

Az ösztradiol és ösztrogén receptor alfa
lehetséges szerepe a TGF- β indukálta II. típusú hám-
mesenchyma átalakulás és az ezt követő regeneráció
folyamataiban hashártya mesothel sejtekben

Doktori tézisek

dr. Balogh Petra

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola
Semmelweis Egyetem



Témavezető: Dr. L. Kiss Anna, C.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Kiss András Ph.D
Dr. Molnár Kinga Ph.D

Szigorlati Bizottság elnöke: Dr. Tretter László, DSc

Szigorlati Bizottság tagjai: Dr. Darvas Zsuzsanna Ph.D
Dr. Löw Péter Ph.D

Budapest, 2014

1. Bevezetés

A hám-mesenchyma átalakulás (EMT) során a polarizált hámsejt számos biokémiai és morfológiai átalakulást követően mesenchymális fenotípust nyer el (Kalluri&Weinberg 2009). Az EMT folyamatát elsőként Elisabeth Hay írta le, és világított rá az egyedfejlődés során és a tumorigenezis kapcsán lejátszódó sejtszintű folyamatok különbözőségére (Hay 2005). Az EMT-nek három típusát különböztetjük meg, melynek mindegyike eltérő funkcionális szereppel bír. A fejlődés alatt zajló (I. típus) és tumorigenezis kapcsán leírt (III. típus) hám-mesenchyma átalakulás mellett, megkülönböztetjük a II. típusú EMT-t, mely a sebgyógyulás, szöveti regeneráció és fibrózis folyamataihoz kapcsolt fenotípusos változás (Sodek és mtsai 2012, Yanez Mó és mtsai 2003). Korábbi adatokból ismert, hogy gyulladás hatására számos sejttípus (monocytá/makrofág, fibroblastok) képes beindítani a II. típusú EMT-t különböző növekedési faktorok, mint például a transforming growth factor-beta (TGF- β) vagy epidermalis növekedési faktor (EGF) szekréciója révén. A TGF- β a kanonikus Smad2/3-dependens útvonalon keresztül indítja el és szabályozza a hám/mesenchyma átalakulást. Újabb irodalmi adatok azonban azt mutatják, hogy a citokin hatását számos Smad-independens szignál útvonal (pl. MAP kináz) módosítja, egészíti ki (Zavadil&Böttinger 2005, Derynck&Zhang 2003, Massagué 1998). A TGF- β univerzális szerepe az EMT folyamataiban egyértelmű, ahogy jól ismert a folyamat biokémiai háttere is. Azonban kevés morfológia adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy milyen intracitoplazmatikus kompartmentumokban (korai endoszómák, caveolák, multivezikuláris testek) lokalizálódnak az útvonal egyes elemei és hogyan változik a szignál molekulák eloszlása a jelátvitel dinamikájával párhuzamosan. Ugyancsak érdekes kérdés, hogy az egyes kompartmentumok befolyásolják-e a jelátvitel aktivitását, és ha igen elősegítik vagy leállítják azt?

Általánosan elfogadott tény, hogy a TGF- β ligand-receptor komplex kétféle endocitotikus útvonalon keresztül internalizálódhat. Az egyik útvonal a jól ismert clathrin-burkos vezikulák segítségével végbemenő endocitózis. A klasszikus clathrin-dependens endocitózis során a receptor-ligand komplex az internalizációt követően EEA1 (korai endoszóma marker) pozitív korai endoszómákba irányítódik. A korai endoszómák központi szerepe a TGF- β jelátvitel elősegítésében mára már teljesen

elfogadott és egyértelmű. A korai endoszómák foszfatidil-inozitol-3-foszfát tartalmú membrándoménjeik segítségével különböző adapter fehérjék (pl. SARA) kapcsolódását biztosítják membránjukhoz, ezáltal „odatoboroznak” jelátviteli molekulákat is és mint szignalizációs központok segítik ezen fehérjék (pl. Smad2/3) hatékonyabb foszforilációját. Az endocitózist követő lizoszómális degradáció magába foglalja a multivezikuláris test (MVB) képződését is. A multivezikuláris testek köztes állomás a „korai” és a lizoszómákkal összolvadni képes „késői” endoszóma állapotok között. Az érési folyamat a korai endoszómák szintjén indul el, a multivezikuláris testek az endoszóma membrán befűződésével nyerik el jellegzetes morfológiájukat: bennük számos, egységnyi méretű intraluminális vezikulum (ILV) figyelhető meg (Gruenberg&Maxfield 1995, Felder és mtsai 1990). Az intraluminális vezikulumok képződésével számos membránfehérje kerül a multivezikuláris testek lumenébe. A folyamat egy 350 kDa nagyságú fehérjekomplex, az ún. ESCRT komplex (endosomal sorting complexes required for transport) segítségével megy végbe. A korai endoszómák ESCRT komplex tartalmú membránja felismeri és megkötö az ubiquitinált carget. A MVB lumenének savasodása után végbemegy a lizoszómákkal való fúzió. A sejtfelszíni receptorok intraluminális vezikulumokba való szortírozása és az ezt követő lizoszómális degradációja tehát nélkülözhetetlen a jelátviteli események szabályozásában (Katzmann et al 2001). Az endoszómák („korai”, MVB, „késői”) határoló membránjának aszimmetrikus felépítése mindezek mellett valószínűleg az egyedi szignálok kialakításához is biztosít fizikai felületet (Hanson&Cashikar 2012).

Kevésbé ismert az internalizáció másik lehetséges útvonalának, a caveolák közvetítésével végbemenő endocitózisnak a szerepe és jelentősége a TGF- β jelátviteli folyamatokban. A caveolák omega vagy palack alakú plazma membrán befűzések, melyek számos folyamatban játszanak szerepet, például felvételi folyamatok (endocitózis), szignál transzdukció, sejtnövekedés szabályozása és sejthalál. Ismert tény, hogy a TGF- β receptorok caveolin-1 pozitív plazmamembrán doménekben is megtalálhatók és caveola-mediált útvonalon is internalizálódnak. Hosszú ideig vitatott volt, hogy a caveolák közreműködésével végbemenő endocitózisnak milyen citoplazmatikus kompartmentum(ok) a végállomása(i). Mára már elfogadott tény, hogy a caveoláris endocitózis is a degradatív (lizoszómális) útvonalra szállítja az általa felvett ligandokat. A kérdés azonban az, hogy a korai endoszómák ennek az útvonalnak is a

köztes állomások (Hayer és mtsai 2012), és hogy a multivezikuláris testek keletkezése része-e a folyamatnak. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a caveoláris endocitózis a korai endoszómák közreműködésével a TGF- β jelátvitel molekuláit a degradatív útvonalra irányítja, így módon a szignál leállításában játszik szerepet.

Újabb kísérleti eredmények alapján felvetődik, hogy az EMT folyamatában a TGF- β jelátviteli molekulák mellett más szabályozó, finoman hangoló molekulák is szerepet játszanak. Az egyik ilyen lehetséges molekuláris szabályozó az ösztrogén receptor α (ER- α) (Guttila és mtsai 2012, Ye és mtsai 2010, Planas-Silva&Waltz 2007). A klasszikus elképzelés szerint az ösztrogén receptorok transzkripciós faktorként a magban fejtik ki hatásukat (Beato és mtsai 1995). Ez az elképzelés azonban a plazmamembránhoz kötött, ott jelenlévő ER pool és a ligand independens ER-mediált hatások felfedezésével megváltozott. Napjainkban már teljesen elfogadott tény, hogy az ösztrogén receptor populáció egy kisebb százaléka (5-10%) jelen van a plazmamembránon, és különböző jelátviteli útvonalak (MAP kináz, protein kináz C, Src kináz, PI3K) aktiválásán keresztül non-genomikus, és genomikus hatásokat egyaránt képes kiváltani (Levin 2009, Song&Santen 2006, Song és mtsai 2005, Simoncini és mtsai 2004, Razandi és mtsai 1999, Migliaccio és mtsai 1996, Pietras&Szego 1977). Mostanra egyértelművé vált, hogy a hormon-independens ER- α aktiváció valószínűleg növekedési faktor útvonalak aktivitását segíti (Hall és mtsai 2001).

Az ösztrogén receptorok természetes ligandja, az ösztradiol (E2), jól ismert morfogén. Számos adat ismert arra vonatkozóan, hogy a gonadális szintézis mellett ösztrogén extragonadálisan (zsírsejtekben, osteoblastokban (Bruch és mtsai 1992), chondrocytáknban, vasculáris endothel sejtekben (Bayard és mtsai 1995), aorta simaizom sejtekben (Murakami és mtsai 1998), agyszövetben (Labrie és mtsai 1997) is termelődik. Így az E2 nemcsak mint endokrin faktor van jelen a szervezetben, de előfordulása extragonadális környezetben, lehetővé teszi, hogy lokálisan, mint paracrin/intracrin faktor fejtsen ki biológiai hatást (Simpson és mtsai 2000, Labrie és mtsai 1998, Labrie és mtsai 1997). Fontos hangsúlyozni, hogy az E2 ezeken a helyeken valószínűleg csak *in loco* hat, de a magas lokális koncentrációk jelentős biológiai hatással bírnak (Simpson és mtsai 1999).

Az eukarióta sejtek alapvető sejtbiológiai folyamatai közül az autofágia (a sejtek önmészto folyamata) a hosszú életidejű fehérjék lebontásáért, valamint a sérült,

felesleges vagy előregedett sejtorganellek eltávolításáért és turnoveréért felelős. A makroautofágia folyamata kiemelt jelentőségű a szöveti újjászerveződésben, a remodellingben, és mint alapvető biológiai folyamat szerepet játszik immun/inflammatorikus reakciókban. Irodalmi adatok utalnak arra, hogy az ösztrogén (ösztradiol) lehet az egyik lehetséges kiváltója a gyógyulás folyamatában, az eredeti morfológia „visszaállításában” szerepet játszó autofágiának a hormon independens, extragonadális szövetekben (Yang és mstai 2013).

2. Célkitűzések

- I. Előzetes fénymikroszkópos vizsgálataink során igazoltuk, hogy a patkány hashártya mesothel sejtei fenotípusos változáson mennek keresztül Freund adjuváns kezelés hatására. Kísérleteink első szakaszában ultrastruktúrálisan is igazolni kívántuk, hogy a megfigyelt változások valóban az irodalomban leírt hám-mesenchyma átalakulás lépéseivel megegyeznek. Tekintettel arra, hogy a TGF- β az EMT fontos szabályozója, arra is választ kerestünk, hogy vajon a citokin jelen van-e illetve szerepet játszik-e a Freund adjuváns indukálta gyulladásos folyamatban *in vivo*. Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:
- 1) Milyen ultrastruktúrális változások figyelhetők meg a gyulladás és az ezt követő regeneráció során hashártya mesothel sejteiben *in vivo* körülmények között?
 - 2) A kezelés hatására a hasüregben jelen vannak-e ill. termelődnek-e a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó proinflammatorikus citokinek (IL-1, IL-6)?
 - 3) Jelen van-e a TGF- β a hasüregben, és ha igen, hogyan változik a szekréciója a Freund adjuváns indukálta gyulladás során?
 - 4) Jelen vannak-e a kanonikus TGF- β jelátviteli útvonal elemei (T β RII/Smad7) mesothel sejtekben? Ha igen, hogyan változik ezen molekulák sejten belüli eloszlása/kompartmentalizációja a gyulladás során?
 - 5) Van-e szerepe a caveoláris internalizációnak a TGF- β jelátviteli folyamat aktivitásának szabályozásában?
- II. Tekintettel arra, hogy az EMT folyamatának szabályozásában a TGF- β jelátviteli molekulák mellett az ösztrogén receptor α (ER- α) is részt vehet (az ER- α és TGF- β sejt- és szövetspecifikusan ellentétes hatást fejtenek ki), munkánk következő szakaszában arra kerestünk választ, hogy az ER- α jelen van-e mesothel sejtekben. A kérdés felvetést korábbi vizsgálataink eredményei indokolták: Freund adjuváns kezelés hatására a mesothel sejtek makrofág jellegű sejtekké differenciálódhatnak, ily módon a mesothel sejtek gyulladás során forrásául szolgálhatnak a hasüri folyadékban nagy

mennyiségben megjelenő makrofágoknak. Jól ismert, hogy a makrofágok ER- α -t expresszálnak. A következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

- 1) A mesothel sejtek valóban expresszálnak-e ER- α -t, ha igen milyen ezen receptor sejten belüli eloszlása?
 - 2) Hogyan változik a fehérje expressziója és citoplazmatikus eloszlása gyulladásos körülmények között?
 - 3) Vannak-e olyan citoplazmatikus organellek, ahol az ER- α található (találkozhat) a TGF- β útvonal molekuláival (caveolák, multivezikuláris testek)?
 - 4) Van-e a receptornak természetes ligandja a hasüregben, és ha igen, hogyan változik a hormon szekréciónak szintje a gyulladás/regeneráció fázisaiban?
3. A gyulladást követő fázisban megfigyelt emelkedett E2 szint fölvetette a lehetőséget, hogy a hormon esetleg a regenerációban játszik szerepet. Újabban vált ismertté, hogy a szex szteroidok autofágia beindításán keresztül segítik a szöveti újjászerveződést, regenerációt. A következő kérdésekre szeretnénk volna választ kapni:
- 1) Megfigyelhető-e autofágia a mesothel sejtekben a gyulladás/regeneráció fázisaiban, ha igen, mutat-e a folyamat összefüggést a szekretált E2 időbeni szekréciónak szintjével?
 - 2) Vajon az E2 nélkülözhetetlen az autofágia folyamatában vagy esetleg más hatások (TNF- α) is érvényre jutnak?

3. Anyag&Módszer

Anyag: Kísérleteinkhez kontroll és Freund adjuvánssal kezelt hím Sprague-Dawley patkányokból eltávolított mesentériumot (vékonybél peritoneum) használtunk. 1 ml komplett Freund's adjuvánst injektáltunk az állatok hasüregébe, majd a kezelést követő első napon (D1), második napon (D2), harmadik (D3), ötödik (D5), hatodik (D6), nyolcadik (D8) és tizenegyedik napon (D11) az állatokat dekapitáltuk. Az így nyert mesentériumot további morfológiai vizsgálatokhoz dolgoztuk föl, illetve az izolált mesothel sejteket biokémiai vizsgálatokhoz használtuk.

A kísérletekben alkalmazott technikák:

- egyes és kettős immunjelölés fagyasztott félvékony metszeteken
- kettős immunjelölés fagyasztott ultravékony metszeteken (Tokuyashu-technika)
- hagyományos elektronmikroszkópia
- mesothel sejtek izolálása kollagenázos emésztéssel
- immunprecipitáció és Western blot analízis izolált mesothel sejtekből nyert teljes sejt lizátumból
- izolált mesothel sejtekből nyert extractumból mRNS expressziós vizsgálatok kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (qRT-PCR)
- chemiluninescence immunoassay hormon detektálására szérumból és hasúri folyadékából

4. Eredmények

4.1 A TGF- β indukálta hám-mesenchyma átalakulás morfológiai és biokémiai karakterizálása mesothel sejtekben

4.1.1 Az EMT-t bizonyító ultrastrukturális változások

Előzetes fénymikroszkópos vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy Freund adjuváns kezelés hatására a mesothel sejtek jellegzetes változásokon - hám-mesenchyma átalakuláson (EMT) - mennek keresztül: elveszítik laphám jellegüket (csökken a citokeratin és E-kadherin – hám markerek – expressziója) és morfológiájukat, és mesenchymális markert - vimentint - expresszálnak illetve köbhám jellegű sejtekké alakulnak (Katz és mtsai 2012). Munkánk első szakaszában ultrastrukturális vizsgálatokkal követtük nyomon a fenotípusos változásokat, amelyek a kezelést követő második-harmadik napra váltak egyértelművé. A gyulladással stimulus hatására a lamina bazalis dezintegrálódik, a laphámsejtek lekerekednek, a sejtkapcsoló struktúrák szétesnek, a sejtek számos plazmamembrán nyúlványt növesztenek, polaritásukat elveszítik. Mindezekkel párhuzamosan jelentősen megnő a mitokondriumok száma, nagy mennyiségű poliriboszóma, transzport vezikulumok, illetve egyre nagyobb számú multivezikuláris test (MVB) volt megfigyelhető a sejtek citoplazmájában. A kezelést követő 5. nap után egészen a 11. napig a mesothelsejt réteg fokozatos regenerációja figyelhető meg, amely a folyamatos, sejtkapcsoló struktúrákkal (zonula occludens, zonula adherens) összetartott laphám morfológia visszanyerésével és a lamina bazalis visszaépülésével válik egyértelművé.

4.1.2 Freund adjuváns kezelés hatására gyulladással citokinek termelődnek és TGF- β szekretálódik a hasüregbe *in vivo*

Annak igazolására, hogy a Freund adjuváns kezelés valóban gyulladást indukál a mi *in vivo* rendszerünkben, proinflammatorikus citokinek expresszióját vizsgáltuk a mesothel sejtekből nyert extraktumban. Kvantitatív RT-PCR vizsgálatokkal igazoltuk,

hogy a gyulladásos citokinek (IL1a, IL1b és IL6) expressziója szignifikánsan emelkedik a kezelést követő harmadik napig, majd ötödik napra a mRNS expresszió downregulációja volt megfigyelhető, jelezve a gyulladásos folyamat lecsengését. Tekintettel arra, hogy az EMT egyik fontos szabályozója a TGF- β , vizsgáltuk, hogy a mi rendszerünkben jelen van-e a citokin. Western blot vizsgálataink eredményei egyértelműen igazolják, hogy a TGF- β jelen van a hasúri mosófolyadékban, és szekréción szintje szignifikánsan emelkedik a kezelést követő második-harmadik napra.

4.1.3 Morfológiai vizsgálatok a TGF- β jelátviteli folyamatban szerepet játszó molekulák sejten belüli eloszlásának, ill. ezen eloszlás változásának nyomkövetésére mesothel sejtekben

Morfológiai vizsgálataink során a kanonikus TGF- β jelátvitel közvetítésében nélkülözhetetlen TGF β receptor II (T β RII) ill. a folyamat leállításában fontos szerepet játszó Smad7 sejten belüli eloszlását, ill. annak változását követtük nyomon. Konfokális mikroszkópos eredményeink igazolták, hogy a T β RII jelen van kontroll és kezelt mesothel sejtekben egyaránt. A gyulladás harmadik és ötödik napja között a receptor EEA1 (korai endoszóma marker) marker pozitív struktúrákban figyelhető meg a citoplazmában. Annak igazolására, hogy a caveoláris internalizáció a jelátviteli események leállításában játszhat szerepet azáltal, hogy a degradatív útvonalra szállítja a jelátviteli molekulákat, T β RII és caveolin-1 kettős jelöléses immunfluoreszcens vizsgálatokat végeztünk. Eredményeink azt mutatják, hogy a gyulladást követő harmadik napon T β RII már caveolin-1 pozitív struktúrákban is jelen van, a kezelést követő ötödik napra azonban a két fehérje erőteljesen kolokalizál mind a plazmamembránon, mind pedig a citoplazmában.

A Smad7 fehérjét morfológiailag (immunfluoreszcens jelöléssel) a kezelést követő harmadik naptól sikerült kimutatnunk mesothel sejtekben. Smad7 jelölést a plazmamembránon, caveolin-1 fehérjével kolokalizálva, valamint a citoplazmában detektáltunk.

4.1.4 A caveoláris endocitózis lehetséges szerepe a TGF- β útvonal szabályozásában

Annak vizsgálatára, hogy a caveolák közreműködésével internalizált fehérjék milyen útvonalon érkezenek el a degradáció végső állomásához a lizoszómákhoz, caveolin-1 és EEA1 markerekkel kolokalizációs vizsgálatokat végeztünk. A kezelést követő harmadik napon a mesothel sejtek citoplazmájában számos, kolokalizációra utaló puncta volt megfigyelhető. Fagyasztott ultravékony metszeteken elvégzett kettős jelöléses immuncitokémiával ezen kolokalizációt egyértelműen bizonyítottuk: a két marker minden esetben konzekvensen a formálódó multivezikuláris testek (MVB) limitáló membránját jelölte, jelezve, hogy mind a caveolin-1 pozitív, mind az EEA1 pozitív membrán domének részt vesznek a MVB limitáló membránjának alkotásában. Ezen eredményeinket kiegészítettük elektronmikroszkópos és morfometriai vizsgálatokkal, ami alátámasztotta, hogy a gyulladást követő harmadik napra a MVB-k száma jelentősen megnő. A mesothel sejtek lizátumából elvégzett immunprecipitációs eredményeink is igazolják, hogy a Freund adjuváns kezelést követő harmadik napra a T β RII ko-immunoprecipitál, azaz erőteljesen asszociál Cd63 multivezikuláris test markerrel. Immunprecipitációs eredményeink továbbá megerősítették morfológiai vizsgálataink eredményét: caveolin-1 antitesttel kapott immunprecipitátumban nagy mennyiségű Cd63-at detektáltunk a gyulladást követő harmadik napon, ötödik napra azonban a caveolin-1 rab7-tel (késői endoszóma, lizoszóma marker) mutatott kifejezett asszociációt, jelezve, hogy a caveolin-1 a klasszikus endocitotikus útvonalon (korai endoszóma - multivezikuláris test - késői endoszóma - lizoszóma) keresztül degradálódik. A caveolin-1 Western analízissel igazolt, hogy teljesen degradálódik és nincs jelen a rendszerünkben a regeneráció periódusában.

4.2 Az ER- α és ösztradiol lehetséges szerepe az EMT folyamataiban

4.2.1 Az ösztrogén receptor alfa (ER- α) expressziója és subcelluláris eloszlása mesothel sejtekben

Munkánk során elsőként sikerült igazolnunk, hogy patkány hashártya mesothel sejtekben kontroll körülmények között, és gyulladás során ER- α expresszálódik. Immuncitokémiai vizsgálataink azt mutatják, hogy a mesothel sejtekben az ösztrogén receptor α nemcsak a sejtmagban és a citoplazmában, hanem a plazmamembránon is jelen van. A plazmamembrán receptor pool aszimmetrikus eloszlást mutatott azon mesothel sejtekben, melyek még a lamina basalissal szoros kapcsolatban álltak: az ER- α a sejtek luminális (hasüreg felőli) oldalán, caveolin-1 pozitív membránterületeken volt kimutatható. A már levált, lekerekedett mesothel sejtek plazmamembránján egységes receptor eloszlást detektáltunk.

4.2.2 Az ER- α expressziójának változása gyulladásos események során

Az ER- α expressziójának változását a gyulladásos folyamat során biokémiai vizsgálatokkal követtük nyomon. Kvantitatív RT-PCR eredményeink azt mutatják, hogy az ER- α mRNS szinten a gyulladást követő harmadik-ötödik napra downregulálódik. (Hasonló eredményeket kaptunk a többi receptor, az ER- β és a G-fehérje kapcsolt (GPR) 30 qRT-PCR vizsgálata során). Western blott eredményeink azt bizonyítják, hogy a gyulladást követő harmadik és ötödik nap között a fehérje expressziója szignifikánsan fokozódik. A későbbi időpontokban (D8-D11 között) az ER- α azonban nem volt detektálható.

4.2.3 Az ER- α és TGF- β útvonal találkozási pontja a caveolák szintjén

Fénymikroszkópos immuncitokémiai vizsgálataink (konfokális mikroszkópos felvételeink) azt mutatják, hogy kezeletlen és a gyulladt, mesenchymális átalakuláson átment mesothel sejtekben az ER- α szinte kizárólag caveolin-1 fehérjével együtt fordul elő a plazmamembránon és a citoplazmában egyaránt. Fénymikroszkópos

eredményeinket fagyasztott ultravékony metszeteken végzett ER- α és caveolin-1 kettős immunjelölés is megerősítette. Elektronmikroszkópos felvételeinken egyértelműen látható, hogy az ER- α caveolin-1 pozitív vesiculákban szállítódik a plazmamembránról a citoplazma belseje felé. A gyulladást követő 3.-5. nap között a receptor a citoplazmában, a MVB-ek közelében jelenlévő caveolákban, ill. a MVB-ek limitáló membránjában van jelen.

Fénymikroszkópos kettős jelöléses (ER- α /T β RII) immuncitokémiai vizsgálataink során a mesothel sejtek citoplazmájában számos, kolokalizációra utaló, narancssárga puncta volt detektálható. Morfológiai eredményeink azt igazolják, hogy a gyulladás bizonyos időpontjában, a TGF β szignalling leállításához, mind az ER- α , mind T β RII ugyanazt az internalizációs útvonalat, a caveolákat használja.

4.2.4 Extragonadális ösztradiol detektálható a hasüregben *in vivo* gyulladással körülmények között

Chemilumineszcens assay segítségével az ösztrogén (E2) jelenlétét sikerült kimutatnunk a Freund adjuvánsal kezelt patkányok hasüregi mosófolyadékában kontroll és gyulladással körülmények között. A gyulladás harmadik napján és ezt követően az 5. és 11. nap között a hasüri mosófolyadékban az E2 koncentrációja szignifikánsan emelkedett. Ezzel szemben a szérumban az E2 koncentrációja a gyulladással folyamat teljes időskáláján végig a detektálhatóság szintjén maradt. Eredményeink egyértelműen igazolják az extragonadális ösztrogén jelenlétét. Ezen extragonadális hormon forrásul valószínűleg a zsírsejtekből felszabaduló aromatisztált androgén hormonok szolgálnak.

4.3 Az autofágia lehetséges szerepe a szöveti regeneráció folyamatában

4.3.1-2 Az autofágia szerepe a mesothel sejtek eredeti laphám morfológiájának visszanyerésében a gyulladás lecsengését követően

Az extragonadális ösztrogén jelenléte, és a mesentérium regenerációja során detektált magas koncentrációja felvetette a lehetőséget, hogy a hormon szerepet játszhat a szöveti újjászerveződésben autofágia beindításán keresztül, melyre friss irodalmi adatok is utalnak.

Hagyományos elektronmikroszkópos felvételekkel és morfometriai adatokkal igazoltuk, hogy a mesothel sejtekben a regeneráció megindulásával (D5 és D6 között) erőteljes autofágia indukálódik: számos autofág vakuolum volt megfigyelhető a mesothel sejtek citoplazmájában. Immunoblot vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a regeneráció során az autofág vakuolumok megjelenésével párhuzamosan fokozódik az LC3B (autofág marker) aktív formájának (LC3B-II) expressziója.

Annak igazolására/kizárására, hogy az ösztrogén szerepet játszik az autofágia indukálásában vizsgáltuk, hogy hogyan változik egy olyan citokin - a TNF- α expressziós szintje, amelyről általánosan ismert, hogy autofágiát indukál. A TNF- α expressziója a gyulladást követő második naptól egészen a 11. napig szignifikánsan magas szinten maradt. (Valószínűleg a regenerációban megfigyelt magas TNF alpha szint az aromatáz enzim upregulálásán keresztül járul hozzá a fokozott E2 szintéziséhez). Irodalmi adatokból ismert, hogy az ösztrogén alternatív (MAP kináz) útvonalakon keresztül indíthatja be az autofágia folyamatát, melynek számos lépésében (membrán formáció, lizozómával való fúzió) az ERK fehérje szerepét is igazolták. Általánosan ismert az a tény, hogy a TNF- α is az ERK foszforilációja révén indukál autofágiát. Immunoblot eredményeink igazolják, hogy a regeneráció során (D6), akkor, amikor az autofág vakuolumok érése, lizozómával való fúziója figyelhető meg a mesothel sejtek citoplazmájában, az ERK erőteljes foszforilációja detektálható.

5. Következtetések

- 1) A II. típusú epitheliális-mesenchymalis átalakulásra *in vivo* modellt vezetünk be a mesenterialis mesothel sejtek Freund-adjuváns okozta gyulladásos reakciója formájában
- 2) A mesothel sejtek izolálásával lehetővé vált biokémiai módszerekkel fehérje és mRNS szintű változások detektálása
- 3) A gyulladásos reakció során időbelileg vizsgáltuk és leírtuk a sejtek ultrastrukturális eltéréseit, valamint a gyulladást igazoló interleukinok és TGF- β jelenlétét.
- 4) Megállapítottuk, hogy a TGF- β jelátvitel két fehérjéje (T β RII, Smad7) jelen van mesothel sejtekben és a gyulladásos reakció második felében a sejtmembrán felől átveddnek korai és késői endoszómákba. Ebben a folyamatban a caveolák és caveolin-pozitív struktúrák játszanak szerepet, melyek mind fény- és elektronmikroszkópos immuncitokémiával, mind immunprecipitációval igazolást nyertek.
- 5) Munkánkkal először sikerült leírni az ER- α jelenlétét, expressziójának, sejten belüli eloszlásának változását kontroll és gyulladásos folyamatokban. Kimutattuk, hogy a sejtmembránon jelenlévő ER- α mesothel sejtekben szinte kizárólag caveolákban fordul elő, és caveolák közreműködésével internalizálódik.
- 6) Eredményeink egyértelmű bizonyítékkal járulnak hozzá, hogy *in vivo* (kontroll és gyulladásos körülmények között) extragonadalis ösztrogén van jelen a hasüregben, melynek egyenletesen magas szekréción szintje a gyulladást követő regenerációs fázisban is megfigyelhető volt.
- 7) A gyulladásos reakció csúcspontján és második felében jelentősen megnőtt az autofág vakuolumok száma mesothel sejtekben, amelyet később a sejtek laphámsejteké történő visszaalakulása követett. Úgy véljük, hogy az extragonadális ösztrogén autofágia indukálásán keresztül járul hozzá a mesothelium újjászerveződéséhez.

6. Saját közlemények

A témában megjelent és felhasználásra került publikációk:

- 1) Balogh P, Katz S, Kiss AL (2013): The role of endocytic pathways in TGF- β signaling. *Pathol Oncol Res* 19:141-148 (**IF:1,555**)
- 2) Balogh P, Szabó A, Katz S, Likó I, Patócs A, Kiss AL (2013) Estrogen receptor alpha is expressed in mesenteric mesothelial cells and is internalized in caveolae upon Freund's adjuvant treatment. *PLoS One* (11) p. e79508. 10 p. (**IF: 3,73**)
- 3) Katz S, Balogh P, Nagy N, Kiss AL (2012) Epithelial-to-mesenchymal transition induced by Freund's adjuvant treatment in rat mesothelial cells: a morphological and immunocytochemical study. *Pathol Oncol Research* 18: 641-649 (**IF: 1,555**)

A témához nem kapcsolódó publikációk:

- 1) Katz S, Balogh P, Kiss AL (2011) Mesothelial cells can detach from the mesentery and differentiate into macrophage-like cells. *APMIS* 119: 782-793 (**IF: 1, 991**)

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartomozom témavezetőmnek *Dr. L. Kiss Annának*, aki orvosi tanulmányaim kezdetétől patronált és egy izgalmas és kiváló témaválasztással alapozta meg sikeres kutatói munkámat.

Mérhetetlen köszönettel tartozom *Dr. Röhlich Pál Professzor úrnak*, aki folyamatosan és fáradhatatlanul csiszolta tudományos szemléletemet és nagyban hozzájárult munkám eredményességéhez.

Szeretnék köszönetet mondani *Prof. Dr. Szél Ágoston Rektor Úrnak*, aki anyagi támogatásával lehetővé tette a konferenciákon és tanulmányutakon való részvételt, illetve helyet biztosított a kutatásaimhoz.

Külön köszönettel és hálával tartozom *Dr. Patócs Attilának*, aki anyagi támogatásán túl, hozzáértésével, nagy türelemmel tanított és segítette PhD munkámat.

Szeretném kifejezni hálámat *dr. Szabó Arnoldnak*, akinek segítségével kiszélesíthettem technikai ismereteimet.

Külön köszönettel tartozom fáradtságos és értékes munkájukért *Dr. Likó Istvánnak* és *Dr. Müllner Nándornak*, akik a biokémiai munkák nagy részét kivitelezték.

Szeretném megköszönni értékes technikai segítségét és munkáját Kutasi Margitnak, Újváry Zsuzsának, Lócsey Katalinnak és Dóczi Nikolettának. Szeretnék továbbá köszönetet mondani a Humánmorfológiai Intézet Minden kedves Munkatársának, hogy segítették ittlétemet.

Hálával gondolok korábbi kémia tanáromra *dr. Andó Jánosnéra*, aki elültette bennem a tudományos gondolkodás magjait és folyamatosan csiszolta tudásomat.

Drága Édesanyám és nővérem, *Virág* folyamatos bátorítása és támogatása felbecsülhetetlen, illetve hálás köszönettel tartozom legkedvesebb barátaim, *Katalin* és *Szilveszter* folyamatos biztatásáért és motiválásáért.