módszert használtuk. Ez alapján minden mol BSA-hoz 30 mol ösztrogénnel számolhatunk. A méréseket három párhuzamos ismétléssel végeztük el minden koncentráció esetében.

A **17-β-ösztradiolt** (Sigma-Aldrich) alkoholban oldottuk ugyanazon három koncentrációban (10⁻¹⁰M, 10⁻⁹M, 10⁻⁸M).

A GPER agonista **G1**-et (Tocris Bioscience, Bristol, UK), illetve az internalizáció gátló **dynasort** (Sigma-Aldrich) DMSO-ban (dimetil szulfoxid) oldottuk fel. Mindkét hatóanyag esetében a gyártó által meghatározott koncentrációt alkalmaztuk, mely a G1 esetében 10⁻⁸ M, a dynasor esetében 80 µmol volt. A dynasor oldatot 30 perccel az

ösztrogén kezelések előtt adtuk az oldathoz. Mindkét kezelés esetében három párhuzamos mérést végeztünk.

Az oldószerek hatásának kiküszöbölésére minden oldathoz hozzáadtuk valamennyi oldószert. Valamennyi kezelést három órán keresztül végeztünk, mivel microarray vizsgálatok alapján ez az időintervallum felel meg a korai transzkripciós hatások csúcsának.

Minden kezelést követően a sejteket a további feldolgozásig Trizol[®] reagensben (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, US) tároltuk -80 C°-on.

3.1.4. Expressziós vizsgálatok:

3.1.4.1. A microarray vizsgálatok meta-analízise

A microarray adatokat a Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) és az ArrayExpress (AE, <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) adatbázisából töltöttük le. Ösztrogénnel kezelt MCF7 sejtek esetében összesen 18 array adatait használtuk fel, melyek négy külön időfüggést vizsgáló cikkből származtak. Mindegyik vizsgálatban alkalmazták az általunk alkalmazotthoz közel eső, három vagy négy órás 17- β -ösztradiol kezelési periódust. A vizsgálatokban két különböző, gyakori gén chipet alkalmaztak, az Affymetrix U133 és Affymetrix U133 Plus 2.0-t. A két chip típus 22,277 közös ún. probesetet tartalmaz, melyek 13,186 génnek feleltethetőek meg. Az analízis során csak a közös gene seteket vettük figyelembe. Az nyers adatok minden esetben a GCRMA (Guanine Cytosine Robust Multi-Array Analysis) módszerrel kerültek normalizálásra.

A meta-analízishez az ún. rank product módszert alkalmaztuk. A választásunk azért erre a nonparametrikus algoritmusra esett, mert ez lehetővé teszi a különböző microarray eredmények összehasonlítását annak figyelembe vételével, hogy a numerikus intenzitás értékek jelentősen eltérhetnek a platformok és mérések között. Ez a robosztus módszer a géneket az expressziós változások rangsora alapján hasonlítja össze, jól teljesít microarray chipek esetében is. (117)

A rank product módszert R programnyelvre implementálva alkalmaztuk egy a Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>) beépülő modul adatbázisból letölthető modul, a “RankProd” átdolgozásával. A program olyan géneket azonosít, melyek

konzisztensen kiemelkednek az ismételt mérések során, függetlenül a numerikus intenzitás értékeiktől. A módszer a mért parameterhez egy ún. “feature score”-t rendel, ez alapján rangsorolja a géneket, figyelmen kívül hagyva a p-értékeket vagy a paraméter numerikus értékét. A mi esetünkben a mért paraméter az expressziós érték kettes alapú logaritmus volt. Az eredményt p-értékként kapjuk meg, mely annak a valószínűsége, hogy az adott gén véletlenül foglalja el az adott pozíciót. Az eltérően regulált géneket az ún. “prediction of false positive” (pfp) paraméter alapján választottuk ki, ami tulajdonképpen megfelel a false discovery rate-nek (FDR). (61) A pfp kiszámítása egy permutációkon alapuló eljárás. Esetünkben a permutációk száma 50 000 volt, további vizsgálatra pedig a 0,05 alatti pfp-vel rendelkező géneket választottuk ki. A GEO és az ArrayExpress adatbázisában összesen egy ösztrogén-BSA-val végzett microarray vizsgálatot találtunk, mely négy array eredményeit összesíti. A méréseket Affymetrix U133 Plus2 platformon végezték, az adatok normalizálása GCRMA módszerrel történt. Az eredmények statisztikai értékeléséhez Student-féle t-próbát használtunk, a szignifikancia szint $p < 0,05$ volt. Az útvonal analízishez a fenti módszerrel kiválasztott génlistát az IPA (Ingenuity Pathway Analyser) útvonal analízis szoftverbe importáltuk. A szoftver által azonosított útvonalak irodalomkutatása alapján választottunk ki öt olyan gént (KCNK5, KDM4B, MYC, CCND1, ERBB2), melyek a témában releváns más meta-analízisek alapján is alkalmasak az ösztrogén proliferatív hatásának monitorozására.

3.1.4.2. rtPCR mérések a E2, E2-BSA, G1 és dynasore kezelések során

Az MCF7 sejteket 25 cm²-es flaskákban tenyésztettük, az RNS izolálást átlagosan 2×10^6 -os sejtszámnál végeztük el. Az RNS tisztítás Trizol[®] Plus RNA Purification Kittel történt, a gyártó előírásainak megfelelően. Ennek során az ún. szeparációs fázisban sejteket a Trizol lízis reagenssel inkubáltuk, majd a lizátumot egy speciálisan erre tervezett RNS kötő membránt tartalmazó küvettán át centrifugáltuk, végül az eluálási fázisban a megkötött RNS-t oldószerrel centrifugálva egy erre kialakított gyűjtő edényben fogtuk fel. Az RNS tartalom NanoDrop 2000-es spektrofotométerrel került meghatározásra. Mintánként kb. 1000 ng RNS-t írtunk át cDNS-re a High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével. Az rtPCR-hoz használt próbákat a TaqMan[®] Gene Expression Assayek (Applied Biosystems) közül választottuk ki (CCND1 – Hs00765553_m1; ERBB2 – Hs01001580_m1; GAPDH –

Hs99999905_m1; CKNK5 – Hs00186652_m1; KDM4B – Hs00943636_m1; MYC – Hs00153408_m1; RPL13a – Hs04194366_g1).

A vizsgálathoz szükséges housekeeping génnek az általánosan alkalmazott GAPDH-t, illetve egy az MCF7 sejtek esetében különösen megbízhatónak ítélt gént, az RPL13A-t választottuk ki. (118) Az értékelés során az RPL13A bizonyult megbízhatóbbnak, ezért az eredmények kiszámolásakor ezt használtuk housekeeping génként.

A mérések során a TaqMan® Fast Advanced Master Mixet (Applied Biosystems) használtuk, Uracil-N glikoziláz enzim (UNG) hozzáadása nélkül. A 7500 Fast Real-Time PCR készüléket a következő paraméterekkel használtuk: 95°C 20 másodpercig, majd a 3 másodperc 95°C, 30 másodperc 60°C inkubációból álló ciklust hatvanszor ismételve történt az amplifikáció. Minden mérést három párhuzamossal végeztünk el.

Az eredmények értékeléséhez, az ún. threshold cycle (Ct) kiszámításához az SDS 1.3.1 szoftvert használtuk. Az eredmények interpretációjához a ddCT metódust alkalmaztuk. (119) A G1-el a dynasorral végzett vizsgálatok esetében Student-féle t-próbát használtunk, a szignifikancia szint $p < 0,05$ volt.

3.1.5. Képkalkotó vizsgálatok

3.1.5.1. A félvékony és ultravékony metszetek

A morfológiai vizsgálatokhoz az MCF7 sejteket 4%-os paraformaldehiddel (PFA) egy óráig fixáltuk, 0,1 M-os PB-ben, szobahőmérsékleten. További feldolgozásig a sejteket 1%-os PFA-ban, 4°C-on tároltuk. A fixált sejteket felvétel után kétszeri PBS-ben majd egyszeri 0,02 M-os glicin/PBS oldatban történt mosás után 10 percig centrifugáltuk 1000 fordulat/percen, szobahőmérsékleten. A pelleteket ezután 10 percig 37°C-os, 12%-os, PB-ben oldott zselatinnal infiltráltuk, majd öt percig centrifugáltuk 1000 fordulat/percen. A mintákat blokkokra metszés előtt 30 percig jégen tartottuk. Krioprotekció céljából a blokkokat egy éjszakán át 4°C-on 2,3 M-os szukróz oldattal infiltráltuk, majd folyékony nitrogénben tároltuk. A félvékony és ultravékony fagyasztott metszetek elkészítéséhez a Leica Ultracut S ultramicrotomot használtuk. A felvételi oldatként 1:1 arányú 2,3M-os szukróz és 1,8%-os metilcellulóz oldat keverékét használtunk. (120)

3.1.5.2. Immunfestések

A tárgylemezre rögzített, 0,7 μm vastagságú félvékony metszeteket 0,02 M-os PBS-ben oldott glicinnel inkubáltuk, majd ezekből 1% BSA tartalmú PBS-sel készítettünk blokkokat. A primer antitesteket egy éjszakán keresztül párásított kamrában alkalmaztuk 1%-os BSA-t tartalmazó puffer oldatban. A mintákat ezt követően háromszor mostuk PBS-sel. Az ER-alfa jelölés amplifikálásához másodlagos antitestként biotinilált anti-nyúl IgG-t használtunk. (1:200; Vector Laboratories Inc, Burlington, CA) Az immunfluoreszcens jelöléshez jelzett kecske anti-nyúl IgG-t alkalmaztunk. Gondos öblítés után DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) magfestést végeztünk, majd a metszeteket fedőlappal láttuk el. A megjelenítést egy Nikon Eclipse E800-as mikroszkóphoz csatlakoztatott Bio-Rad Radiance 2100 Rainbow konfokális lézer szkennelvel végeztük. A képek elkészítéséhez a Lasersharp 2000 nevű szoftvert használtuk, az utólagos fényerő és kontraszt beállításokat az Adobe Photoshop 7.0 programmal végeztük. A dupla jelölések előtt minden antitestet gondosan, több koncentrációban leteszteltünk primer antitestként, valamint minden vizsgálat során készültek negatív kontrollok, a fals pozitívítás elkerülésére.

3.2. A neutrofil granulociták vizsgálata során alkalmazott módszerek

3.2.1. Sejtszeparáció

A perifériás vérmintákat 25-65 év közötti, egészséges, gyógyszert nem szedő nőktől (n=4) illetve férfiktól (n=6) gyűjtöttük, EDTA-s (etilén-diamin-tetraecetsav) vérvételi csövekbe. A szedimentáció biztosítására a mintákat Ficollra rétegeztük, majd 63%-os, illetve 72%-os Percollon centrifugáltuk 25 percig, 300G-n, 20°C-on. A granulocita szeparációhoz kétszeri puffer oldatos mosás után 200G-s centrifugálást végeztünk. A művelet után a sejt aggregátumot néhány milliliter Hank-oldatban reszuszpendáltuk, majd Türk-oldatban meghatároztuk a sejtszámot. A beállított sejt koncentráció $10^7/\text{ml}$ volt.

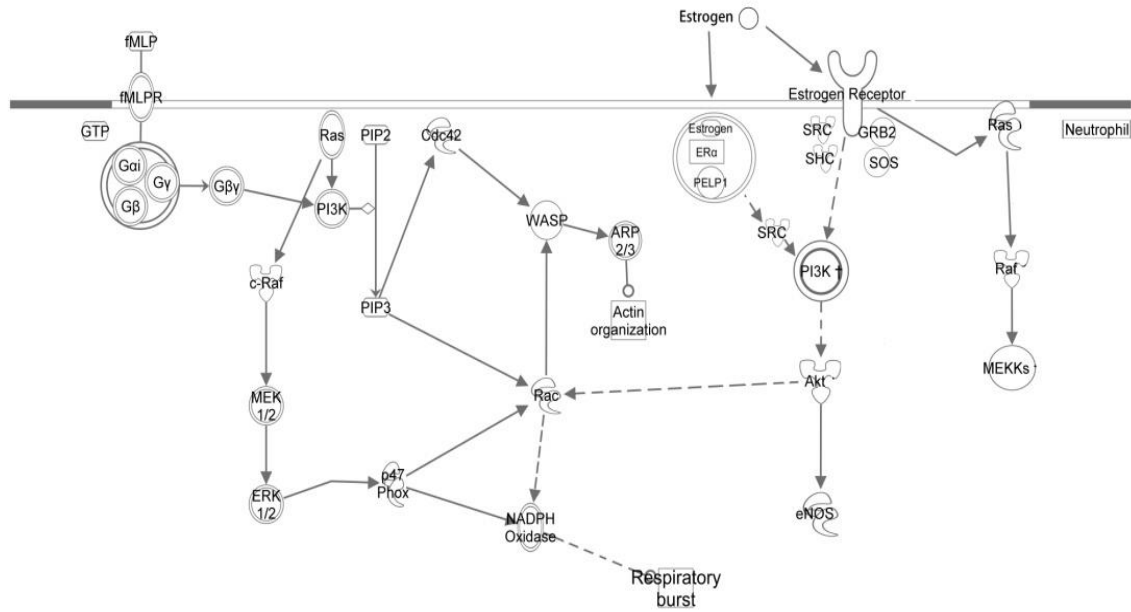
3.2.2. Protein foszforiláció és útvonal analízis

A szeparált neutrofil granulocitákat három különböző koncentrációban (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-7} M) 10 percig kezeltük 17- β -ösztradiollal. A sejtaktiváció vizsgálata során a mintákat 10 perccel korábban 10^{-6} M koncentrációjú fMLP (N-formil metionil-leucil-fenilalanin) oldattal előkezeltük. A további vizsgálatokra a sejtlizátumokat használtuk.

A neutrofilekben ösztrogén és fMLP kezelések hatására lezajló protein foszforilációs változások vizsgálatához a Human Phospho-Kinase Antibody Array Kitet használtuk, a gyártó utasításait követve. A módszer során a sejt lizátumokat egy olyan nitrocellulóz membránra rétegezzük, amin 42 különböző másodlagos hírvivő molekula ellenes, ún. “capture” antitestek találhatóak. A lizátum be nem kötött elemeinek gondos lemosását követően biotinilált, ún. “detection” antitesteket tartalmazó oldat kerül a membránra, az ezután hozzáadott Streptavidin-HRP (HRP - horseradish peroxidase vagyis tormaperoxidáz) komplex a biotin-streptavidin kötéson keresztül kapcsolódik a detekciós antitestekhez. A tormaperoxidáz enzim a hozzáadott kemilumineszcens reagens hozzáadását követően képes jelet produkálni, melynek intenzitása korrelál a megkötött protein mennyiségével. Az egyes proteinekhez tartozó pontok jelintenzitását a későbbiekben röntgen filmre rögzítve olvastuk le. Minden ilyen film tartalmazott három kezelt és egy kontroll mintát. Minden kezelés során két párhuzamos mérést végeztünk. Az intenzitás értékeket az ICY Bioimage Analyzer programmal mértük, a mérést követő utófeldolgozás során a gyártó által ajánlottaknak megfelelően háttérzaj korrekciót végeztünk, mely során a háttérintenzitást az előhívó film megadott pontjain meghatároztuk, majd ezek átlagával korrigáltuk a mérési eredményeket. Az eredmények statisztikai értékeléséhez kétmintás t-próbát használtunk, a szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nek állapítottuk meg.

Az útvonal analízishez azokat a hírvivő molekulákat választottuk ki, melyek azonos irányba mutattak szignifikáns foszforiláció változást, a három mérés közül legalább kettőben. A kiválasztott hírvivő molekulák listája a 15. ábrán került feltüntetésre. Az útvonal analízishez az Ingenuity Pathway Analyser (IPA) programot használtuk. A fehérjék listáját, illetve az ún. „core analysis” funkciót használva azonosítottuk az érintett útvonalakat. Az legerősebb érintettséget mutató útvonalak az fMLP és az ösztrogén jelátvitel elemei voltak. Ezeket irodalmi adatok, illetve a programba épített egyéb

útvonalakat is felhasználó, összekapcsoltságot is vizsgáló módszerrel, valamint a STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins; <http://string-db.org>) protein interakciós adatbázisból egészítettük ki. Az ösztrogén és az fMLP jelátvitel között azonosított kapcsolatot az 8. ábrán ábrázoltuk.



8.ábra

Az ösztrogén és az fMLP indukált szuperoxid produkció jelátviteli struktúrái

A sémás ábra bal oldalán az fMLP indukált jelátviteli útvonal látható, a jobb oldalon pedig az ösztrogén indukált másodlagos hírvívők egy része. Az azonosított funkcionális útvonal szaggatott vonallal jelöltük. A leírt útvonalban szereplő PI3K aktiváció elsősorban membrán receptor aktiválás útján valósul meg, noha egyes eredmények az intracitoplazmatikus receptorok szerepét is felvetik. (fMLP- N-formil metionil-leucil-fenilalanin, fMLPR – fMLP receptor, GTP- guanozin-trifoszfát, PI3K- foszfatidilinozitol 3-kináz, Ras – „rat sarcoma”, MEK1/2 – összekapcsolódó protein kinázok, ERK1/2 - extracelluláris receptor tirozin kináz 1/2, p47Phox - Neutrophil cytosol factor 1, PIP2/3 - Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, Cdc42- Cell division control protein 42 homolog, WASP - Wiskott–Aldrich syndrome proteins, ARP 2/3 – actin related protein 2/3, Rac - Ras-related C3 botulinum toxin substrate , SRC – „sarcoma” , SOS – Son of sevenless homolog, GRB2 - Growth factor receptor-bound protein 2, ER α – ösztrogén receptor alfa, PELP1 - Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1)

3.2.3. Az fMLP stimuláció hatására jelentkező szuperoxid produkció mérése

A baktériális eredetű, kemotaktikus hatású fMLP (N- Formylmethionine-leucyl-phenylalanine) hatására bekövetkező szuperoxid produkciót fotometriás úton mértük, a Jansson által módosított, úgynevezett Guarnieri módszerrel. (121, 122) A ferricitokróm-C redukción alapuló eljárás során a szuperoxid mennyisége egyenesen arányos az optikai denzitással. Az eredményeket tehát optikai denzitás változásként (Δ OD) kaptuk meg az öt perces mérések során.

A vizsgálat első részében a neutrofileket 10 percig 17- β -ösztradiollal (10^{-9} M) kezeltük, majd fMLPvel (10^{-6} M) stimuláltuk a sejteket. A második mérésorozatban a fenti kezelést megelőzően különböző kináz inhibitorokkal előkezeltük a sejteket. A kináz inhibitorokat minden esetben a gyártó ajánlásának megfelelő koncentrációban, DMSO-ban oldottuk, a kezelések 20 percesek voltak. A mérések összehasonlíthatósága érdekében azonos koncentrációban adtunk DMSO-t minden mintához.

Minden csoportban 5-8 párhuzamos mérést végeztünk, az eredmények interpretálásához az értékeket a kontroll százalékában adtuk meg, melyet 100%-nak tekintettünk. A statisztikai analízishez t-próbát alkalmaztunk, a szignifikancia szintet $p < 0,05$ -ben határoztuk meg. A számításokhoz a Statistica 7.0 szoftvert használtuk.

4. Eredmények

4.1. Az MCF7 sejtvonalon végzett vizsgálatok eredményei

4.1.1. A microarray adatok meta-analízise

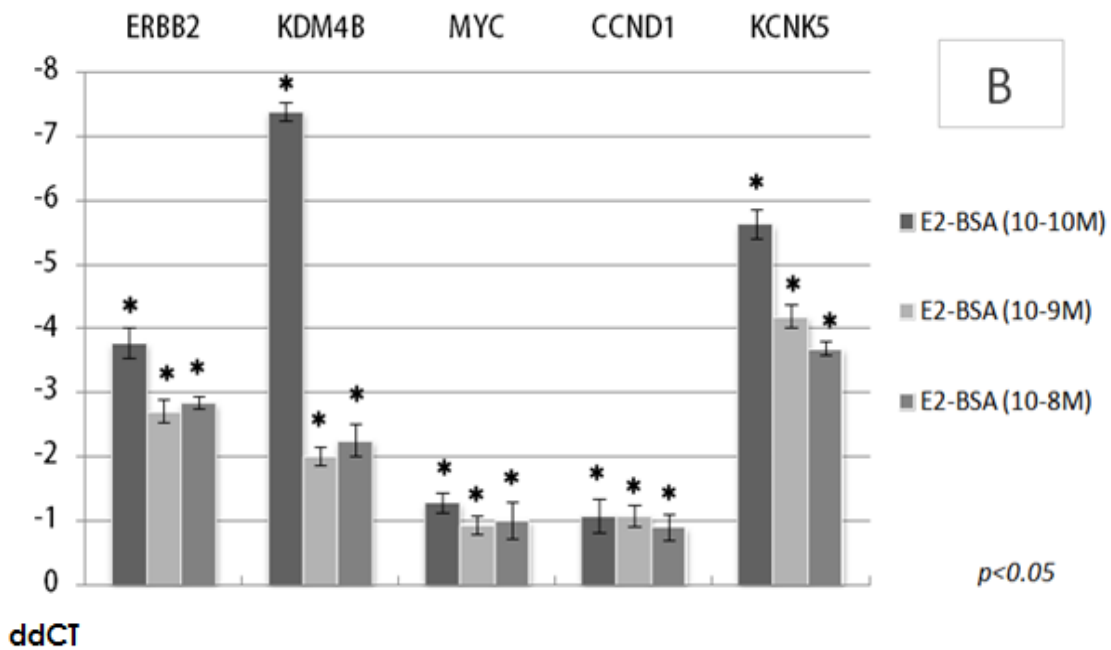
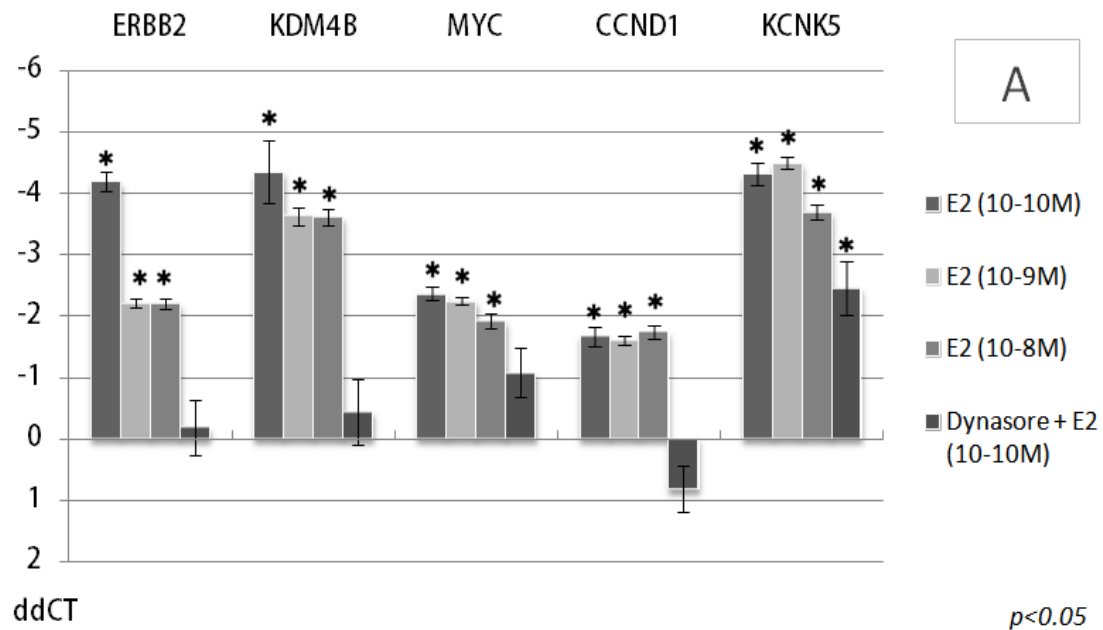
A 17- β -ösztradiol esetében három-négy órás mérési pontokat véve figyelembe a 22.277 vizsgált probe set-ből 378 felelt meg a szigorúnak mondható $p < 0,05$ kritériumnak, ezeket vizsgáltuk tovább (lásd módszerek). Ezek a probesetek 324 gént azonosítanak, melyek közül 285 mutatott expresszió növekedést, 49 pedig csökkenést. A három órás membrán impermeabilis ösztrogén-BSA-val végzett kezelések eredményeinek analízise során összesen 586 gén mutatott szignifikáns expressziós változást, nagyrészt átfedő módon.

A 17- β -ösztradiollal kapcsolatos eredmények alapján végzett útvonal analízis és irodalmi adatok segítségével öt gén (KCNK5, KDM4B, MYC, CCND1, ERBB2) került kiválasztásra, melyeket az ösztrogén proliferatív hatásának monitorozására használtunk fel. E gének közül a 17- β -ösztradiol kezelést követően a KCNK5, a KDM4B, a MYC és a CCND1 szignifikáns expresszió növekedést mutattott, míg a ERBB2-nél nem szignifikáns expresszió csökkenést mutattak a microarray vizsgálatok.

Az E2-BSA esetében a kiválasztott gének közül a MYC, a KDM4B és a KCNK5 az ösztrogén kezeléshez hasonlóan szignifikáns expresszió növekedést mutatott, az ERBB2 expressziója az ösztrogén kezeléshez hasonlóan csökkent. A CCND1 expresszió növekedése bár tendenciaszerűen megfigyelhető volt, nem bizonyult szignifikánsnak. Az egyes gének szerepéről a megbeszélésben lesz szó.

4.2.2. A génexpressziós változások validálása ösztrogén, ösztrogén-BSA és G1 kezelések után rtPCR-rel

A polimeráz láncreakción alapuló mérések során az ösztrogén kezelések után a kiválasztott gének mindegyike szignifikáns transzkripció növekedést mutatott (9. ábra), megerősítve a microarray vizsgálatok előzetes eredményét. A membrán szelektív agonista ösztrogén-BSA kezelés szintén valamennyi gén esetében szignifikáns expresszió növekedést eredményezett, mely hatás összemérhető volt az ösztrogén stimulációnál tapasztaltakkal, sőt, két gén esetében még meg is haladta azt. (9. ábra)

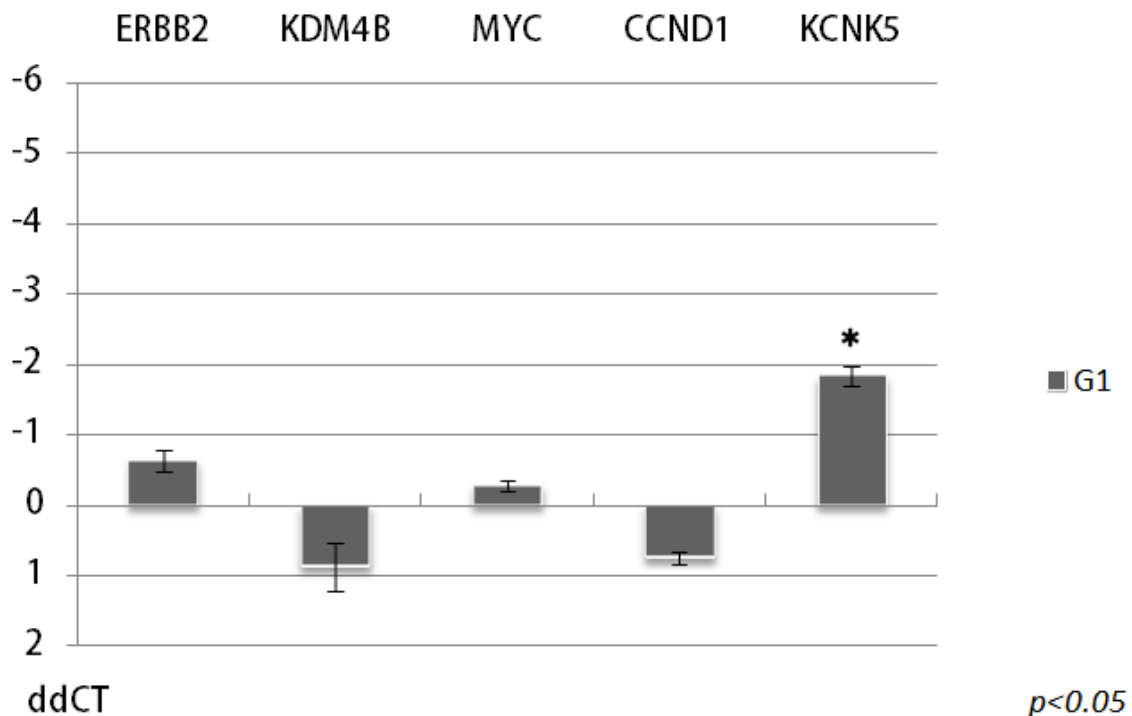


9. ábra

Génexpresszió változások 17β -ösztradiol, illetve ösztrogén-BSA kezelést követően
 A CCND1, ERBB2, KCNK5, KDM4B és MYC gének expresszió változása három különböző koncentrációjú (10^{-10}M , 10^{-9}M , 10^{-8}M) 17β -ösztradiol (A), illetve ösztrogén-BSA (B) kezelést követően. Az első diagramon az ösztrogén kezelés hatás 30 perces dinamikus gátló dynasore előkezelést követően is fel van tüntetve. A diagramon az Y-tengely

a ddCT értékeket jelöli, ahol a nulla érték reprezentálja a kontroll csoportot. A hibavonalak a standard deviációt mutatják, a csillag pedig a szignifikáns expressziós változásokat jelöli ($p < 0,05$).

A membrán receptor internalizációt a dinamin gátláson keresztül gátló dynasore előkezelés az ösztrogén transzkripcionális hatását igen jelentősen csökkentette, mely így csak a KCNK5 esetében bizonyult szignifikánsnak, és ez az expressziós válasz is szignifikánsan enyhébb volt, mint az ösztrogén esetében ($p < 0,05$). (9. ábra, A).



10. ábra

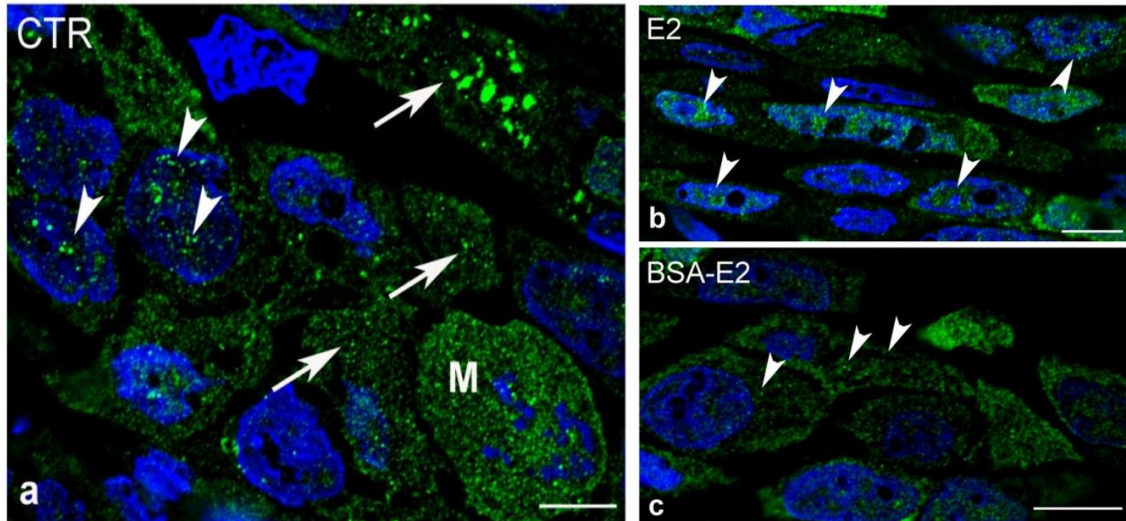
A kiválasztott gének expressziós változása szelektív GPER agonista G1 kezelés hatására

A G1 kezelés indukált expressziós változás messze elmaradt a 17β -ösztradiol és ösztrogén-BSA kezeléseknél tapasztaltakhoz képest. A hibavonalak itt is a standard deviációt mutatják. A G1 kezelés hatására csak a csillaggal jelölt KCNK5 mutatott szignifikáns expressziós változást ($p < 0,05$).

Hogy az mER α jelátvitellel párhuzamosan jelen lévő GPER hatást is külön vizsgálhassuk, elvégeztük a méréseket a GPER receptor szelektív agonistájával, G1-el is. Ez a kezelés csak mérsékelt expressziós változásokat eredményezett, mely csak a KCNK5 esetében bizonyult szignifikánsnak (10. ábra).

4.2.3. Képképző vizsgálatok

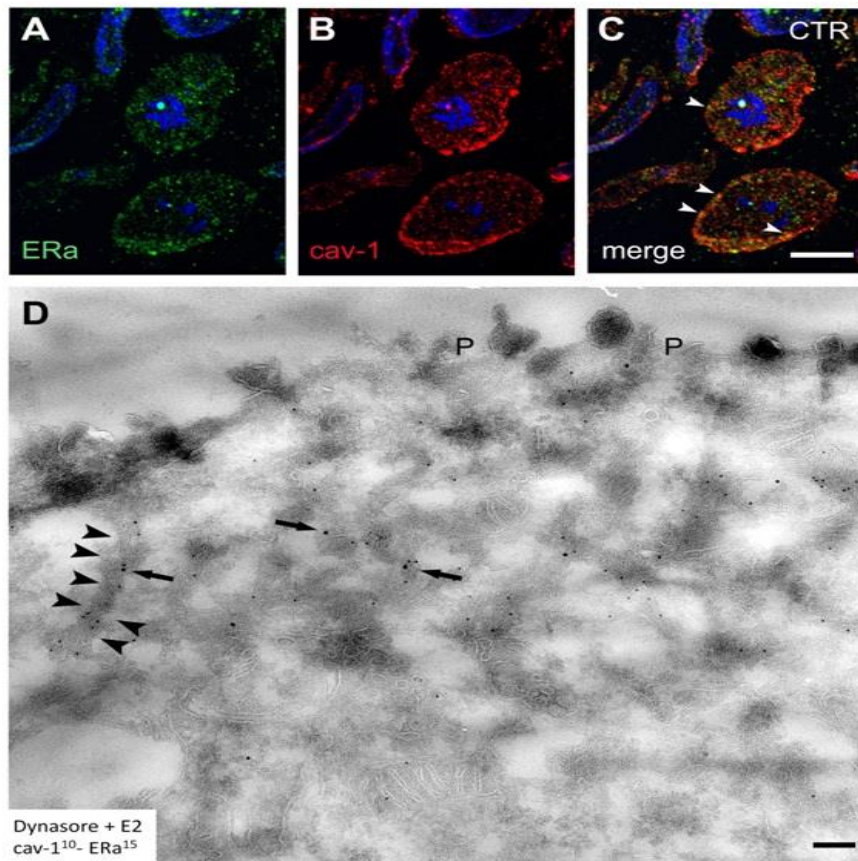
Az ER α sejteken belüli eloszlását fluoreszcens jelöléssel vizsgáltuk. A kezeléseket megelőzően vizsgált MCF7 sejteknél mind citoplazmatikusan, mind a sejtmagon belül jelentős ER α szignált detektáltunk, enyhe plazmamembrán festődés mellett (11. ábra, CTR). Ösztrogén kezelés hatására a receptorok jelentős része a sejtmagba vándorolt, míg az ösztrogén-BSA kezelés hatására az ER α jel továbbra is döntően a citoplazmában, illetve a kontrollhoz mérten kevésbé a plazma membrán környezetében volt detektálható. (11. ábra, E2, BSA-E2)



11. ábra

ER- α jelölés a kezelt és a kontroll csoport félvékony, fagyasztott metszetein

A kezeletlen MCF7 sejtek esetében (A) az ER- α jelölés ponttátumok/aggregátumok formájában mind a magban (nyilak) mind a citoplazmában megjelent. (Az M-mel jelölt mitotikus sejtben intenzív ER- α festődést láthatunk.) Az ösztrogén kezelés után (B) a receptorok főként a sejtmagban mutatkoztak (nyilak), míg az ösztrogén-BSA kezelést követően a citoplazmában, illetve a kontrollhoz képest kevésbé kifejezetten a sejt membrán közelében (nyilak). (A képekhez a sejtmagokat DAPI-val festettük. A jobb alsó sarokban feltüntetett vonal 10 μm -nek felel meg; CTR - kontroll, E2 – ösztradiollal kezelt sejtek, BSA-E2 - ösztrogén-szarvasmarhaszérum-albumin komplexszel kezelt sejtek)



12. ábra

A dynasore és ösztrogén kezelés indukálta morfológiai változások MCF7 sejtekben

A felvékony fagyasztott metszeteken ER- α (zöld) és kaveolin-1 (vörös) ellenes jelzett antitest jelölést alkalmaztunk. **A-C:** az ER- α jelölés a citoplazmában, illetve a plazma membránban jelent meg elsősorban, a sejtmagban csak gyengébb jelintenzitást tapasztaltunk. Az egyesített felvételeken (C) az ER- α és kaveolin-1 kettős jelölés átfedő festődést mutatott a plazma membránban (fehér nyilak), illetve a citoplazmában is. (A feltüntetett léptékvonal $10\mu\text{m}$ -nek felel meg, a sejtmagokat ez esetben is DAPI-val festettük.) **D:** az ultravékony metszeteken megfigyelhető deformált, megnyúlt kaveolák (nyilak) a lefűződést gátló dynasore kezelés eredményei. Az ER- α jelöléshez használt nagyobb arany részecskék a plazma membránban (P), a kaveolin-1 pozitív struktúrák közvetlen közelében figyelhetőek meg. A mélyebb citoplazmatikus területek ugyanakkor nem mutattak sem ER- α (nagyobb jelölésű) sem kaveolin-1 (kisebb arany jelölésű) pozitivitást, ami megerősíti a dynasore kezelés hatásosságát. (A feltüntetett vonal 200nm -nek felel meg.)

A fentiekén túl a dynasor előkezelést követő ösztrogén stimuláció morfológiai hatásait is vizsgáltuk. Az immun-elektronmiskroszkópiás vizsgálat során az ER α jelölés deformálódott, megnyúlt kaveolákban jelent meg. Dynasor hatására más vizsgálatok is hasonló membrán struktúrák létrejöttét igazolták, mely minden bizonnyal a dinamin a vezikula hasításban betöltött szerepének kiesése miatt megy végbe. A mélyebb citoplazmatikus területekben nem tapasztaltunk kaveolin-1 pozitív struktúrákat, mely pedig az endocitózis zavarát igazolja. (12. ábra, D).

4.2. A neutrofilekkel végzett vizsgálatok eredményei

4.2.1. A protein foszforilációs vizsgálatok eredményei

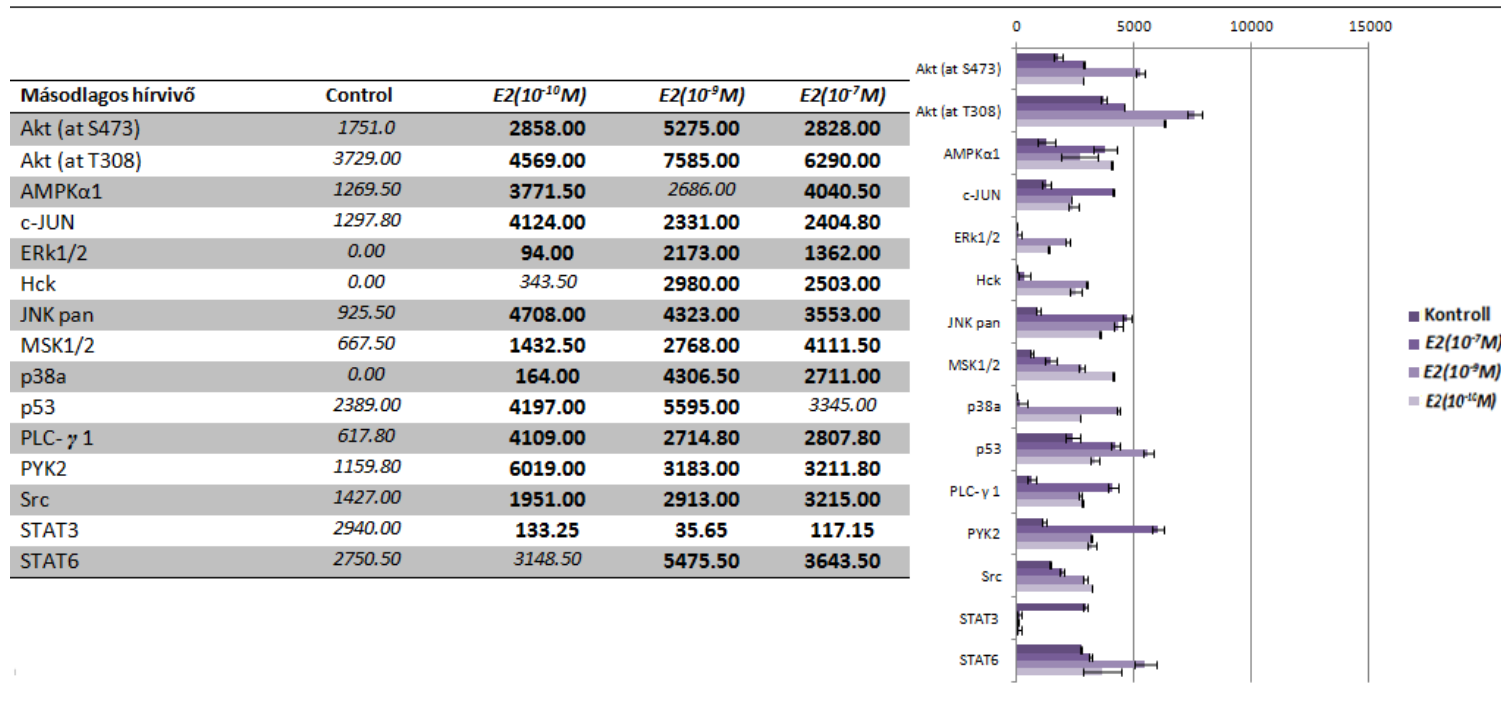
A mérések során 43 különböző másodlagos hírvivő molekula foszforiláltsági szintjét monitoroztuk ösztrogén és/vagy fMLP kezelést követően.

Az ösztrogén kezeléseket három különböző koncentrációban végeztük el. Az útvonal elemzés során azonosított változások döntően az ösztrogén jelátvitelben ismert jelentős fehérjéket érintettek. Valamennyi szignifikáns foszforilációs változás szorosan köthető volt az ismert ösztrogén jelátviteli utakhoz. (AMPK α 1 (123, 124), Pyk2 (125), Plc- γ 1(126), STAT3(127), Erk1/2 and JNKs (128), p38 (129), MSK1/2 (130))

Noha a protein foszforilációs készlet csak az fMLP jelátvitelének egy kisebb hányadát vizsgálja, az fMLP-vel is végeztünk méréseket, a beállítás validálására. A kezelés során valamennyi változás megfelelt a várt eredménynek, a foszforilációs változások jól megfeleltethetőek voltak az fMLP ismert útvonalának. (131-133)

A kombinált ösztrogén és fMLP kezelése során tapasztalt foszforilációs változások megfeleltek a két kezelés szummációs képének, noha az ösztrogén indukált változások egy része nem érte el a szignifikancia határát. Az ösztrogén kezeléshez képest öt hírvivő molekula mutatott szignifikáns eltérést, melyek az fMLP jelátvitelhez köthetőek (GSK3, HSP60, PDGFR β , mTOR). A GSK3, a HSP60 és az mTOR egyértelműen az fMLP kezelés eredményei lehetnek, míg a vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor béta (PDGFR β) mint kemotaktikus receptor már leírt (134), ám az fMLP esetében a szerepe tisztázatlan. A vizsgálatok eredményei az 13. ábrán kerültek feltüntetésre.

A



13/A) ábra

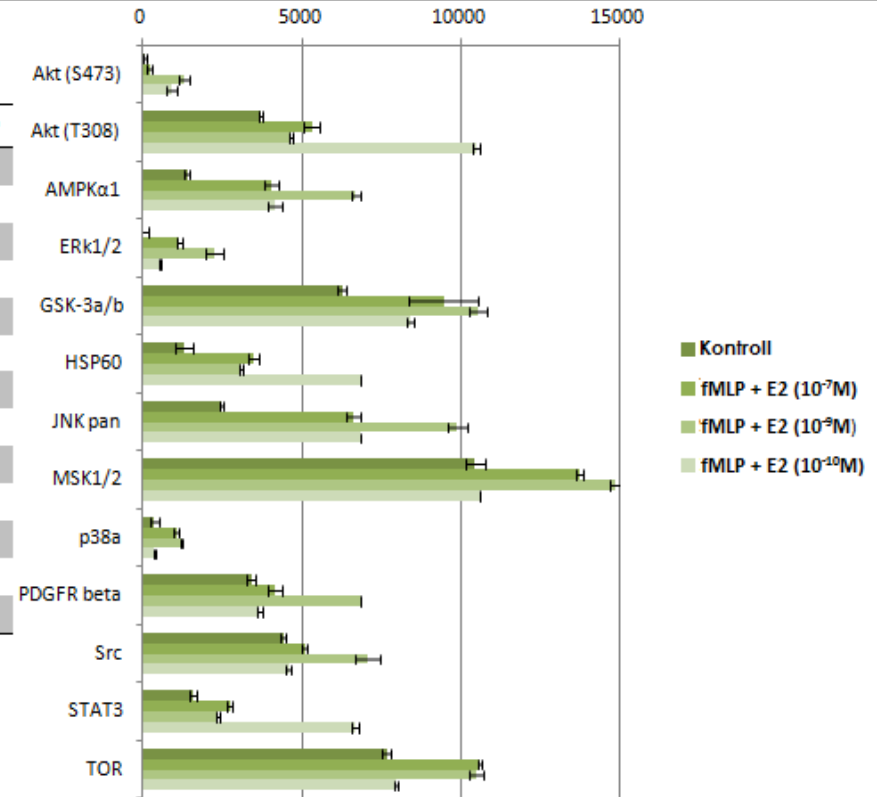
A neutrofil granulociták ösztrogén és fMLP kezelését követően mért foszforilációs változások

Az „A” táblázatban a 17β-ösztradiol kezeléseket követően mért fehérje foszforilációkkal arányos intenzitás értékek átlagai láthatóak, a jobb oldalon pedig ugyanez színes oszlop diagrammon. Az felsorolt hírvivő molekulákat a módszerek részben taglaltak szerint határoztuk meg.

A táblázatban vastagon szedett értékek bizonyultak szignifikáns változásnak a kontrollhoz képest.

B

Másodlagos hírvivő	Kontroll	E2+fmlp($10^{-10}M$)	E2+fmlp($10^{-9}M$)	E2+fmlp($10^{-7}M$)
Akt (S473)	65.5	218.5	1305.3	909.3
Akt (T308)	3712.8	5302	4639.5	10491.25
AMPK α 1	1384.5	4019	6694.8	4147.3
ERk1/2	0	1139	2253.3	538.3
GSK-3a/b	6275.5	9446	10553.8	8411.3
HSP60	1300.3	3495	3095.5	6852.25
JNK pan	2460.5	6631	9875.8	6837.8
MSK1/2	10443.5	13723	14841.8	10582.8
p38a	357	1054	1221.8	363.8
PDGFR beta	3408.5	4139	6826.3	3667.80
Src	4413	5076	7055.8	4581.8
STAT3	1585.3	2727	2367.5	6645.75
TOR	7652.5	10579.5	10497.3	7956.3



13/B) ábra

A neutrofil granulociták ösztrogén és fMLP kezelését követően mért foszforilációs változások

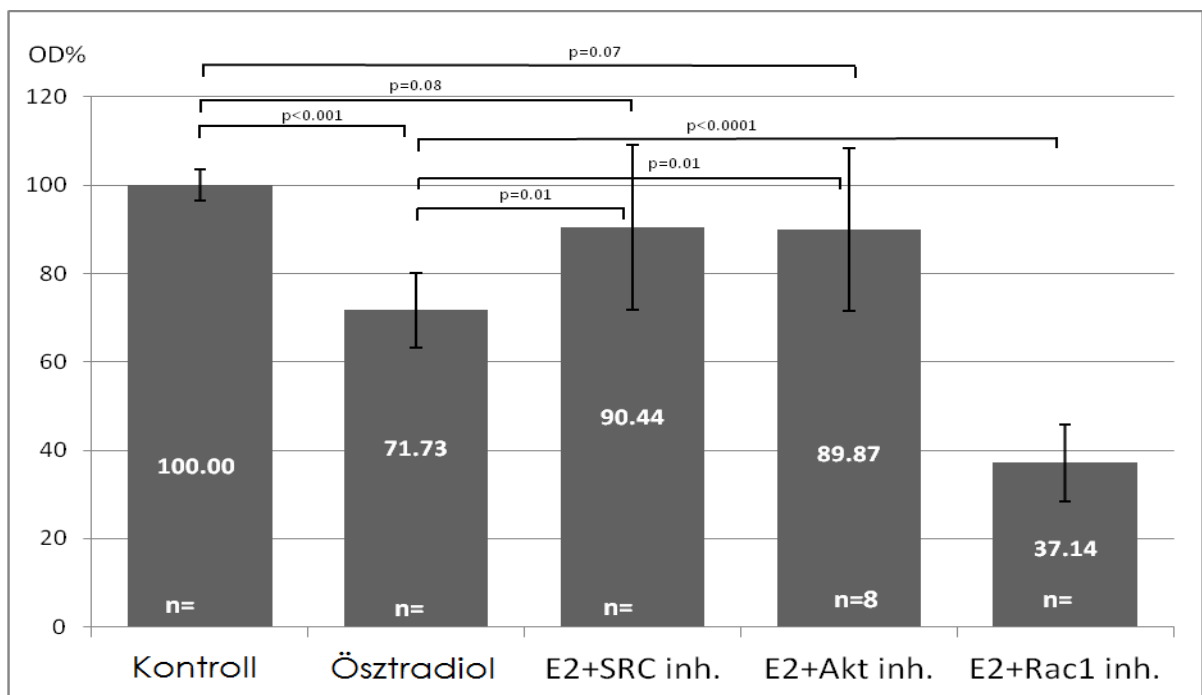
A „B” táblázatban a 17β -ösztadiol és fMLP kezelések eredményei láthatóak.

4.2.2. Szuperoxid produkció és a különböző kináz inhibitorok hatása

Ahogy azt mások (135) és saját munkacsoportunk (136) is igazolta korábban, 17- β -ösztradiol kezelés hatására csökken a neutrofil granulociták fMLP stimulációt követő szuperoxid produkciója. Jelen vizsgálatunk során az fMLP indukált szuperoxid produkciót az ösztrogén hatásának monitorozására használtuk. Az útvonal elemzés során azonosított jelátviteli út egyes elemeinek szelektív gátlószereit használva követtük nyomon, mennyiben valósul meg az elvárt ösztrogén hatás. (14. ábra)

Az Akt és Src inhibitorok szignifikánsan növelték a szuperoxid szintet, mintegy antagonizálva az ösztrogén szuperoxid-szint csökkentő hatását.

A Rac1 inhibitor hatására a szuperoxid szint szignifikánsan csökkent. Mivel a Rac1 a NADPH oxidáz komplex (NOX) felépülésében és aktivációjában is részt vesz, ez az eredmény megfelelt az előzetes várakozásoknak, s egyben tovább hangsúlyozza a Rac1 jelentőségét a NADPH oxidáz enzim szabályozásában.



14. ábra

Az ösztrogén kezelés, illetve az együttesen alkalmazott gátlószerek hatása a szuperoxid produkcióra

5. Megbeszélés

5.1. Az emlőráksejtekkel végzett vizsgálat megbeszélése

A különböző szövetek vizsgálata során az ösztrogén receptorok három altípusát ($ER\alpha$, $ER\beta$ and GPER), illetve ezek különböző izoformáit azonosították, melyek úgy genomiális, mint azonnali hatásokat közvetíthetnek. A receptorok elhelyezkedésük alapján lehetnek mind citoplazmatikus/nukleáris, mind membrán asszociáltak. Az előbbieket döntően a klasszikus úton, a DNS ún. hormon rezponzív elemeihez kötődve befolyásolják a géntranszkripciót, utóbbiak pedig másodlagos hírvívőkön keresztül képesek azonnali és transzkripcionális hatások közvetítésére. Az emlőráksejtek proliferációjában úgy tűnik mindkét receptor populációnak szerepe van. (137) Az elmúlt néhány évtizedben vált ismertté, hogy bizonyos gének esetében membrán ösztrogén receptor aktiváció során a magreceptorával összevethető mértékű transzkripciós választ lehet megfigyelni. (37) Ahogy az is bizonyított, hogy MCF7 sejtvonalak tenyésztése során membrán szelektív ösztrogén származékok hatására hasonló proliferációs választ lehet megfigyelni, mint ösztrogén kezelés mellett.

Vizsgálatunkban azt kívántuk feltárni, hogy milyen mértékben járulhatnak hozzá az ösztrogén membrán receptorok az MCF7 sejtek proliferáció szabályozásához, illetve hogy mennyiben érhetőek tetten a transzkripció szintjén a membrán receptorok jelátviteli sajátosságai, különös tekintettel a receptorok internalizációjára.

A vizsgálat első lépéseként a membrán kötött ösztrogén receptor populációk transzkripcionális hatásait hasonlítottuk az ösztrogénéhez. A nyilvános adatbázisokban elérhető valamennyi vonatkozó microarray vizsgálat meta-analízise, illetve irodalmi adatok alapján azonosítottuk az ösztrogén proliferatív hatásának közvetítésében, monitorozásában kulcsszerepet játszó géneket. Az analízis során azonosított gének expresszióját ösztrogén, illetve két membrán szelektív ösztrogén agonista kezelést követően valós idejű PCR segítségével határoztuk meg. Az ezzel párhuzamosan végzett fény- és elektron mikroszkópos morfológiai vizsgálatok során monitoroztuk az $ER\alpha$ sejten belüli elhelyezkedését a receptor endocitózis gátlásával és anélkül. A morfológiai aspektus mellett az endocitózis gátlásának génexpresszióra kifejtett hatását is vizsgáltuk.

A **microarray** vizsgálatok meta-analízise során az irodalmi adatoknak megfelelő mértékű és jellegű transzkripciós választ azonosítottunk. Külön említésre érdemes, hogy

a membrán szelektív ösztrogén-BSA stimulációt követően igen jelentős, az ösztrogén által indukált gének 20%-át érintő szignifikáns expresszió változást mértünk. Az expressziós adatok kiértékelése és útvonal analízise során validálásra, valamint a továbbiakban az ösztrogén proliferatív hatásának monitorizálására öt gént választottunk ki (KDM4B, MYC, KCNK5, CCND1, ERBB2). Az egyes gének jelentősége eltérő. Míg a KDM4B, MYC, CCND1 és ERBB2 gének szerepe egyértelműen köthető a proliferáció szabályozáshoz, a KCNK5 inkább markerként értelmezhető, bár egyes eredmények szerint oki szerepe is lehet az emlőrákok proliferációs kontroll alól történő kiszabadulásában.

A **KDM4B** gén egy hiszton metil-transzferáz, demetiláz enzimet kódol (lizin-specifikus demetiláz 4B), melynek deregulációja több daganattípusban igazolódott. Emlőrákok esetében tudott, hogy a KDM4B számos más, az ösztrogén hatás közvetítésében szerepet játszó gén (köztük az ösztrogén receptorok) transzkripciójában szerepet játszik, ún. mester regulátornak tekinthető. Depléciója mérsékli az emlőrák proliferációját mind in vivo, mind in vitro körülmények között. (138) Colorectalis daganatoknál e gén a mitokondriális apoptózis gátlásán keresztül segíti a daganatsejtek túlélését, ovarium karcinómákban pedig a hipoxia indukált apoptózis gátlásán keresztül a tumor áttétképzési tendenciáját növeli, segíti a tumorsejtek túlélését. (139, 140)

Az általunk vizsgált modellben mind a 17- β -ösztrodiol, mind a membrán specifikus ösztrogén agonista E2-BSA kezelés hatására szignifikáns expressziós növekedést tapasztaltunk. Külön említésre érdemes, hogy a kezelés hatása a legalacsonyabb koncentrációban még meg is haladta az ösztrogén indukálta transzkripció növekedést.

A **MYC**, másnéven c-myc egy ismert protoonkogén. Ennek legismertebb modellje talán a Burkitt limfómák esetén leírt funkció. A Burkitt limfómák 85%-áért a t(8;14)(q24;q32)-es transzlokáció felelős, mely a MYC gén diszregulációján keresztül serkenti a tumorsejtek növekedését. A MYC szerepét a daganatos betegségek több mint felében igazolták, így napjainkra a célzott daganatterápiás kezelések egyik fontos célpontja. (141) A MYC onkogén családba három gén tartozik: C-MYC, MYCN és MYCL, melyek a c-Myc, N-Myc és L-Myc onkoproteinek kódolják. A család tagjai az úgynevezett „szuper transzkripciós faktorok” közé tartoznak, melyek a teljes genom 15%-ának transzkripcióját szabályozhatják. A MYC onkogének számos sejtfunkció regulálásában vesznek részt, melyek közül kiemelkedik a proliferáció, a differenciáció, a sejt túlélés

szabályozása. Emlőrákok esetében a MYC expresszió növekedése a daganat kiújulásának, és agresszivitásának fontos markerének bizonyult. (142-146)

A **CCND1** gén Ciklin D1 nevű proteint kódolja, mely a többi ciklin fehérjéhez hasonlóan ciklin dependens kinázokon keresztül befolyásolja a sejtciklus szabályozást. A Ciklin D1 a retinoblastoma proteint inaktíváló holoenzim regulátoros alegységeként funkcionál, fehérje inaktíválásán keresztül promótálja a G1-S átmenetet a sejtciklusszabályozás során. A Ciklin D1 szerepét a tumor formációban először mellékpajzsmirigy adenomák esetében mutatták ki, ahol a gén transzpozíciója bizonyítottan oki szerepet játszik a mellékpajzsmirigy adenomák egy részének kialakulásában.(147, 148) Mára a gén felülexpresszáldásának szerepét több daganattípus esetében is igazolták. Ennek magyarázata részben az, hogy Ciklin D1 túl a ciklin dependens kinázokon keresztüli sejtciklus szabályozó szerepén, különböző transzkripciós faktorokon és regulátor fehérjéken keresztül egyéb szabályozó folyamatokban is részt vesz. (149) Az emlőrákok esetében a gén amplifikálódásának, felülexpresszáldásának különösen nagy jelentőséget tulajdonítanak, hiszen a Ciklin D1 felülexpressziója az emlődaganatok kb. 50%-ában megfigyelhető, a gén amplifikációja pedig önálló negatív prognosztikai faktornak bizonyult ezen daganatoknál. Az ösztrogén proliferatív hatásának közvetítésében szintén jelentősnek mondható ez a géntermék, hiszen nem csak azt igazolták, hogy a Ciklin D1-et felülexpresszáldó emlődaganatok prognózisa rosszabb, de azt is, hogy e daganatok tamoxifen érzékenysége nagyobb. (150-152) A fentiek miatt egyébként több közlemény is javasolta már a CCND1-et, mint a klinikai prognosztikus biomarkert. (153)

A **KCNK5** gén a kálium ion csatornák K alcsaládjának 5-ös számú tagját kódolja. Ez a kálium csatorna a distalis kanyarulat csatornában felel a kálium transzportért. Felülexpressziója azért különösen érdekes, mert ez volt az egyetlen olyan vizsgált gén, mely G1 kezelés hatására is szignifikáns expresszió növekedést mutatott. Ismert, hogy MCF7 sejtekben a gén promoter régiójában található funkcionálisan aktív ösztrogén reszponzív ún. ERE szekvencia, vagyis a gén ösztrogén reguláció alatt áll. A mi vizsgálati eredményeink azt igazolják, hogy a gén mind az mER mind GPER felől indukálható. A gén által kódolt K-csatorna emlőráksejtek proliferációjában betöltött szerepe nem tisztázott. Egyes eredmények a géntermék patofiziológiai szerepét igazolják (154), más vizsgálatok inkább a KCNK5 más génekkel való koregulációja miatt inkább egyfajta markerként értelmezik. (155, 156)

Az **ERBB2** expressziós vizsgálat nem igazolta a microarray meta-analízis eredményeit, hiszen a várt expresszió növekedés helyett - nem szignifikáns - expresszió csökkenést tapasztaltuk. Ennek oka valószínűleg a gén komplex regulációjában rejlik. Hurtado és munkatársai igazolták, hogy az ERBB2, vagyis az ösztrogén receptor transzkripcióját egy sor transzkripciós faktor és kofaktor kölcsönhatása határozza meg. Eredményeiket azóta többen is megerősítették, így a tapasztalt transzkripció csökkenés már értelmezhető. (157-159)

A részletezett kiválasztási eljárás során azonosított génekkel kapcsolatban fontos elvárás volt, hogy más vizsgálatok is megerősítsék alkalmazhatóságukat. Ennek a kiválasztott gének mindegyike megfelel. Egy nagy, az ösztrogén transzkripcionális hatásait vizsgáló, microarray adatokat összesítő elemzés például a MYC, a CCND1 és az ERBB2 géneket a hálózat fontos csomópontjaként, ún. hubjaként azonosította, mely eredményt más közlemények is alátámasztanak. (61) (154, 160, 161)

A **qRT-PCR mérések** megerősítették a microarray adatelemzés során nyert előzetes eredményeket. A különböző ösztrogén agonistákkal végzett kezelések során e méréseket az ösztrogén indukálta proliferatív hatás monitorozására használtuk fel. Az emlőrák sejtvonal ösztrogén-BSA kezelése az ERBB2 kivételével szignifikáns, a 17 β -ösztradiollal összemérhető mértékű expressziós növekedést eredményezett valamennyi gén esetében (KDM4B, MYC, KCNK5, CCND1). E géneken keresztül következtetve a proliferatív hatás mértékére elmondható, hogy a membrán specifikus agonista kezelés az ösztrogén kezeléshez hasonló mértékű proliferatív választ indukált. Mivel a vizsgálatot két különböző receptor szelektivitású ösztrogén agonistával is elvégeztük, következtetni tudunk a két receptor szerepére az említett hatás közvetítésében. Noha a G-protein kapcsolt ösztrogén receptornak számos azonnali és transzkripcionális hatást tulajdonítanak, saját eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a GPER szerepe a proliferáció szabályozásában kevésbé jelentős vagy eltérő az mER-étől.

A fenti eredmények birtokában különösen érdekes kérdésre vált munkacsoportunk számára annak vizsgálata, hogy vajon a membrán receptorok jelentősnek tűnő expressziós hatása úgymond leválasztható-e a magreceptorok iniciálta hatásokról. Kihasználható-e például a két receptor populáció eltérő szabályozása? Modellünkben a

membrán receptorok internalizációját gátolva vizsgáltuk, milyen hatással van e gátlás az ösztrogén proliferatív hatásának közvetítésére.

Ugyan a caveolákban elhelyezkedő receptorokról általánosságban ismert, hogy ligand mediált internalizációra képesek, az mER esetében ezt még nem vizsgálták. Az általunk készített immunfluoreszcens és elektronmikroszkópos felvételek alapján a fenti elképzelést sikerült igazolnunk. A **morfológiai vizsgálatok** során igazolást nyert, hogy az mER ligand mediált internalizációt szenved el, melyet a dynasor hatékonyan gátol. A dynasor hatása a dinamin nevű fehérje gátlásán keresztül valósul meg, mely egy a lipid raft organizációban, membrán vezikulák lefűződésében részt vevő, azok hasítását végző enzim. Az enzim gátlása során kialakuló lefűződési zavar saját vizsgálatunkban is megfigyelhető volt. Jól láthatóak a megnyúlt, eltorzult ER α pozitív caveolák, melyek a membránok közelében akkumulálódtak. (162)

A dinamin gátlása a morfológiai eltérések mellett egyes esetekben a membrán receptorok jelátvitelét hatékonyan gátolja, vélhetően a membrán receptor komplex létrejöttét akadályozva. (163-165) Ez a hatás nyomonkövethető volt saját méréseink során, amennyiben a dynasore előkezelés valamennyi vizsgált gén expresszióját szignifikánsan csökkentette, vagyis a proliferatív szignált blokkolta (11. ábra, A). Nem csak azt sikerült hát igazolnunk, hogy a kaveolin pozitív lipid raftokban elhelyezkedő mER internalizációja dinamin gátlás mellett megghiúsul, az is elmondható, hogy ezzel párhuzamosan a közvetített transzkripcionális hatás is jelentősen elmarad. A jelenséget a membránban található receptor komplex diszfunkciója okozhatja, amiben a dynasornak a dinamin gátláson keresztül (165), vagy attól függetlenül (164) is szerepe lehet.

E jelenség azonban meggyőződésünk szerint csak egy a lehetséges támadáspontokból, melyeken keresztül az ösztrogén hatás a receptorok szintjén befolyásolható.

A membrán- és magreceptorok párhuzamossága önmagában is igen érdekes jelenség, egyfajta kooperációt sejtet a két útvonal között. Wheeling és munkatársai az aldosteron azonnali hatásait vizsgálva írták le az ún. "two-step-model"-t, melyben az aldosteron azonnali hatásai mintegy facilitálják, erősítik a hormon genomikai hatásait. (166) Saját vizsgálatunk eredménye hasonló, az ösztrogén membrán receptorok itt is pozitív feedback hatást gyakoroltak az ösztrogén jelátvitelben fontos kulcsgénekre. Az ez által megvalósuló szabályozási mechanizmus tehát szintén értelmezhető hasonlóan.

A receptorok ligand mediált internalizációra képesek, így alkalmasak arra, hogy dózisfüggően közvetítsék az ösztrogén hatását, s egyfajta túlstimuláció elleni védelemként szolgáljanak. A ligand mediált internalizáció által működtetett hasonló mechanizmus, az ún. bistabil protein kináz rendszer számos receptor esetében leírt jelenség, szerepe tehát joggal vethető fel esetünkben is. (167)

A feltételezést némileg alátámasztják a qRT-PCR eredmények is, noha messze nem tekinthetők bizonyító erejűnek. A membrán receptorok túlstimulációja során észlelt fordított dózisfüggés, vagyis az emelkedő dózisokra adott gyengébb expressziós válasz lehet a ligand mediált internalizáció következménye, de ez vizsgálatunkkal nem igazolható.

Az ösztrogén jelátvitelének feltárt sajátosságai több **klinikai területen** is kihasználhatóak lehetnek.

Az **emlőrák** diagnosztikájában jelenleg rutinszerűen nem történik membrán receptor meghatározás. A sajátunk mellett egyéb eredmények is alátámasztják ugyanakkor, hogy a membrán receptorok szerepe meghatározó lehet bizonyos daganatok esetén. A membrán receptorok szerepét hangsúlyozza például, hogy a magas membrán receptor expresszió rossz prognosztikai faktor, korrelációt mutat az Akt foszforilációval és a HER-2 túlexpresszióval. (168) Egy másik vizsgálatban emlőrák biopszia során nyert sejtekben vizsgálták a membrán lokalizált ösztrogén receptorokat, és azt találták, hogy szemben a normális szöveteknél tapasztaltakkal, a tumoros mintából származó receptorok jóval magasabb aktiváltsági állapotot mutattak. (Az aktivációt a receptor 118-as szerin foszforilációján keresztül mérték.) Az ugyanazon mintákból meghatározott ERK/MAPK és AKT kinázok is hiperaktivált állapotot mutattak, ami jelentős anti-apoptotikus hatásként foglалható össze. A receptor státusz meghatározásának potenciális hasznát sejteti az is, hogy egy primer ductalis carcinomakkal foglalkozó vizsgálatban a 219 minta ösztrogén receptor negatívnak ítélt hányada 34%-ban mutatott membrán receptor pozitivitást. (168) A fenti eredmények alapján a membrán receptorok magas aktiváltsági állapota az invazív carcinoma stádium markere lehet (21, 169, 170) Az irodalmi adatokhoz hasonlóan tehát saját vizsgálatunk is alátámasztja a membrán receptorok szerepét az emlőráksejtek szabályozásában, így joggal vetődik fel a kérdés, hogy például a membrán receptor aktivitás és státusz meghatározásával nem lehetne e jobb hatékonyságot elérni az anti-ösztrogén kezelésre adott terápiás válasz előrejelzésében.

5.2. A neutrofilekkel végzett vizsgálatok eredményeinek megbeszélése

A szteroid hormonok s mint ilyen az ösztrogén is számos sejtfunció szabályozásáért felelős, melyek a fiziológiai és patofiziológiai folyamatok széles skáláját érintik. A 17 β -ösztradiol immunrendszerre kifejtett szerepe meglehetősen sokrétű. (171) Az utóbbi évtizedekben több kutatási eredmény is igazolta, hogy az ösztrogén mind rövid távon, mind hosszú távon képes gyulladáson alapuló folyamatokat kedvezően befolyásolni, például az atherosclerosis (172) vagy a zsírmáj kialakulása esetében. (173) Mára joggal feltételezhető, hogy a jól ismert magreceptorok mediálta transzkripcionális hatások mellett az ösztrogén másodlagos hírvivők útján történő jelátvitel is jelentős szerepet játszik a fenti folyamatokban. Bár e hatások jelentőségét számos vizsgálat alátámasztja, ezek pontos mechanizmusa nagyrészt ismeretlen. (174, 175, 37)

Bemutatott munkámban az ösztrogén neutrofil granulocitákra kifejtett azonnali, szuperoxid termelést csökkentő hatását vizsgáltam. Bár az ösztrogén neutrofilek általi szabadgyök termelésre kifejtett gátló hatását többen is igazolták korábban, a jelenség pontos háttere eddig nem volt tisztázott. (135, 136) A hatás modellezésére az fMLP indukált szuperoxid produkció ferricitokróm-C redukción alapuló mérése terjedt el, melyet vizsgálatunkban a különböző kezelések hatékonyságának monitorozására használtuk fel.

Az ösztrogén hatásmechanizmusának feltárása érdekében olyan protein foszforiláció meghatározáson alapuló módszert alkalmaztunk, mely 43 különböző jelátviteli molekula foszforiláltsági szintjét monitorozza. Az ösztrogén kezelése során azonosított foszforilációs változások eredményeit felhasználva, protein interakciós adatbázisok segítségével azonosítottunk egy potenciális jelátviteli útvonalat, melyet a későbbiekben az egyes jelátviteli struktúrák szelektív gátlószereivel validáltunk. Az inhibitorok hatását a szuperoxid produkción keresztül monitorozva sikerült igazolnunk az útvonal funkcionális jelentőségét, hiszen a különböző gátlószerek a jelátvitel jellegétől függően minden esetben a várt irányba befolyásolták a szabadgyök termelést. A javasolt útvonal az 8. ábrán látható.

Az útvonal által végső soron szabályozott Rac1 nevű fehérje a szuperoxid gyök termelésért felelős NADPH oxidáz enzim szabályozását végzi, fontos szerepe van neutrofilek kemotaxisának (176), illetve szabadgyök termelésének szabályozásában. (177, 178) A NADPH oxidáz enzim aktivációja számos szabályozó fehérje közreműködésével valósul meg, melyek közül a legfontosabbak a p40^{phox}, a p47^{phox} és a p67^{phox}. Az utóbbi két fehérje jelenléte elengedhetetlen az enzim aktivációjához. A Rac1 szabályozó hatása a p67^{phox} N-terminális

szabályozó régiójának foszforilálásán keresztül valósul meg, mely egy elengedhetetlen térszerkezeti változást indukál. (178)

Útvonalunkban a Rac1 upstream inhibítora a számos sejtfunkció szabályozásában résztvevő Akt enzim. Kwon és munkatársainak munkája nyomán tudjuk, hogy a Rac1 Akt-on keresztüli gátlása a 71-es szerin foszforilációjával történik. (179) Vaszkuláris simaizom sejteken végzett vizsgálatok során már igazolták a mechanizmus jelentőségét, az ösztrogén általi Rac1 gátlás szabadgyök termelésre kifejtett gátló hatását is bemutattva. (180) Szintén hasonló eredmények születtek neuronális sejtekkel végzett vizsgálatok során, ahol az ösztrogén protektív szerepét igazolták iszkémiás károsodással szemben, szintén a NADPH enzim aktivációjának gátlásán keresztül. (93) Az ösztrogén Akt-on keresztül kifejtett hatásának in vivo bizonyítékként értékelhető az a rágcsáló modellen végzett vizsgálat is, amelyben az ösztrogén akut hasnyálmirigy gyulladás során a tüdő oxidatív károsodására kifejtett hatását vizsgálták. E vizsgálat során azt találták, hogy órákkal a hasnyálmirigy gyulladás indukcióját követően már kimutatható volt az ösztrogén szabadgyök-szint csökkentő hatása, melyet Akt inhibíció megszüntetett. (92)

Az ösztrogén indukálta Akt aktiváció a jelenlegi eredmények szerint vélhetően másodlagos hírvivő molekulák bevonásával, membrán asszociált ösztrogén receptorokon keresztül valósul meg. (181, 35) Ennek mechanizmusát vizsgálva többen is igazolták, hogy az aktivált ER α a c-Src aktivációján keresztül, a PI3K enzim p85-ös, regulátoros alegységéhez kötődve aktiválja az enzimet. (182, 62) A vizsgálatokat ugyan nem neutrofil granulocitákon végezték, ám számos vizsgálat támasztja alá, hogy a granulocitákban található ösztrogén membrán receptorok az endothel sejtekhez hasonló receptor komplexekben helyezkednek el. (109) Ezt alátámasztják azon mérések is, melyek az ösztrogén indukálta NO szintézis vizsgálva azt találták, hogy a neutrofil granulociták az endothel sejtekhez hasonló mértékű NO kibocsátással reagálnak az ösztrogén-BSA kezelésre (181, 109), mely hatás szintén a PI3K aktivációján keresztül valósul meg.

A fentiek alapján elmondható tehát, hogy a protein foszforilációs vizsgálatok során azonosított foszforilációs változások olyan ismert, hasonló kontextusban igazolt protein interakciókon alapuló útvonalat alkotnak, mely útvonal szelektív gátlószerei a jelátvitelt gátolják. E gátlás megvalósulása egyértelműen követhető volt a szuperoxid szintek mérésén keresztül. Az azonosított útvonalban az ösztrogén a Rac1-en keresztül, feltehetőleg részben membrán ösztrogén receptorok útján csökkenti a neutrofilek aktivációja során felszabaduló szövetkárosító szabadgyökök mennyiségét.

Ha az összefüggést klinikai szemszögből vizsgáljuk, megállapíthatjuk, hogy az ösztrogén oxidatív stresszt csökkentő hatását eddig nem sikerült igazán kiaknázni. Az ösztrogén esetleges kedvező, szekunder prevenciós hatékonyságát vizsgáló klinikai kutatások során ellentmondó eredmények születtek mind az agyi érkatasztrófák, mind a miokardiális infarktust követően alkalmazott kezelések esetében. (183, 184)

Az első nagyobb klinikai kutatás a sztrók esetében a WEST (Women's Estrogen for Stroke Trial) vizsgálat volt, mely posztmenopauzás, sztrókon átesett betegek esetében vizsgálta napi 1 mg orálisan adagolt 17 β -ösztradiol terápiás hatását placebohoz viszonyítva. (185) A TIA-n (tranzienis iszkémiás attackon) vagy sztrókon 90 napon belül átesett betegek esetében a kezelés nem csökkentette a mortalitást vagy az újabb cerebrovaszkuláris esemény előfordulását. Sőt, az ösztrogén nem szignifikánsan, de tendenciájában érzékelhetően rontotta a betegek túlélését. Ugyan a WEST vizsgálat eredményeit többen kritizálták az ösztrogén orális alkalmazása, a nem megfelelően kialakított randomizációs feltételek és egyéb metodikai hibák miatt, mégis a későbbi vizsgálatok alapján később egyértelművé vált, hogy a posztmenopauzális ösztrogén hormonpótló kezelés nem alkalmas sem primer, sem szekunder sztrók prevencióra. (186-188) Úgy tűnik tehát, hogy az agyi iszkémiás károsodás esetében az ösztrogén neutrofilekre kifejtett szuperoxid szintet és egyben az oxidatív szövetkárosodást mérséklő hatása kevésbé érvényesül, esetleg még kedvezőtlen hatásokkal is számolni kell.

A miokardiális infarktusz és az ösztrogén kezelés összefüggéseit vizsgáló klinikai kutatások esetében igen vegyes eredmények születtek. Egyes eredmények szerint a posztmenopauzális ösztrogénpótló kezelés javítja a betegek kardiovaszkuláris mortalitását, amennyiben időben megkezdett, megfelelően alkalmazott ösztrogén kezeléssel van szó. (189) Elmondható tehát, hogy a helyesen alkalmazott ösztrogén kezelés kardioprotektív hatású.

A premenopauzális nőknél vagy férfiaknál történő alkalmazásról szóló eredmények azonban ellentmondóak. (190-192, 189) Egy 1857 beteg adatait összesítő klinikai vizsgálatban az akut koronária szindrómával egyidőben megkezdett ösztrogén pótló kezelés kifejezetten kedvezőtlenül befolyásolta a betegek mortalitását. (193)

Az 17 β -ösztradiol alkalmazása tehát különböző, gyulladással és oxidatív szövetkárosodással járó kórállapotokban nem tekinthető igazán hatékony terápiának. Érdekes kérdés azonban, hogy amennyiben a 17 β -ösztradiol ösztrogén membrán receptorok útján gátolja a Rac1 enzimet és ezen keresztül a szuperoxid termelődést, lehetne e kedvező hatása egy membrán receptor specifikus ösztrogén származéknak, mellyel kivédhetővé válnának az ösztrogén kezelések magreceptorokon keresztüli, kedvezőtlen hatásai.

Mivel a jelenlegi membrán szelektív ösztrogén agonisták és antagonisták a klinikumban nem alkalmazhatóak közvetlenül, egyéb, az fMLP jelátvitelt gátló vegyületek szerepe is további kutatásra érdemes területnek ígérkezik.

A bemutatott munka során bár két eltérő modellen vizsgáltuk az ösztrogén jelátviteli sajátosságait, mégis jól megragadható az eredmények általánosabb üzenete. Ennek lényege az a felismerés, hogy a membrán asszociált ösztrogén receptorok szerepe bizonyos esetekben igen jelentős az ösztrogén hatás kialakításában. Ez a támadáspont előnyös lehet az ösztrogén hatásának részleges gátlására éppúgy, mint az ösztrogén magreceptorok aktiválása nélkül kifejtteni ösztrogén mediált azonnali választ. Dolgozatom tulajdonképpen e két eshetőséget vizsgálja olyan modellekben, melyek klinikai szempontból is jelentőséggel bírnak.

6. Következtetések

Az ösztrogén jelátvitelt különböző modellekben vizsgálva az alábbi következtetésekre jutottam:

1. A microarray vizsgálatok meta-analízise során a CCND1, az ERBB2, KCNK5, KDM4B, illetve MYC gének expressziója alkalmas az ösztrogén indukált proliferatív hatás monitorozására a vizsgált emlőrák modellben.
2. A 17 β -ösztradiol valamennyi vizsgált gén expresszióját szignifikánsan növeli. A membrán szelektív ösztrogén agonista E2-BSA kezelés szintén minden gén expresszióját szignifikánsan növelte, mely hatás a MYC és a CCND1 esetében az ösztrogénnél kevésbé volt kifejezett. A GPER szelektív agonista G1 csak a KCNK5 esetében indukált szignifikáns transzkripció növekedést.
3. A képkötő vizsgálatok tanúsága szerint MCF7 sejtekben az mER receptor ligand mediált internalizáción megy keresztül.
4. Az mER receptor internalizációjának dinaminon keresztüli gátlása erőteljesen csökkenti az ösztrogén által indukált transzkripciós választ.
5. A foszforilációs vizsgálatok alapján elmondható, hogy a 17 β -ösztradiol neutrofilek szuperoxid produkciójára kifejtett hatása a Rac1 gátlásán keresztül megvalósul.

7. Összefoglalás

A csaknem két évtizede leírt ösztrogén membrán receptorok mára több fiziológiai és patofiziológiai folyamat szereplőivé léptek elő. Munkánk során klinikailag is jelentősnek tűnő ösztrogén jelátviteli struktúrákat vizsgáltunk két eltérő modellen. Az emlőrákok ösztrogén dependenciája, illetve az anti-ösztrogénekkel szembeni rezisztencia kialakulásában a membrán asszociált ösztrogén receptorok szerepe sokat vizsgált, ígéretes kutatási terület. Ennek magyarázata ezen receptorok proliferatív potenciáljában rejlik. Vizsgálatunkban MCF7 emlőrák sejtvonalon vizsgáltuk egy membrán impermeábilis ösztrogén származék (ösztrogén-szarvasmarhaszérum-albumin), illetve egy membránkötött G-protein kapcsolt ösztrogén receptor agonista transzkripcionális hatását, az ösztrogénhez viszonyítva. A kvantitatív valósídejű PCR mérések során olyan kiemelt gének (CCND1, ERBB2, KCNK5, KDM4B és MYC) expresszióját követtük, melyek microarray meta-analízis alapján az ösztrogén jelátvitelben vagy az ösztrogén mediált proliferatív hatás monitorozásában kiemelt szerepet játszanak. A membrán receptorok feltételezett ligand indukált internalizációját, mely jelátviteli szempontból egyfajta szabályozó mechanizmusként értelmezhető, immunfluoreszcens technikával, illetve elektronmikroszkópos felvételeken követtük. A képalkotó vizsgálatokkal párhuzamosan a receptor internalizáció transzkripcionális hatását is monitoroztuk. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az ösztrogén membránreceptorok az emlőrák proliferáció szabályozásában jelentős szerepet játszanak, s ebben – legalábbis a vizsgált gének tekintetében – a membrán asszociált klasszikus ösztrogén receptor (mER) szerepe dominál. Elmondható az is, hogy a receptorok a jelátvitel során ligand mediált internalizáción mennek keresztül, melynek gátlása a jelátvitel drámai csökkenéséhez vezet. Egy másik modellben az ösztrogén neutrofil granulocitákra kifejtett azonnali szuperoxid csökkentő hatásának fiziológiai hátterét vizsgálva egy jelátviteli utat azonosítottunk, melynek szelektív gátlása az említett hatást felfüggeszti. Elmondható hát, hogy a fenti ösztrogénhatás – legalább részben – a NADPH oxidáz enzim Rac1-en keresztüli gátlása útján valósul meg. Vizsgálataink eredményei tágabb kontextusban rámutatnak, hogy a membrán ösztrogén hatások egyes fiziológiai és patofiziológiai folyamatokban klinikailag is jelentős szerepet játszanak.

8. Summary

Estrogen membrane receptors described almost two decades ago are now seen as important mediators of various physiological and pathophysiological processes. We examined the role of these structures in two clinically relevant models.

The importance of membrane initiated estrogen signaling has been suggested in breast cancer development. Membrane receptors seem to be involved both in the proliferative effects of estrogen and in the development of anti-estrogen therapy resistance. In our work we compared the proliferative effect of a membrane impermeable estrogen compound (estrogen-BSA) and a selective G-protein coupled estrogen receptor agonist (G1) to 17 β -estradiol. Using qRT-PCR we monitored the expression changes of a set of selected genes (CCND1, ERBB2, KCNK5, KDM4B and MYC) that according to microarray meta-analyses play pivotal role in estrogen signaling or in the monitoring of breast cancer proliferation. We followed the suspected membrane receptor trafficking using light- and electron-microscopy and monitored its effect on gene transcription as well. Our results suggest that membrane estrogen receptors greatly contribute to the overall effects of estrogen and that this – at least regarding the monitored genes - is mainly mediated via membrane associated classical estrogen receptors (mER). We also demonstrated that membrane estrogen receptors are subjects to ligand mediated receptor internalization while the inhibition of this process leads to the drastic attenuation of the induced expression changes.

The decreasing effect of estrogen on neutrophil superoxide production has been repeatedly described. In our work we aimed to clarify the underlying signaling events. Monitoring and evaluating the induced phosphorylation changes of several second messengers we managed to identify a plausible pathway that is initiated by membrane estrogen receptors. Selective inhibition of the participating second messengers affected estrogen signaling in the predicted way, which we monitored via fMLP induced superoxide production. Our results suggest that the effect of estrogen on fMLP induced superoxide production is - at least partly - mediated via the inhibition of the NADPH oxidase enzyme through Rac1.

In a broader context our work emphasizes the contribution of membrane initiated estrogen signaling to the overall estrogen effect that may create new therapeutic or diagnostic possibilities.

Irodalomjegyzék

1. Pearson A, Budin M, Brocks JJ. (2003) Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 15352-15357.
2. Gudernatsch J. (1912) Feeding experiments on tadpoles. I. The influence of specific organs given as food on growth and differentiation. *Arch Entwicklungsmech Org*, 35:457.
3. Clever U, Karlson P. (1960) [Induction of puff changes in the salivary gland chromosomes of *Chironomus tentans* by ecdysone]. *Exp Cell Res*, 20: 623-626.
4. Selye H. (1942) Correlation between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. *Endocrinology*, 30: 437-453.
5. Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F. (2000) Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J*, 19: 5406-5417.
6. Farach-Carson MC, Davis PJ. (2003) Steroid hormone interactions with target cells: cross talk between membrane and nuclear pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, 307: 839-845.
7. Falkenstein E, Norman AW, Wehling M. (2000) Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 2072-2075.
8. Maggi A, Perez J. (1986) Estrogen-induced up-regulation of gamma-aminobutyric acid receptors in the CNS of rodents. *J Neurochem*, 47: 1793-1797.
9. Tabatadze N, Huang G, May RM, Jain A, Woolley CS. (2015) Sex Differences in Molecular Signaling at Inhibitory Synapses in the Hippocampus. *J Neurosci*, 35: 11252-11265.
10. Arao Y, Korach KS. (2018) The F domain of estrogen receptor alpha is involved in species-specific, tamoxifen-mediated transactivation. *J Biol Chem*, 293: 8495-8507.
11. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*, 81: 1535-1565.
12. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83: 835-839.
13. Novac N, Heinzl T. (2004) Nuclear receptors: overview and classification. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 3: 335-346.
14. Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER. (1999) Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*, 13: 307-319.
15. Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER. (2004) Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol*, 18: 2854-2865.
16. Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P, Levin ER. (2003) Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol Cell Biol*, 23: 1633-1646.
17. Pappas TC, Gametchu B, Watson CS. (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *Faseb J*, 9: 404-410.

18. Pedram A, Razandi M, Levin ER. (2006) Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol*, 20: 1996-2009.
19. Pedram A, Razandi M, Deschenes RJ, Levin ER. (2012) DHHC-7 and -21 are palmitoyltransferases for sex steroid receptors. *Mol Biol Cell*, 23: 188-199.
20. Levin ER. (2009) Membrane oestrogen receptor alpha signalling to cell functions. *J Physiol*, 587: 5019-5023.
21. Acconcia F, Marino M. (2011) The Effects of 17beta-estradiol in Cancer are Mediated by Estrogen Receptor Signaling at the Plasma Membrane. *Front Physiol*, 2: 30.
22. Luoma JI, Boulware MI, Mermelstein PG. (2008) Caveolin proteins and estrogen signaling in the brain. *Mol Cell Endocrinol*, 290: 8-13.
23. Mermelstein PG, Micevych PE. (2008) Nervous system physiology regulated by membrane estrogen receptors. *Rev Neurosci*, 19: 413-424.
24. Micevych P, Dominguez R. (2009) Membrane estradiol signaling in the brain. *Front Neuroendocrinol*, 30: 315-327.
25. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F. (2001) PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J*, 20: 6050-6059.
26. Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ. (2002) Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol*, 16: 116-127.
27. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*, 407: 538-541.
28. Levin ER. (2005) Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*, 19: 1951-1959.
29. Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ. (2004) The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 2076-2081.
30. Fox EM, Bernaciak TM, Wen J, Weaver AM, Shupnik MA, Silva CM. (2008) Signal transducer and activator of transcription 5b, c-Src, and epidermal growth factor receptor signaling play integral roles in estrogen-stimulated proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, 22: 1781-1796.
31. Pietras RJ, Marquez-Garban DC. (2007) Membrane-associated estrogen receptor signaling pathways in human cancers. *Clin Cancer Res*, 13: 4672-4676.
32. Li L, Hisamoto K, Kim KH, Haynes MP, Bauer PM, Sanjay A, Collinge M, Baron R, Sessa WC, Bender JR. (2007) Variant estrogen receptor-c-Src molecular interdependence and c-Src structural requirements for endothelial NO synthase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 16468-16473.
33. Simoncini T, Rabkin E, Liao JK. (2003) Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: 198-203.
34. Deschamps AM, Murphy E, Sun J. (2010) Estrogen receptor activation and cardioprotection in ischemia reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med*, 20: 73-78.
35. Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N, Murata Y. (2001) Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 276: 3459-3467.

36. Zhang MH, Man HT, Zhao XD, Dong N, Ma SL. (2014) Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials (Review). *Biomed Rep*, 2: 41-52.
37. Soltysik K, Czekaj P. (2013) Membrane estrogen receptors - is it an alternative way of estrogen action? *J Physiol Pharmacol*, 64: 129-142.
38. Prossnitz ER, Arterburn JB, Sklar LA. (2007) GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol*, 266: 138-142.
39. Gobeil F, Fortier A, Zhu T, Bossolasco M, Leduc M, Grandbois M, Heveker N, Bkaily G, Chemtob S, Barbaz D. (2006) G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can J Physiol Pharmacol*, 84: 287-297.
40. Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM, Mizukami Y. (2006) G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 346: 904-910.
41. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. (2005) Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 146: 624-632.
42. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 307: 1625-1630.
43. Sakamoto H, Matsuda K, Hosokawa K, Nishi M, Morris JF, Prossnitz ER, Kawata M. (2007) Expression of G protein-coupled receptor-30, a G protein-coupled membrane estrogen receptor, in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Endocrinology*, 148: 5842-5850.
44. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. (1997) Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*, 45: 607-617.
45. Feng Y, Gregor P. (1997) Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 231: 651-654.
46. Isensee J, Meoli L, Zazzu V, Nabzyk C, Witt H, Soewarto D, Effertz K, Fuchs H, Gailus-Durner V, Busch D, Adler T, de Angelis MH, Irgang M, Otto C, Noppinger PR. (2009) Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology*, 150: 1722-1730.
47. Martensson UE, Salehi SA, Windahl S, Gomez MF, Sward K, Daszkiewicz-Nilsson J, Wendt A, Andersson N, Hellstrand P, Grande PO, Owman C, Rosen CJ, Adamo ML, Lundquist I, Rorsman P, Nilsson BO, Ohlsson C, Olde B, Leeb-Lundberg LM. (2009) Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. *Endocrinology*, 150: 687-698.
48. Otto C, Fuchs I, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Andreasen P, Schwarz G, Altmann H, Klewer M, Schoor M, Vonk R, Fritzeimer KH. (2009) GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biol Reprod*, 80: 34-41.
49. Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ. (1996) Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 228: 285-292.
50. Mizukami Y. (2010) In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. *Endocr J*, 57: 101-107.
51. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, Jr. (2000) 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*, 14: 1649-1660.

52. Kanda N, Watanabe S. (2003) 17beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. *J Invest Dermatol*, 121: 1500-1509.
53. Kanda N, Watanabe S. (2004) 17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression. *J Invest Dermatol*, 123: 319-328.
54. Ylikomi T, Vienonen A, Ahola TM. (2004) G protein-coupled receptor 30 down-regulates cofactor expression and interferes with the transcriptional activity of glucocorticoid. *Eur J Biochem*, 271: 4159-4168.
55. Bologna CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER. (2006) Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol*, 2: 207-212.
56. Dennis MK, Field AS, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Bologna CG, Oprea TI, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Prossnitz ER. (2011) Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127: 358-366.
57. Kampa M, Notas G, Pelekanou V, Troullinaki M, Andrianaki M, Azariadis K, Kampouri E, Lavrentaki K, Castanas E. (2012) Early membrane initiated transcriptional effects of estrogens in breast cancer cells: First pharmacological evidence for a novel membrane estrogen receptor element (ERx). *Steroids*, 77: 959-967.
58. Rainville J, Pollard K, Vasudevan N. (2015) Membrane-initiated non-genomic signaling by estrogens in the hypothalamus: cross-talk with glucocorticoids with implications for behavior. *Front Endocrinol*, 6.
59. Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R. (2011) Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, 378: 771-784.
60. Rondon-Lagos M, Villegas VE, Rangel N, Sanchez MC, Zaphiropoulos PG. (2016) Tamoxifen Resistance: Emerging Molecular Targets. *Int J Mol Sci*, 17.
61. Jagannathan V, Robinson-Rechavi M. (2011) Meta-analysis of estrogen response in MCF-7 distinguishes early target genes involved in signaling and cell proliferation from later target genes involved in cell cycle and DNA repair. *BMC Syst Biol*, 5: 1752-0509.
62. Lee YR, Park J, Yu HN, Kim JS, Youn HJ, Jung SH. (2005) Up-regulation of PI3K/Akt signaling by 17beta-estradiol through activation of estrogen receptor-alpha, but not estrogen receptor-beta, and stimulates cell growth in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 336: 1221-1226.
63. Zivadinovic D, Gametchu B, Watson CS. (2005) Membrane estrogen receptor-alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predict cAMP and proliferation responses. *Breast Cancer Res*, 7: 24.
64. Zivadinovic D, Watson CS. (2005) Membrane estrogen receptor-alpha levels predict estrogen-induced ERK1/2 activation in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res*, 7: 26.
65. Ohshiro K, Schwartz AM, Levine PH, Kumar R. (2012) Alternate estrogen receptors promote invasion of inflammatory breast cancer cells via non-genomic signaling. *PLoS One*, 7: 25.
66. Scaling AL, Prossnitz ER, Hathaway HJ. (2014) GPER mediates estrogen-induced signaling and proliferation in human breast epithelial cells and normal and malignant breast. *Horm Cancer*, 5: 146-160.
67. Teng J, Wang ZY, Prossnitz ER, Bjorling DE. (2008) The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits human urothelial cell proliferation. *Endocrinology*, 149: 4024-4034.

68. Chevalier N, Vega A, Bouskine A, Siddeek B, Michiels JF, Chevallier D, Fenichel P. (2012) GPR30, the non-classical membrane G protein related estrogen receptor, is overexpressed in human seminoma and promotes seminoma cell proliferation. *PLoS One*, 7: 4.
69. Kolkova Z, Casslen V, Henic E, Ahmadi S, Ehinger A, Jirstrom K, Casslen B. (2012) The G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER/GPR30) does not predict survival in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res*, 5: 1757-2215.
70. Luo HJ, Luo P, Yang GL, Peng QL, Liu MR, Tu G. (2011) G-protein Coupled Estrogen Receptor 1 Expression in Primary Breast Cancers and Its Correlation with Clinicopathological Variables. *J Breast Cancer*, 14: 185-190.
71. Ignatov A, Ignatov T, Roessner A, Costa SD, Kalinski T. (2010) Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat*, 123: 87-96.
72. Ignatov A, Ignatov T, Weissenborn C, Eggemann H, Bischoff J, Semczuk A, Roessner A, Costa SD, Kalinski T. (2011) G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 128: 457-466.
73. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., Bland KI. (2002) Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol*, 16: 70-84.
74. Lappano R, Pisano A, Maggiolini M. (2014) GPER Function in Breast Cancer: An Overview. *Front Endocrinol*, 5.
75. Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Ando S. (2004) The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem*, 279: 27008-27016.
76. Filardo EJ, Thomas P. (2005) GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab*, 16: 362-367.
77. Quinn JA, Graeber CT, Frackelton AR, Jr., Kim M, Schwarzbauer JE, Filardo EJ. (2009) Coordinate regulation of estrogen-mediated fibronectin matrix assembly and epidermal growth factor receptor transactivation by the G protein-coupled receptor, GPR30. *Mol Endocrinol*, 23: 1052-1064.
78. Pandey DP, Lappano R, Albanito L, Madeo A, Maggiolini M, Picard D. (2009) Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J*, 28: 523-532.
79. Lu C, Shen Q, DuPre E, Kim H, Hilsenbeck S, Brown PH. (2005) cFos is critical for MCF-7 breast cancer cell growth. *Oncogene*, 24: 6516-6524.
80. Jiang QF, Wu TT, Yang JY, Dong CR, Wang N, Liu XH, Liu ZM. (2013) 17beta-estradiol promotes the invasion and migration of nuclear estrogen receptor-negative breast cancer cells through cross-talk between GPER1 and CXCR1. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 138: 314-324.
81. Li Y, Chen Y, Zhu ZX, Liu XH, Yang L, Wan L, Lei TW, Wang XD. (2013) 4-Hydroxytamoxifen-stimulated processing of cyclin E is mediated via G protein-coupled receptor 30 (GPR30) and accompanied by enhanced migration in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology*, 309: 61-65.
82. Pupo M, Pisano A, Abonante S, Maggiolini M, Musti AM. (2014) GPER activates Notch signaling in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs). *Int J Biochem Cell Biol*, 46: 56-67.
83. Catalano S, Giordano C, Panza S, Chemi F, Bonofiglio D, Lanzino M, Rizza P, Romeo F, Fuqua SA, Maggiolini M, Ando S, Barone I. (2014) Tamoxifen through GPER

- upregulates aromatase expression: a novel mechanism sustaining tamoxifen-resistant breast cancer cell growth. *Breast Cancer Res Treat*, 146: 273-285.
84. Zhang L, Li Y, Lan L, Liu R, Wu Y, Qu Q, Wen K. (2016) Tamoxifen has a proliferative effect in endometrial carcinoma mediated via the GPER/EGFR/ERK/cyclin D1 pathway: A retrospective study and an in vitro study. *Mol Cell Endocrinol*, 437: 51-61.
 85. Madeo A, Maggiolini M. (2010) Nuclear alternate estrogen receptor GPR30 mediates 17beta-estradiol-induced gene expression and migration in breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res*, 70: 6036-6046.
 86. Pedram A, Razandi M, Evinger AJ, Lee E, Levin ER. (2009) Estrogen inhibits ATR signaling to cell cycle checkpoints and DNA repair. *Mol Biol Cell*, 20: 3374-3389.
 87. Song RX, Santen RJ. (2006) Membrane initiated estrogen signaling in breast cancer. *Biol Reprod*, 75: 9-16.
 88. Lim KT, Cosgrave N, Hill AD, Young LS. (2006) Nongenomic oestrogen signalling in oestrogen receptor negative breast cancer cells: a role for the angiotensin II receptor AT1. *Breast Cancer Res*, 8: 28.
 89. Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT. (2012) Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 136: 331-345.
 90. Yu C, Minemoto Y, Zhang J, Liu J, Tang F, Bui TN, Xiang J, Lin A. (2004) JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell*, 13: 329-340.
 91. Razandi M, Pedram A, Levin ER. (2000) Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol Endocrinol*, 14: 1434-1447.
 92. Yang SJ, Chen HM, Hsieh CH, Hsu JT, Yeh CN, Yeh TS, Hwang TL, Jan YY, Chen MF. (2011) Akt pathway is required for oestrogen-mediated attenuation of lung injury in a rodent model of cerulein-induced acute pancreatitis. *Injury*, 42: 638-642.
 93. Zhang QG, Raz L, Wang R, Han D, De Sevilla L, Yang F, Vadlamudi RK, Brann DW. (2009) Estrogen attenuates ischemic oxidative damage via an estrogen receptor alpha-mediated inhibition of NADPH oxidase activation. *J Neurosci*, 29: 13823-13836.
 94. Blesson CS, Sahlin L. (2012) Expression pattern and signalling pathways in neutrophil like HL-60 cells after treatment with estrogen receptor selective ligands. *Mol Cell Endocrinol*, 361: 179-190.
 95. Stefano GB, Peter D. (2001) Cell surface estrogen receptors coupled to cNOS mediate immune and vascular tissue regulation: therapeutic implications. *Med Sci Monit*, 7: 1066-1074.
 96. Hartwig H, Silvestre Roig C, Daemen M, Lutgens E, Soehnlein O. (2015) Neutrophils in atherosclerosis. A brief overview. *Hamostaseologie*, 35: 121-127.
 97. Drechsler M, Megens RT, van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. (2010) Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation*, 122: 1837-1845.
 98. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. (2014) The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*, 9: 181-218.
 99. Mocsai A. (2013) Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*, 210: 1283-1299.
 100. Soehnlein O, Lindbom L. (2010) Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 10: 427-439.
 101. Soehnlein O, Weber C. (2009) Myeloid cells in atherosclerosis: initiators and decision shapers. *Semin Immunopathol*, 31: 35-47.

102. Miyagi M, Aoyama H, Morishita M, Iwamoto Y. (1992) Effects of sex hormones on chemotaxis of human peripheral polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Periodontol*, 63: 28-32.
103. Okada M, Suzuki A, Mizuno K, Asada Y, Ino Y, Kuwayama T, Tamakoshi K, Mizutani S, Tomoda Y. (1997) Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on migration of human monocytic THP-1 cells stimulated by minimally oxidized low-density lipoprotein in vitro. *Cardiovasc Res*, 34: 529-535.
104. Wessendorf G, Scheibl P, Zerbe PS. (1998) [Effect of estrogens on the immune system with regard to bovine placental retention]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 105: 32-34.
105. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Arlotta M, Arcoraci V, Minutoli L, Serrano M, Saitta A, Caputi AP. (1997) 17Beta-oestradiol reduces cardiac leukocyte accumulation in myocardial ischaemia reperfusion injury in rat. *Eur J Pharmacol*, 335: 185-192.
106. Suzuki A, Mizuno K, Asada Y, Ino Y, Kuwayama T, Okada M, Mizutani S, Tomoda Y. (1997) Effects of 17beta-estradiol and progesterone on the adhesion of human monocytic THP-1 cells to human female endothelial cells exposed to minimally oxidized LDL. *Gynecol Obstet Invest*, 44: 47-52.
107. Yamada K, Hayashi T, Kuzuya M, Naito M, Asai K, Iguchi A. (1996) Physiological concentration of 17 beta-estradiol inhibits chemotaxis of human monocytes in response to monocyte chemotactic protein 1. *Artery*, 22: 24-35.
108. Bekesi G, Kakucs R, Varbiro S, Racz K, Sprintz D, Feher J, Szekacs B. (2000) In vitro effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. *Steroids*, 65: 889-894.
109. Stefano GB, Cadet P, Breton C, Goumon Y, Prevot V, Dessaint JP, Beauvillain JC, Roumier AS, Welters I, Salzet M. (2000) Estradiol-stimulated nitric oxide release in human granulocytes is dependent on intracellular calcium transients: evidence of a cell surface estrogen receptor. *Blood*, 95: 3951-3958.
110. Garcia-Duran M, de Frutos T, Diaz-Recasens J, Garcia-Galvez G, Jimenez A, Monton M, Farre J, Sanchez de Miguel L, Gonzalez-Fernandez F, Arriero MD, Rico L, Garcia R, Casado S, Lopez-Farre A. (1999) Estrogen stimulates neuronal nitric oxide synthase protein expression in human neutrophils. *Circ Res*, 85: 1020-1026.
111. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 15545-15550.
112. Cutolo M, Brizzolara R, Atzeni F, Capellino S, Straub RH, Puttini PC. (2010) The immunomodulatory effects of estrogens: clinical relevance in immune-mediated rheumatic diseases. *Ann N Y Acad Sci*.
113. Nalbandian G, Kovats S. (2005) Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. *Immunol Res*, 31: 91-106.
114. Santen RJ, Fan P, Zhang Z, Bao Y, Song RX, Yue W. (2009) Estrogen signals via an extra-nuclear pathway involving IGF-1R and EGFR in tamoxifen-sensitive and -resistant breast cancer cells. *Steroids*, 74: 586-594.
115. Wehling M. (1994) Novel aldosterone receptors: specificity-conferring mechanism at the level of the cell membrane. *Steroids*, 59: 160-163.
116. Stevis PE, Deecher DC, Suhadolnik L, Mallis LM, Frail DE. (1999) Differential effects of estradiol and estradiol-BSA conjugates. *Endocrinology*, 140: 5455-5458.
117. Hong F, Breitling R. (2008) A comparison of meta-analysis methods for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. *Bioinformatics*, 24: 374-382.

118. Shah KN, Faridi JS. (2011) Estrogen, tamoxifen, and Akt modulate expression of putative housekeeping genes in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 125: 219-225.
119. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-408.
120. Slot JW, Geuze HJ. (2007) Cryosectioning and immunolabeling. *Nat Protoc*, 2: 2480-2491.
121. Guarnieri C, Melandri G, Caldarera I, Scheda M, Ligabue A, Guizzardi S, Branzi A. (1990) Reduced oxidative activity of circulating neutrophils in patients after myocardial-infarction
Cell Biochemistry and Function, 8: 157-162.
122. Jansson G. (1991) Estrogen-induced enhancement of myeloperoxidase activity in human polymorphonuclear leukocytes - a possible cause of oxidative stress in inflammatory cells. *Free Radical Research Communications*, 14: 195-208.
123. Gayard M, Guilluy C, Rousselle A, Viollet B, Henrion D, Pacaud P, Loirand G, Rolli-Derkinderen M. (2011) AMPK alpha 1-induced RhoA phosphorylation mediates vasoprotective effect of estradiol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31: 2634-2642.
124. Yang S, Wang J. (2015) Estrogen Activates AMP-Activated Protein Kinase in Human Endothelial Cells via ERbeta/Ca/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase beta Pathway. *Cell Biochem Biophys*, 24: 24.
125. Moro L, Reineri S, Piranda D, Pietrapiana D, Lova P, Bertoni A, Graziani A, Defilippi P, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F. (2005) Nongenomic effects of 17beta-estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor beta and Src kinase. *Blood*, 105: 115-121.
126. Qiu J, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. (2008) Modulation of hypothalamic neuronal activity through a novel G-protein-coupled estrogen membrane receptor. *Steroids*, 73: 985-991.
127. Guo RX, Zhang RF, Wang XY, Li LX, Shi HR, Qiao YH. (2011) Non-nuclear activation of signal transducer and activator of transcription 3 by 17beta- estradiol in endometrial cancer cells. *Neoplasma*, 58: 532-537.
128. Lorenzo J. (2003) A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass. *J Clin Invest*, 111: 1641-1643.
129. Lee H, Bai W. (2002) Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 22: 5835-5845.
130. Roux PP, Blenis J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68: 320-344.
131. Fumagalli L, Zhang H, Baruzzi A, Lowell CA, Berton G. (2007) The Src family kinases Hck and Fgr regulate neutrophil responses to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J Immunol*, 178: 3874-3885.
132. Osterloh A, Geisinger F, Piedavent M, Fleischer B, Brattig N, Breloer M. (2009) Heat shock protein 60 (HSP60) stimulates neutrophil effector functions. *J Leukoc Biol*, 86: 423-434.
133. Tang W, Zhang Y, Xu W, Harden TK, Sondek J, Sun L, Li L, Wu D. (2011) A PLCbeta/PI3Kgamma-GSK3 signaling pathway regulates cofilin phosphatase slingshot2 and neutrophil polarization and chemotaxis. *Dev Cell*, 21: 1038-1050.
134. Shure D, Senior RM, Griffin GL, Deuel TF. (1992) PDGF AA homodimers are potent chemoattractants for fibroblasts and neutrophils, and for monocytes activated by lymphocytes or cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, 186: 1510-1514.
135. Abrahams VM, Collins JE, Wira CR, Fanger MW, Yeaman GR. (2003) Inhibition of human polymorphonuclear cell oxidative burst by 17-beta-estradiol and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Am J Reprod Immunol*, 50: 463-472.

136. Bekesi G, Tulassay Z, Racz A, Feher J, Szekacs B, Kakucs R, Dinya E, Riss E, Magyar Z, Rigo J. (2007) The effect of estrogens on superoxide anion generation by human neutrophil granulocytes: Possible consequences of the antioxidant defense. *Gynecological Endocrinology*, 23: 451-454.
137. Sini V, Cinieri S, Conte P, De Laurentiis M, Leo AD, Tondini C, Marchetti P. (2016) Endocrine therapy in post-menopausal women with metastatic breast cancer: From literature and guidelines to clinical practice. *Crit Rev Oncol Hematol*, 100: 57-68.
138. Gaughan L, Stockley J, Coffey K, O'Neill D, Jones DL, Wade M, Wright J, Moore M, Tse S, Rogerson L, Robson CN. (2013) KDM4B is a master regulator of the estrogen receptor signalling cascade. *Nucleic Acids Res*, 41: 6892-6904.
139. Li H, Yang X, Wang G, Li X, Tao D, Hu J, Luo X. (2016) KDM4B plays an important role in mitochondrial apoptosis by upregulating HAX1 expression in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7: 57866-57877.
140. Wilson C, Qiu L, Hong Y, Karnik T, Tadros G, Mau B, Ma T, Mu Y, New J, Louie RJ, Gunewardena S, Godwin AK, Tawfik OW, Chien J, Roby KF, Krieg AJ. (2017) The histone demethylase KDM4B regulates peritoneal seeding of ovarian cancer. *Oncogene*, 36: 2565-2576.
141. Chen H, Liu H, Qing G. (2018) Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduct Target Ther*, 3: 5.
142. Aulmann S, Adler N, Rom J, Helmchen B, Schirmacher P, Sinn HP. (2006) c-myc amplifications in primary breast carcinomas and their local recurrences. *J Clin Pathol*, 59: 424-428.
143. Aulmann S, Bentz M, Sinn HP. (2002) C-myc oncogene amplification in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat*, 74: 25-31.
144. Corzo C, Corominas JM, Tusquets I, Salido M, Bellet M, Fabregat X, Serrano S, Sole F. (2006) The MYC oncogene in breast cancer progression: from benign epithelium to invasive carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 165: 151-156.
145. Robanus-Maandag EC, Bosch CA, Kristel PM, Hart AA, Faneyte IF, Nederlof PM, Peterse JL, van de Vijver MJ. (2003) Association of C-MYC amplification with progression from the in situ to the invasive stage in C-MYC-amplified breast carcinomas. *J Pathol*, 201: 75-82.
146. Schlotter CM, Vogt U, Bosse U, Mersch B, Wassmann K. (2003) C-myc, not HER-2/neu, can predict recurrence and mortality of patients with node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*, 5: R30-36.
147. Mallya SM, Arnold A. (2000) Cyclin D1 in parathyroid disease. *Front Biosci*, 5: D367-371.
148. Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A. (1991) A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature*, 350: 512-515.
149. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. (2004) Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*, 145: 5439-5447.
150. Elsheikh S, Green AR, Aleskandarany MA, Grainge M, Paish CE, Lambros MB, Reis-Filho JS, Ellis IO. (2008) CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. *Breast Cancer Res Treat*, 109: 325-335.
151. Hosokawa Y, Arnold A. (1998) Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression. *Genes Chromosomes Cancer*, 22: 66-71.

152. Hwang TS, Han HS, Hong YC, Lee HJ, Paik NS. (2003) Prognostic value of combined analysis of cyclin D1 and estrogen receptor status in breast cancer patients. *Pathol Int*, 53: 74-80.
153. He Y, Liu Z, Qiao C, Xu M, Yu J, Li G. (2014) Expression and significance of Wnt signaling components and their target genes in breast carcinoma. *Mol Med Rep*, 9: 137-143.
154. Alvarez-Baron CP, Jonsson P, Thomas C, Dryer SE, Williams C. (2011) The Two-Pore Domain Potassium Channel KCNK5: Induction by Estrogen Receptor α and Role in Proliferation of Breast Cancer Cells. *Mol Endocrinol*, 25: 1326-1336.
155. Clarke C, Madden SF, Doolan P, Aherne ST, Joyce H, O'Driscoll L, Gallagher WM, Hennessy BT, Moriarty M, Crown J, Kennedy S, Clynes M. (2013) Correlating transcriptional networks to breast cancer survival: a large-scale coexpression analysis. *Carcinogenesis*, 34: 2300-2308.
156. Dookeran KA, Zhang W, Stayner L, Argos M. (2017) Associations of two-pore domain potassium channels and triple negative breast cancer subtype in The Cancer Genome Atlas: systematic evaluation of gene expression and methylation. *BMC Res Notes*, 10: 475.
157. Hurtado A, Holmes KA, Geistlinger TR, Hutcheson IR, Nicholson RI, Brown M, Jiang J, Howat WJ, Ali S, Carroll JS. (2008) Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature*, 456: 663-666.
158. Newman SP, Bates NP, Vernimmen D, Parker MG, Hurst HC. (2000) Cofactor competition between the ligand-bound oestrogen receptor and an intron 1 enhancer leads to oestrogen repression of ERBB2 expression in breast cancer. *Oncogene*, 19: 490-497.
159. Perissi V, Menini N, Cottone E, Capello D, Sacco M, Montaldo F, De Bortoli M. (2000) AP-2 transcription factors in the regulation of ERBB2 gene transcription by oestrogen. *Oncogene*, 19: 280-288.
160. Hernandez-Hernandez OT, Camacho-Arroyo I. (2013) Regulation of gene expression by progesterone in cancer cells: effects on cyclin D1, EGFR and VEGF. *Mini Rev Med Chem*, 13: 635-642.
161. Xu J, Chen Y, Olopade OI. (2010) MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer*, 1: 629-640.
162. Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE. (1998) Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol*, 141: 101-114.
163. Ceresa BP. (2012) Spatial regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis. *Int J Mol Sci*, 14: 72-87.
164. Preta G, Cronin JG, Sheldon IM. (2015) Dynasore - not just a dynamin inhibitor. *Cell Commun Signal*, 13: 015-0102.
165. Wang Y, Yang Y, Liu X, Wang N, Cao H, Lu Y, Zhou H, Zheng J. (2012) Inhibition of clathrin/dynamin-dependent internalization interferes with LPS-mediated TRAM-TRIF-dependent signaling pathway. *Cell Immunol*, 274: 121-129.
166. Wehling M. (1997) Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol*, 59: 365-393.
167. Kholodenko BN. (2003) Four-dimensional organization of protein kinase signaling cascades: the roles of diffusion, endocytosis and molecular motors. *J Exp Biol*, 206: 2073-2082.
168. Kim R, Kaneko M, Arihiro K, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Osaki A, Inai K. (2006) Extranuclear expression of hormone receptors in primary breast cancer. *Ann Oncol*, 17: 1213-1220.

169. Kampa M, Pelekanou V, Castanas E. (2008) Membrane-initiated steroid action in breast and prostate cancer. *Steroids*, 73: 953-960.
170. Mintz PJ, Habib NA, Jones LJ, Giamas G, Lewis JS, Bowen RL, Coombes RC, Stebbing J. (2008) The phosphorylated membrane estrogen receptor and cytoplasmic signaling and apoptosis proteins in human breast cancer. *Cancer*, 113: 1489-1495.
171. Straub RH. (2007) The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev*, 28: 521-574.
172. Bernelot Moens SJ, Schnitzler GR, Nickerson M, Guo H, Ueda K, Lu Q, Aronovitz MJ, Nickerson H, Baur WE, Hansen U, Iyer LK, Karas RH. (2012) Rapid estrogen receptor signaling is essential for the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circulation*, 126: 1993-2004.
173. Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, Harvey H, Harvey BJ, Levin ER. (2013) Estrogen reduces lipid content in the liver exclusively from membrane receptor signaling. *Sci Signal*, 6: 2004013.
174. Banerjee S, Chambliss KL, Mineo C, Shaul PW. (2013) Recent insights into non-nuclear actions of estrogen receptor alpha. *Steroids*, 16: 00246-00248.
175. Levin ER. (2009) Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 20: 477-482.
176. Sun CX, Downey GP, Zhu F, Koh AL, Thang H, Glogauer M. (2004) Rac1 is the small GTPase responsible for regulating the neutrophil chemotaxis compass. *Blood*, 104: 3758-3765.
177. Glogauer M, Marchal CC, Zhu F, Worku A, Clausen BE, Foerster I, Marks P, Downey GP, Dinauer M, Kwiatkowski DJ. (2003) Rac1 deletion in mouse neutrophils has selective effects on neutrophil functions. *J Immunol*, 170: 5652-5657.
178. Hordijk PL. (2006) Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res*, 98: 453-462.
179. Kwon T, Kwon DY, Chun J, Kim JH, Kang SS. (2000) Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. *J Biol Chem*, 275: 423-428.
180. Laufs U, Adam O, Strehlow K, Wassmann S, Konkol C, Laufs K, Schmidt W, Bohm M, Nickenig G. (2003) Down-regulation of Rac-1 GTPase by Estrogen. *J Biol Chem*, 278: 5956-5962.
181. Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR. (2000) Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res*, 87: 677-682.
182. Haynes MP, Li L, Sinha D, Russell KS, Hisamoto K, Baron R, Collinge M, Sessa WC, Bender JR. (2003) Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem*, 278: 2118-2123.
183. Davey DA. (2006) Hormone replacement therapy: time to move on? *J Br Menopause Soc*, 12: 75-80.
- 184.
185. Viscoli CM, Brass LM, Kernan WN, Sarrel PM, Suissa S, Horwitz RI. (2005) Estrogen therapy and risk of cognitive decline: results from the Women's Estrogen for Stroke Trial (WEST). *Am J Obstet Gynecol*, 192: 387-393.
186. Billeci AM, Paciaroni M, Caso V, Agnelli G. (2008) Hormone replacement therapy and stroke. *Curr Vasc Pharmacol*, 6: 112-123.
187. Falkeborn M, Persson I, Terent A, Adami HO, Lithell H, Bergstrom R. (1993) Hormone replacement therapy and the risk of stroke. Follow-up of a population-based cohort in Sweden. *Arch Intern Med*, 153: 1201-1209.

188. Finucane FF, Madans JH, Bush TL, Wolf PH, Kleinman JC. (1993) Decreased risk of stroke among postmenopausal hormone users. Results from a national cohort. *Arch Intern Med*, 153: 73-79.
189. Yang XP, Reckelhoff JF. (2011) Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 20: 133-138.
190. Bromley SE, de Vries CS, Thomas D, Farmer RD. (2005) Hormone replacement therapy and risk of acute myocardial infarction : a review of the literature. *Drug Saf*, 28: 473-493.
191. Parsons E, Newby LK, Bhapkar MV, Alexander KP, White HD, Shah SH, Bushnell CD, Califf RM. (2004) Postmenopausal hormone use in women with acute coronary syndromes. *J Womens Health*, 13: 863-871.
192. Shlipak MG, Angeja BG, Go AS, Frederick PD, Canto JG, Grady D. (2001) Hormone therapy and in-hospital survival after myocardial infarction in postmenopausal women. *Circulation*, 104: 2300-2304.
193. Alexander KP, Newby LK, Hellkamp AS, Harrington RA, Peterson ED, Kopecky S, Langer A, O'Gara P, O'Connor CM, Daly RN, Califf RM, Khan S, Fuster V. (2001) Initiation of hormone replacement therapy after acute myocardial infarction is associated with more cardiac events during follow-up. *J Am Coll Cardiol*, 38: 1-7.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- I. Marczell I, Hrabak A, Nyiro G, Patocs A, Stark J, Dinya E, Kukor Z, Toth S, Tulassay Zs, Racz K, Bekesi G: 17-beta-estradiol Decreases Neutrophil Superoxide Production through Rac1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2016, 20:20.; PMID:27437916; doi: 10.1055/s-0042-105556; IF:1,6

- II. Istvan Marczell, Petra Balogh, Gabor Nyiro, Anna L Kiss, Balazs Kovacs, Gabor Bekesi, Karoly Racz, Attila Patocs: Membrane-bound estrogen receptor alpha initiated signaling is dynamin dependent in breast cancer cells. *Eur J Med Res* 2018 Jun 7;23(1):31. doi: 10.1186/s40001-018-0328-7; IF:1,4

Egyéb közlemények:

Módos Dezső, Bulusu Krishna C, Fazekas Dávid, Kubisch János, Brooks Johanne, Marczell István, Szabó Péter M, Vellai Tibor, Csermely Péter, Lenti Katalin, Bender Andreas, Korcsmáros Tamás: Neighbours of cancer-related proteins have key influence on pathogenesis and could increase the drug target space for anticancer therapies NPJ SYSTEMS BIOLOGY AND APPLICATIONS 3:(1) Paper 2. (2017)

Stark J, Varbiro S, Sipos M, Tulassay Z, Sara L, Adler I, Dinya E, Magyar Z, Szekacs B, Marczell I, Kloosterboer HJ, Racz K, Bekesi G: Antioxidant effect of the active metabolites of tibolone GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY 31:(1) pp. 31-35. (2015)

Stark J, Varga Z, Ghidan A, Vajdovich P, Szombath D, Marczell I, Varbiro S, Dinya E, Magyar T, Tulassay Z, Szekacs B, Nagy K, Racz K, Bekesi G: The effect of indomethacin, myeloperoxidase, and certain steroid hormones on bactericidal activity: an ex vivo and in vivo experimental study. ANNALS OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND ANTIMICROBIALS 13:(1) Paper 27. 9 p. (2014)

Szabo DR, Baghy K, Szabo PM, Zsippai A, Marczell I, Nagy Z, Varga V, Eder K, Toth S, Buzas EI, Falus A, Kovalszky I, Patocs A, Racz K, Igaz P: Antitumoral effects of 9-cis retinoic acid in adrenocortical cancer. CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 71:(5) pp. 917-932. (2014)

Stark J, Tulassay Z, Lengyel G, Szombath D, Szekacs B, Adler I, Marczell I, Nagy-Repas P, Dinya E, Racz K, Bekesi G: Increased total scavenger capacity in rats fed corticosterone and cortisol on lipid-rich diet. ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 100:(1) pp. 84-88. (2013)

Adler I, Tulassay Z, Stark J, Marczell I, Nagy-Repas P, Varbiro S, Magyar Z, Szekacs B, Racz K, Bekesi G: The effect of certain steroid hormones on the expression of genes involved in the metabolism of free radicals. GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY 28:(11) pp. 912-916. (2012)

Békési G, Tulassay Z, Lengyel G, Schaff Z, Szombath D, Stark J, Marczell I, Nagy-Repas P, Adler I, Dinya E, Racz K, Magyar K: The effect of selegiline on total scavenger capacity and liver fat content: a preliminary study in an animal model JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION 119:(1) pp. 25-30. (2012)

Marczell I, Tulassay Zs, Békési G, Tóth M, Patócs A, Stark J, Rác K: A sejtfelszíni szteroidreceptorok szerepe és azok klinikai vonatkozásai. MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 65:(5) pp. 289-297. (2012)

Magyar Z, Békési G, Rác K, Fehér J, Schaff Zs, Lengyel G, Blázovics A, Illyés Gy, Szombath D, Hrabák A, Szekács B, Gergics P, Marczell I, Dinya E, Rigo J Jr., Tulassay Zs: Increased Total Scavenger Capacity and Decreased Liver Fat Content in Rats Fed Dehydroepiandrosterone and Its Sulphate on a High-Fat Diet GERONTOLOGY 57:(4) pp. 343-349. (2011)

Köszönetnyilvánítás

Hálával emlékezem *Prof. Rácz Károlyra*, különleges személyiségének emlékét életem végéig hordozni fogom.

Köszönettel tartozom *Prof. Tulassay Zsoltnak* amiért lehetővé tette, hogy a Semmelweis Egyetem II.sz. Belgyógyászati Klinikáján végezzem kutatómunkámat.

Köszönöm *Dr. Békési Gábornak*, témavezetőmnek, hogy mindig önzetlen jóindulattal segítette előmeneteletem. Az általa képviselt tudományos és oktatói szellemiség iránymutatásul és példaképül szolgált az évek során. Csak remélni tudom, hogy további gyógyítói és kutatói tevékenységemet a tőle tanult elvek mentén végezve valamit viszonzozhatok abból a tengernyi segítségből, amiben jóvoltából részesültem.

Külön köszönet illeti *Dr. Patócs Attilát* a rengeteg segítségért, amit PhD munkám során kaptam tőle. Szakmai tudása nélkül a munka nem jöhetett volna létre.

Köszönöm *Prof. Igaz Péternek* a szakmai támogatást, a csapatában eltöltött időszak meghatározta későbbi tudományos érdeklődésemet.

Külön köszönöm *Dr. Stark Júliának*, amiért mindig mindenben segítségemre volt, támogatott a nehéz időszakokban és soha nem hagyott csüggedni.

Köszönöm *Nyíró Gábornak* a rengeteg technikai és egyéb segítséget, illetve a mindig életvidám hozzáállását, melyek nélkül egészen biztosan nem sikerült volna eljutnom a publikációig.

Ezúton fejezem ki köszönetemet *Dr. Hrabák Andrásnak*, a fehérje foszforilációs vizsgálatok során nyújtott temérdek segítségéért. *Dr. Balogh Petrának és Dr. L. Kiss Annának* a fény- és elektronmikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítségükért, illetve értékes szakmai tanácsaikért. Köszönettel tartozom *Dr. Ghidán Ágostonnak*, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet munkatársainak a mikrobiológiai vizsgálatokban nyújtott segítségükért, *Dr. Varga Zsuzsannának és Dr. Vajdovich Péternek* az állatkísérletekben való közreműködésükért. Köszönöm továbbá a Semmelweis Egyetem II.sz. Patológiai Intézet munkatársainak, hogy rendelkezésemre bocsátották a szükséges sejtvonalatokat, illetve a munkám során nyújtott segítséget. Nagy segítségemre voltak a Központi Izotópdiaosztikai és Endokrin Laboratórium munkatársai is, az Endokrinológiai Genetika Laboratórium volt és jelenlegi Ph.D. hallgatói és munkatársai, akik barátsággal vettek körül munkám során. *Köszönettel tartozom Dr. Sármán Beatrixnak és Dr. Reismann Péternek* az intézeti bírálói feladatok vállalásáért.

Köszönöm csodás feleségemnek a rengeteg szeretetet és segítséget, mellyel a dolgozat megírása során támogatott. Me

Köszönettel tartozom továbbá szüleimnek, testvéreimnek, akik segítségükkel és megértésükkel az egyetemi évek után is kitartóan hozzájárultak doktoranduszi tevékenységemhez.