

Az ösztrogén jelátvitel jelentősége a neutrofil granulociták szabályozásában és emlőrák sejtvonalon

Doktori tézisek

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

Bevezetés	2
Célkitűzések.....	3
Módszerek.....	4
Eredmények	9
Következtetések	15
Saját publikációk jegyzéke:	16

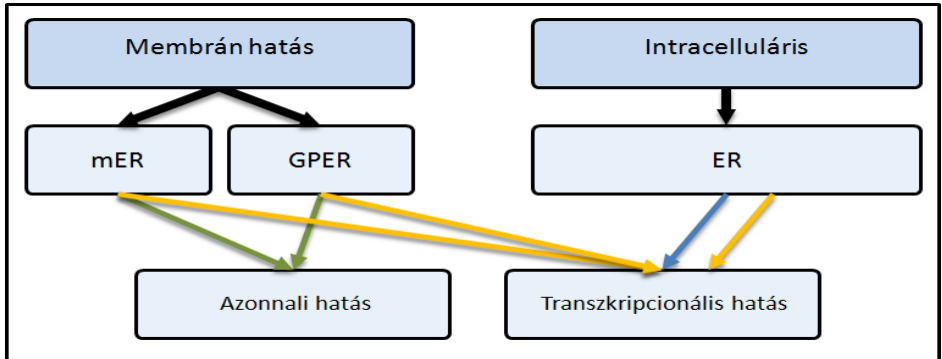
Bevezetés

A szteroid magreceptorok felfedezése és a receptorok ligand indukált transzkripció faktoroként való működésének felismerése nyitotta meg a szteroid hatások megértésének modern korszakát. Selye János már a szteroidokkal kapcsolatos vizsgálatok hajnalán megfigyelte a progeszteron azonnali anesztetikus hatását. Tette ezt anélkül, hogy sejtelve lehetett volna arról, hogy ezekért a fenti magreceptorokkal együtt működő szteroid membránreceptorok tehetők felelőssé.

Az ösztrogén jelátvitelének feltérképezése napjainkban élénk kutatások tárgya, döntően az ösztrogén dependens emlőrákoki antiösztrogén terápiája, illetve egyes központi idegrendszeri és immunsejtekhez köthető azonnali ösztrogén hatások miatt. Jelen ismereteink szerint a membrán asszociált ösztrogén receptorok a magreceptor rendszerrel párhuzamosan, azzal együttműködve vesznek részt a szteroid hatás kialakításában. A membrán receptorok két szerkezeti csoportba oszthatóak. A klasszikusnak is nevezett intracelluláris ösztrogén magreceptorok (döntően az ER α -ról vannak ismereteink) membránba helyeződésével alakul ki a mER receptor populáció. A receptorok membránba épülését egy palmitoilsavval történő konjugáció teszi lehetővé, melyet a DHHC7 és DDHC21 enzimek végeznek. Az oldalláncok révén a mER a membránban egy szignáloszómának nevezett komplexben helyezkedik el, ahol másodlagos hírvivő molekulák révén több fontos élettani folyamat szabályozásában is részt vesz. A membrán asszociált ösztrogén receptorok másik szerkezeti csoportjába a G-protein kapcsolt ösztrogén receptor (GPER, korábbi nevén GPR30) tartozik, mely a klasszikus ösztrogén receptoroktól teljesen eltérő szerkezetű fehérje, szerepe például az endoteliális NO szintézis kapcsán tűnik jelentősnek.

Dolgozatomban emlőrák sejtvonalon, illetve humán neutrofil granulocitákon végzett vizsgálataink eredményeit mutatom be. Az emlőrák modell esetében a membrán ösztrogén receptorok proliferatív potenciálját igyekeztem meghatározni. A receptorok eltérő elhelyezkedésük és jellegük miatt új támadáspontot jelentenek az ösztrogén jelátvitelében. Munkám során megvizsgáltam, milyen hatással van a membrán receptorok szelektív gátlása az ösztrogén proliferatív hatására.

A 17- β -ösztrodiol neutrofil granulocitákon keresztüli antioxidáns, gyulladáscsökkentő hatását mások mellett saját munkacsoportunk is igazolta. E hatás hátterében a rövid válaszidő miatt a magreceptorok szerepe valószínűtlen, de a pontos jelátviteli útvonal ismeretlen. Ennek pontosabb feltérképezése volt a célom a neutrofil modell esetében.



I.ábra

Az ösztrogén támadáspontjainak és hatásainak felosztása

Az ábrán a színes nyilak jelölik a különböző hatástartamokat. A zöld nyíl az azonnali, a sárga a középtávú, a kék a hosszútávú hatást jelöli. (mER – membrán asszociált klasszikus ösztrogén receptor, GPER - G-protein kapcsolt ösztrogén receptor, ER ösztrogén (mag)receptor)

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 szabályozza a 17β-ösztradiol szuperoxid termelésre kifejtett gátló hatását neutrofil granulocitákban?

Módszerek

Az MCF7 sejtekkel végzett vizsgálatok során alkalmazott módszerek Sejtenyésztés

Az MCF7 emlőrák sejtvonalat a Semmelweis Egyetem II.sz. Patológiai Intézet adományozta munkacsoportunknak. A sejteket a vonatkozó ATCC tenyésztési protokollnak megfelelően, RPMI-1640-es tápoldatban tenyésztettük, melyet 10% marha szérum albuminnal, illetve antibiotikummal (penicillin (100 E/ml) és sztreptomycin (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.

Kezelések

Az E2-BSA bomlása során megjelenő ösztrogén eltávolítására egy általánosan alkalmazott filtrációs technikát alkalmaztunk, közvetlenül a kezeléseket megelőzően. Ezentúl tömegspektrometriás vizsgálattal is igazoltuk, hogy csak jelzett mennyiségű szabad ösztrogén van jelen az oldatban. Az E2-BSA-t 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 számolhattunk. A méréseket három párhuzamos ismétléssel végeztük el minden koncentráció esetében.

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

A GPER agonista G1-et, illetve az internalizáció gátló dynasort 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 80µmol volt. A dynasor oldatot 30 perccel az ösztrogén kezelése előtt adtuk az oldathoz. Mindkét kezelés esetében három párhuzamos mérést végeztünk.

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

Minden kezelést követően a sejteket a további feldolgozásig Trizol® reagensben tároltuk -80 C°-on.

Expressziós vizsgálatok:

A microarray vizsgálatok meta-analízise

A microarray adatokat a Gene Expression Omnibus és az 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

alkalmazták, 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. A 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, és bizonyítottan jól teljesít microarray chipek esetében is.

A rank product módszert R programnyelvre implementálva alkalmaztuk egy a Bioconductor 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). A pfp egy permutációkon alapuló eljárás során kerül kiszámításra, esetünkben a permutációk száma 50 000 volt, további vizsgálatra 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.

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

Az MCF7 sejteket 25 cm²-es flasksokban tenyésztettük, az RNS izolálást átlagosan 2x10⁶-os sejtszámnál végeztük el. Az RNS tisztítás Trizol[®] Plus RNA Purification Kittel történt, a gyártó előírásainak megfelelően. 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 segítségével. Az rtPCR-hoz használt próbákat a TaqMan[®] Gene Expression Assayek közül választottuk ki.

A vizsgálathoz szükséges housekeeping génnek RPL13A-t választottuk ki. A mérések során a TaqMan[®] Fast Advanced Master Mixet használtuk, Uracil-N glikoziláz enzim (UNG) hozzáadása nélkül. A 7500 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 módszert alkalmaztuk. A G1-el a dynasorral végzett vizsgálatok esetében Student-féle t-próbát használtunk; a szignifikancia szint $p < 0,05$ volt.

Képkalkító vizsgálatok

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 5 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 nitrobenben 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.

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 párasított 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 szkennelrel végeztük. A képek elkészítéséhez a Lasersharp 2000 nevű szoftvert használtunk, az utólagos fényerő és kontraszt beállításokat az Adobe Photoshop 7.0 programmal végeztük. A dupla jelölések előtt minden antitestet gondosan, több koncentrációban leteszteltük primer antitestként, valamint minden vizsgálat során készültek negatív kontrollok, a fals pozitivitás elkerülésére.

A neutrofilekkel végzett vizsgálatok során alkalmazott módszerek

Sejtszeparáció

A perifériás vérmintákat 25-65 év közötti, egészséges, gyógyszert nem szedő nőktől (n=4 illetve n=5 a baktericid hatás vizsgálatánál) illetve férfiktól (n=6 mindkét vizsgálat esetében) 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

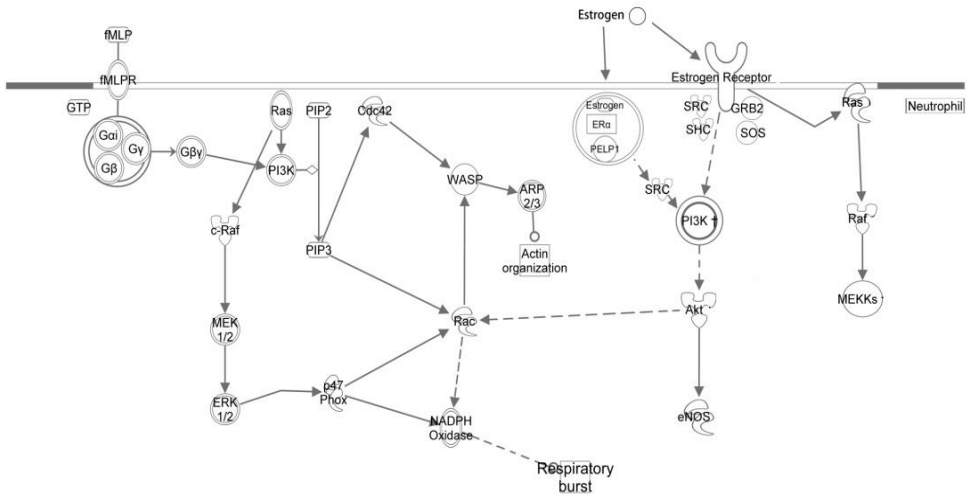
sejt aggregátumot néhány milliliter Hank-oldatban reszuszpendáltuk, majd Türk-oldatban meghatároztuk a sejtszámot. A beállított sejt koncentráció $10^7/\text{ml}$ volt a protein foszforilációs vizsgálatokhoz, és $5 \times 10^6/\text{ml}$ volt minden egyéb vizsgálat során.

Protein foszforiláció és útvonal analízis

A szeparált neutrofil granulocitákat három különböző koncentrációban (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-7}M) 10 percig kezeltük $17\text{-}\beta$ -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 kötésen 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. A 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 2. ábrán ábrázoltuk.



2.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 hírvivők 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.

Az fMLP stimuláció hatására jelentkező szuperoxid produkció mérése

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

A vizsgálat első részében a neutrofileket 10 percig $17\text{-}\beta$ -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.

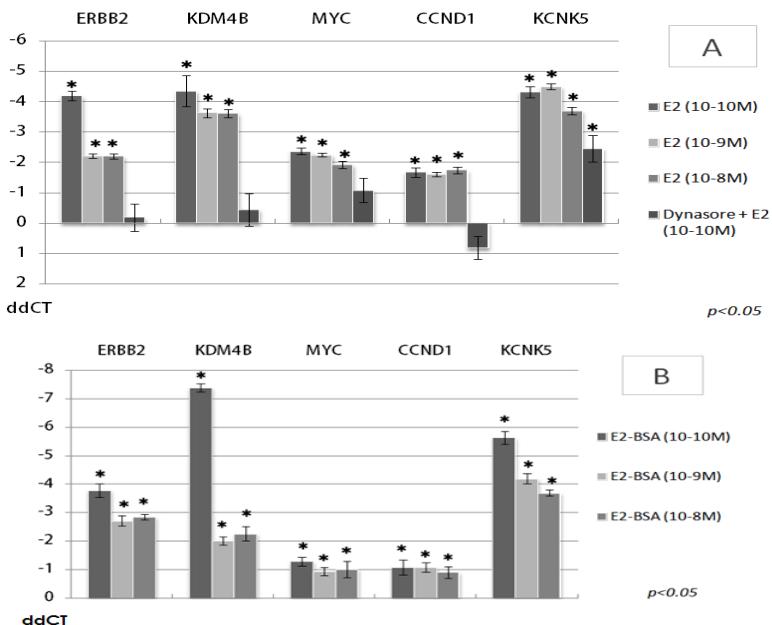
Minden csoportban 5-8 párhuzamos mérést végeztünk, az eredmények interpretálásához az értékeket a kontroll százalékában adtuk meg, melyet 100%-nak tekinttünk. A statisztikai analízishez t-próbát alkalmaztunk, a szignifikancia szintet $p < 0,05$ -ben határoztuk meg. A számításokhoz a Statistica 7.0 szoftvert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

Eredmények

Az MCF7 sejtekkel végzett vizsgálatok eredményei

Az MCF7 sejtek ösztrogénre adott proliferatív válaszáának kulcs génjeit microarray vizsgálatok meta-analízise során azonosítottuk, melyhez a rank product módszert alkalmaztuk, R programnyelvre implementálva. Az azonosított gének döntően az ösztrogén proliferatív hatásának közvetítésében, esetleg magában az ösztrogén jelátvitelben játszanak központi szerepet.

A qRT-PCR mérések során - az elvártak megfelelően - az ösztrogén esetében valamennyi gén szignifikáns expresszió növekedést mutatott. Fontos eredmény, hogy a membrán impermeabilis E2-BSA esetében az ösztrogénhez nem csak jellegében, de mértékében is hasonló expressziós változást figyeltünk meg. A CCND1 és MYC gének expressziós növekedése kevésbé volt kifejezett, míg a KDM4B esetében még az ösztrogénnél jelentősebb növekedést tapasztaltunk. Érdekes eredménye, hogy a G1 kezelés csak a KCNK5 gén esetében indukált szignifikáns expresszió növekedést. (3. ábra)



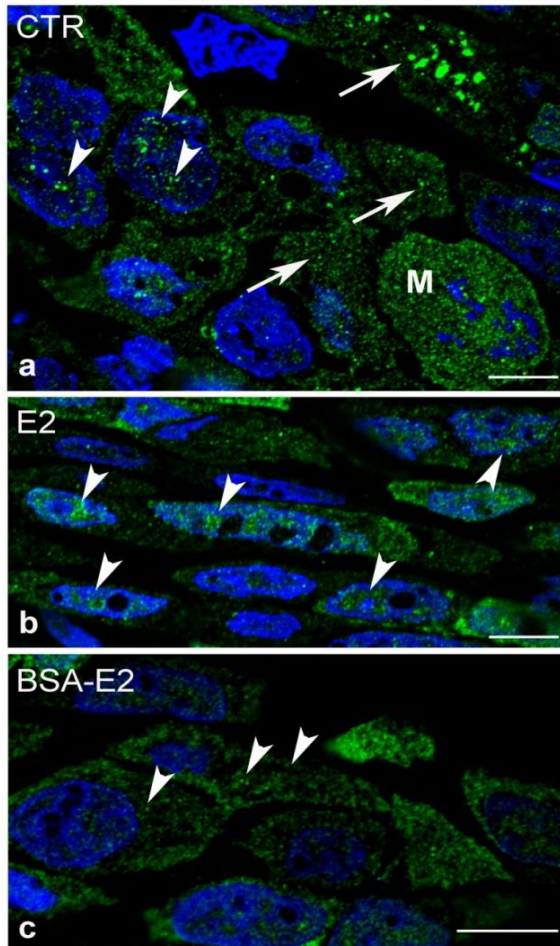
3. ábra

Génexpresszió változások 17 β -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) 17- β -ösztradiol (A), illetve ösztrogén-BSA (B) kezelést követően. Az első diagramon az ösztrogén kezelés hatás 30 perces dinamin 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 képalkotó vizsgálatok megerősítették a membrán receptor internalizáció gátlását, az expressziós vizsgálatok alapján e gátlás jelentős hatással van a vizsgált génnek expressziójára. A kontroll mintákban az ER α jelölés a citoplazmában és a sejtmembránban volt megfigyelhető, míg a 17 β -ösztradiol kezelés hatására a receptorok a sejtmagba vándoroltak. A membrán specifikus kezelést követő felvételeken az ER α jelölés döntően a sejtmembránban, illetve a citoszolban volt megfigyelhető, vagyis a magreceptor magba kerülése nem következett be. Az internalizáció dinaminon keresztüli gátlása jól vizualizálható volt az elektronmikroszkópos felvételeken. A lefűződés elmaradása miatt megnyúlt, deformálódott kaveolákban nagy számban voltak megfigyelhetőek az ER α jelölés során alkalmazott arany partikulumok.

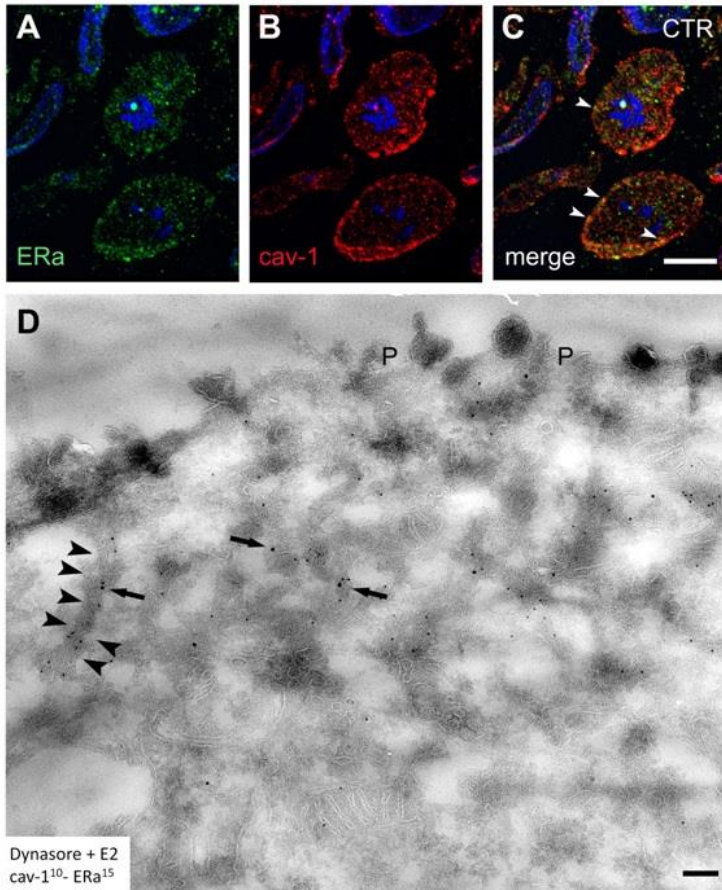
Vizsgálataink alapján az ösztrogén indukálta proliferációs válasz közvetítésében mind a membrán kötött „klasszikus” ösztrogén receptor (mER), mind a GPER részt vesz, illetve elmondható, hogy az előbbi szerepe tűnik meghatározónak. Az internalizáció gátló kezelés vizsgálata során pedig igazolódott, hogy a kaveolin pozitív lipid raftokban elhelyezkedő mER internalizációja dinamin gátlás mellett meghiúsul, ezzel párhuzamosan pedig a transzkripcionális hatás is elmarad.



4. ábra

Az ER- α sejten belüli eloszlása a különböző ösztrogén agonista kezeléseket követően

A kezeletlen MCF7 sejtek esetében (A) az ER- α jelölés pontátumok/aggregátumok formájában mind a magban (nyilak) mind a citoplazmában megjelent. Az M-mel jelölt mitotikus sejtkben intenzív ER- α festődést láthatunk. Az ösztrogén kezelés után (B, 2 min, 10^{-8} M/l) a receptorok főként a sejtmagban mutatkoztak (nyilak), míg ösztrogén-BSA kezelést követően elsősorban a citoplazmában, illetve a sejt membrán közelében ábrázolódott intenzív festődés (nyilak). A képekhez a sejtmagokat DAPI-val festettük. (A jobb alsó sarokban feltüntetett vonal $10\mu\text{m}$ -nek felel meg.) (CTR - kontroll, E2 – ösztradiolal kezelt sejtek, BSA-E2 - ösztrogén-szarvasmarhaszérum-albumin komplexszel kezelt sejtek)



5. ábra

A dynasore lefűződést gátló hatása elektronmikroszkópos felvételen

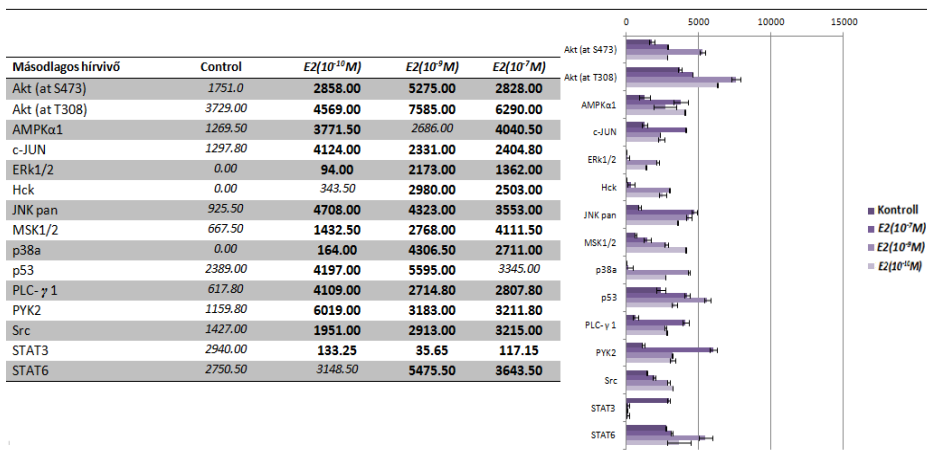
Az elektronmikroszkópos felvételeken jól kivehetőek az ERA jelölésére használt arany partikulumok (nyilak). A dinamin gátlás hatására meghiúsuló lefűződés deformálódott kaveolák kialakulását eredményezte. A membrán receptorokon keresztül transzkripcionális hatás ennek hatására szinte megszűnt.

A neutrofil granulocitákkal végzett vizsgálatok eredményei

A mérések során 43 különböző másodlagos hírvívő molekula foszforiláltsági szintjét monitoroztuk ösztrogén és/vagy fMLP kezelést követően. A foszforilációs szintek alapján útvonal analízist végeztünk, több szoftver segítségével. Az útvonal elemzés eredménye alapján döntően az ösztrogén jelátvitelben jelentős fehérjék foszforilációja változott szignifikánsan, de valamennyi változás szorosan köthető volt az ösztrogén jelátvitelhez. Noha a protein foszforilációs készlet csak az fMLP jelátvitelének egy

hányadát vizsgálja, az fMLP-vel is végeztünk méréseket, a beállítás validálására. A kezelés során valamennyi változás megfelelt a várt eredménynek, a foszforilációs változások megfeleltethetőek voltak az fMLP ismert útvonalának.

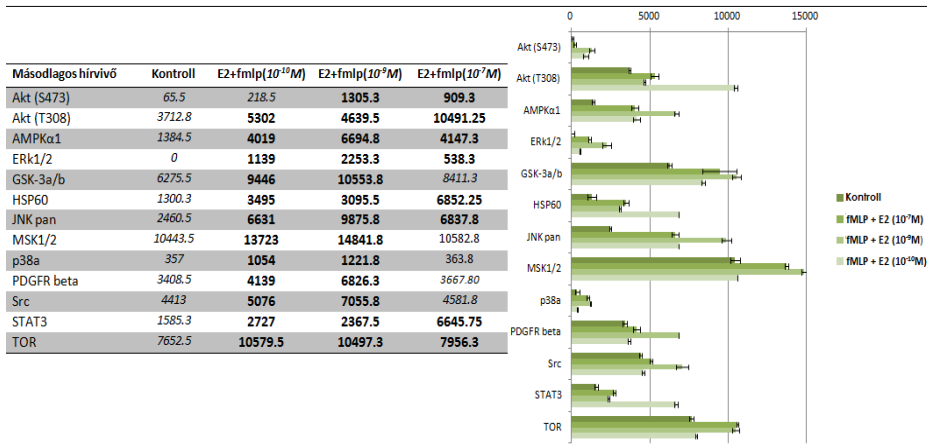
A kombinált ösztrogén és fMLP kezelések során tapasztalt foszforilációs változások megfeleltek a két kezelés szummációs képének, noha az ösztrogén indukált változások egy része nem érte el a szignifikancia határát. Az ösztrogén kezeléshez képest öt hírvívő molekula mutatott szignifikáns eltérést, melyek az fMLP jelátvitelhez köthetőek (GSK3, HSP60, PDGFR β , mTOR). A GSK3, a HSP60 és az mTOR egyértelműen az fMLP kezelés eredményei lehetnek, a vélemezke eredetű növekedési faktor receptor béta (PDGFR β) pedig mint kemotaktikus receptor már leírt [131], ám fMLP esetében a szerepe tisztázatlan. A foszforilációs vizsgálatok eredményei a 6. ábrán kerültek feltüntetésre.



6.a - ábra

A neutrofil granulociták ösztrogén és fMLP kezelését követően mért foszforilációs változások

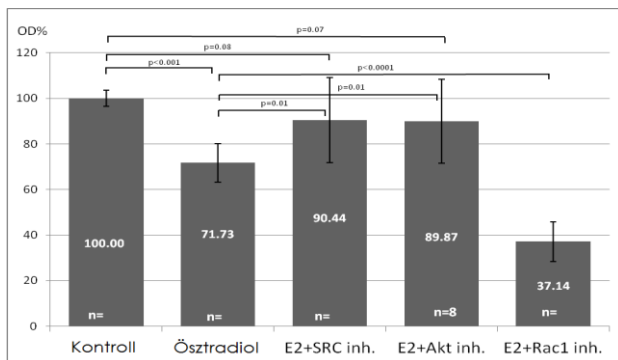
Az „A” táblázatban a 17 β -ösztradiol kezeléseket követően mért fehérje foszforilációkkal arányos intenzitás értékek átlagai láthatóak, a jobb oldalon pedig ugyanez színes oszlop diagrammon. Az felsorolt hírvívő molekulákat a módszerek részben taglaltak szerint határoztuk meg. A táblázatban vastagon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



6.b - ábra

A neutrofil granulociták ösztrogén és fMLP kezelését követően mért foszforilációs változások A „B” táblázatban a 17β -ösztradiol és fMLP kezelések eredményei láthatóak.

A szuperoxid produkció mérésén keresztül monitoroztuk az azonosított útvonal szelektív gátlószereinek hatását. A 17β -ösztradiol az előzetes várakozásoknak megfelelően szignifikánsan csökkentette a szuperoxid produkciót. Az útvonal elemeinek gátlása az ösztrogén hatást pedig szignifikánsan mérsékelte. (7. ábra) Ez alól csak a Rac1 jelentett kivételt, mely a szuperoxid gyök termelésért felelős NADPH oxidáz enzim szabályozását végzi. E fehérjének fontos szerepe van neutrofilek kemotaxisának, illetve a szabadgyök termelésének szabályozásában. 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. (2. ábra)



7. ábra

fMLP indukált szuperoxid produkció az egyes kezelések esetén

Az ösztrogén szignifikánsan csökkentette az fMLP hatására felszabaduló szuperoxid mennyiségét. Ezt a hatást az azonosított útvonal elemeinek szelektív gátlása szignifikánsan csökkentette. A javasolt útvonalban az ösztrogén a membrán asszociált receptorokon keresztül gátolja a Rac1-et. Ennek gátlása a NADPH oxidáz enzimen keresztül erőteljes szuperoxid szint csökkentő hatással bír.

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 képalkotó 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 transzkripció választ.
5. A foszforilációs vizsgálatok alapján elmondható, hogy a 17 β -ösztradiol neutrofilek szuperoxid produkciójára kifejtett hatása a Rac1 gátlásán keresztül megvalósul.

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. Marczell I, Balogh P, Nyiro G, L Kiss A, Kovacs B, Bekesi G, Racz K, 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)