

Ph.D. értekezés tézisei

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

**Lengyel Ferenc**

**Programvezető: Prof. Dr. Lénárd László, akadémikus  
Témavezető: Prof. Dr. Vértes Marietta, DSci.**

**Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Élettani Intézet**

**Pécs, 2008**

## Bevezetés

Az ösztadiol (E2) többféle módon is befolyásolhatja a sejtek életfolyamatait. Legrégebben ismert hatásmechanizmusa a „klasszikus” ösztrogénhatás. Ennek során az aktivált ösztrogén receptor (ER) bizonyos gének transzkripcióját serkenti oly módon, hogy a DNS-hez, és/vagy más transzkripció faktorokhoz kötődik. Ezen ún. genomikus hatásokon kívül vannak olyan, nemgenomikus E2 indukálta sejtélettani folyamatok is, amelyek túl gyorsan zajlanak le ahhoz, hogy génexpressziós változásokkal magyarázni lehetne őket, vagy transzkripciót gátló anyagok jelenlétében is lezajlanak. Ilyen hatások például a sejtek kalcium felvételének serkentése, a MAP kináz vagy a foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K)-Akt útvonalaknak az aktiválódása. A PI3K-Akt útvonalnak központi szerepe van a sejtciklus, az apoptózis és a sejtek anyagcseréjének szabályozásában. Ezen útvonal során a PI3K aktiválódása az Akt foszforilációjához vezet, ami aztán számos egyéb fehérjét foszforilálva aktiválja az antiapoptotikus, és gátolja a proapoptotikus folyamatokat, illetve serkenti a sejtosztódást, de az inzulin hatásban is fontos szerepe van. Az, hogy az E2-ER komplex milyen módon aktiválja a PI3K-t, még nem teljesen tisztázott. Bár kimutatták, hogy az ER közvetlenül hozzá tud kapcsolódni a PI3K katalitikus alegységéhez, aminek hatására az aktiválódik, még nem bizonyított, hogy ez a mechanizmus szerepet játszik a PI3K aktiválásában uterusban in vivo. Az Akt fontos szubsztrátját képezik a FOXO proteinek, amelyek a transzkripció faktorok FOX családjába tartoznak. Mint transzkripció faktorok, hatásaikat a sejtek transzkripció mintázatának módosításán keresztül fejtik ki. Többek között olyan fehérjék szintézisét is serkentik, amelyek leállítják a sejtciklust, vagy proapoptotikus hatásúak. A FOXO fehérjék sokrétű poszttranszlációs szabályozás alatt állnak. Sejt kultúrák kísérletek szerint az Akt a FOXO proteineket foszforilálva gátolja azok transzkripció aktivitását, ami hozzájárul az Akt antiapoptotikus hatásához.

Az utóbbi években a PI3K/Akt jelátviteli út sok kutatás tárgyát képezte. Ezen vizsgálatok elsősorban különböző tulajdonságokkal rendelkező sejt kultúrákon történtek, és a főbb jelátviteli utak megismerését eredményezték. Azonban jól ismert tény, hogy a multicelluláris szervezetben kialakuló hatások, szabályozási mechanizmusok jóval összetettebbek. Különböző sejt típusok, és a közöttük kialakuló multifaktoriális

kölcsönhatások vesznek részt az adott szerv homeosztázisának fenntartásában, vagy különböző patológiás elváltozások kialakulásában. A jelenleg rendelkezésünkre álló technikai, módszertani lehetőségek inkább a sejt kultúrák vizsgálatoknak kedveznek, noha egyre sürgetőbb igény jelentkezik olyan molekulák megismerésére, gyógyszerek kifejlesztésére, amelyekkel lehetőség nyílik a sejtéleti folyamatok élő szervezetben történő módosítására.

Az E2 egyik legfontosabb hatása a sejtproliferáció serkentése. A nettó sejt képződés intenzitását a survival (proliferatív és antiapoptotikus) hatások és a proapoptotikus hatások egymáshoz viszonyított aránya szabja meg. Irodalmi adatok, és a laboratóriumunkban végzett korábbi vizsgálatok arra mutatnak, hogy a PI3K-Akt jelátviteli út meghatározó szerepet játszik az E2 hatásának mechanizmusában, az uterusban folyó sejt képződés szabályozásában, különböző, és a reproduktív szerveket érintő patológiás elváltozásokban. Jelen munkánkban az E2-PI3K-Akt-FOXO1 jelátviteli út jellegzetességeit vizsgáltuk in vivo patkány uterusban, valamint ex vivo human uterusból származó szövetmintákban a menstruációs ciklus és menopausa során.

### **Célkitűzések**

Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

Expresszálódik- és foszforilálódik-e az Akt patkány uterusban. Amennyiben igen, akkor az expresszió illetve a foszforiláció mértéke változik-e akut E2 kezelés hatására?

Hogyan alakul az egyedfejlődés folyamán az Akt expressziója, foszforilációja és E2 érzékenysége?

Patkány uterusban az E2-nak az Akt foszforilációra gyakorolt hatását az ösztrogén receptor  $\alpha$  mediálja-e, vagy esetleg egy más szerkezetű, nemklasszikus ösztrogén receptor?

Az Akt az uterusban PI3K függő, vagy pedig egy alternatív úton aktiválódik?

Expresszálódik-e patkány uterusban a FOXO1, foszforilálódik-e a két Akt érzékeny helyen (Thr<sup>24</sup> és Ser<sup>256</sup>), és hogyan hat ezen csoportok foszforilációjára az akut E2 kezelés, illetve a PI3K Wortmanninnal történő gátlása?

Milyen hatással van az E2 kezelés és a PI3K gátlása a Ciklin D1 és a Fas-ligand mRNS szintjére?

Milyen jellegzetességei vannak az Akt expresszióknak és aktivációknak humán uterus szövetben a menstruációs ciklus alatt és menopauzában?

## **Módszerek**

### **Állatok**

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

### **Kezelések**

Az antiösztrogén ICI 182,780-at (2 mg/ml, 96% etanolban) intraperitoneális injekcióval juttattuk az állatokba (0.1 mg/100 g tt.). A Wortmannint DMSO-ban oldottuk fel (1 mg/ml), ebből az oldatból (vagy tiszta DMSO-ból) adtunk 5 µl-t közvetlenül a narkózisban lévő állatok uterusának jobb szarvába. Az ösztradiolt (E2) 25%-os etanolban oldottuk fel, és intraperitoneális injekcióval adtuk be az állatoknak. Ahol nem jeleztük külön, ott az alkalmazott E2 mennyisége 10 µg/100 g tt. volt. A kísérletek végén az állatokat dekapitáltuk, az uterusukat eltávolítottuk, tömegüket lemértük, majd a két szarvat külön-külön lefagyszottuk, és felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

## **Human uterusz**

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

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

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

A mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és  $-80^{\circ}\text{C}$ -on szállítottuk és tároltuk felhasználásig.

## **Western blot**

A fagyasztott mintákat  $4^{\circ}\text{C}$ -on elhomogenizáltuk, poliakrilamid gélen elektroforetizáltuk, majd a szétfutott fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk át. A membránokat a megfelelő elsődleges, majd a másodlagos antitestekkel kezeltük. Másodlagos antitestként nyúl ellenes, peroxidázzal konjugált antitestet használtunk. Az antigén-antitest kötődést peroxidáz reakcióval tettük láthatóvá.

## **Szubcelluláris frakciók elválasztása**

Enyhén hipotoniás pufferben részlegesen elhomogenizáltuk a szövetet, potterezttük, majd alacsony fordulaton (750g) lecentrifugáltuk. A felülúszót új csőben nagy fordulattal (10 000g) újra centrifugáltuk, majd a felülúszóból (citoplazmában gazdag homogenizátum) triklór-ecetsavval kicsaptuk a fehérjéket. Az első centrifugálás csapadékát egyszer mostuk enyhe detergens jelenlétében, majd újra centrifugáltuk. Az üledéket (nukleuszban gazdag homogenizátum) felvettük izoláló pufferbe, majd ezt is

triklór-ecetsavval kezeltük. A triklór-ecetsavval kicsapott fehérjéket acetonnal háromszor mostuk, majd száradás után felvettük az elektroforézishez használt izoláló pufferbe.

## Kvantitatív RT PCR

Az mintákból TRIzol reagenssel total RNS-t izoláltunk, ezzel reverz transzkripciót végeztünk. A kész cDNS tisztaságát hagyományos PCR segítségével ellenőriztük. A kvantitatív PCR-hoz SyBr Green Supermixet használtunk a termék leírásának megfelelően. A program a következő lépésekből állt: 3 min 95°C-on, majd 45 amplifikációs ciklus (10 sec 92 °C-on, 10 sec 55 °C-on, plate read, 12 sec 72 °C-on), végül 1 min 72 °C-on. Befejezés után melting curve analízist végeztünk. A kapott eredményeket a  $\Delta\Delta C_T$  Livak módszerrel értékeltük. A felhasznált primerek szekvenciáját az I. táblázat mutatja.

I. táblázat

Alkalmazás	Primer név	Szekvencia	A primer tervezéshez használt cDNS azonosító száma az NCBI adatbázisban
Hagyományos PCR-hoz	Beta aktin forward primer	5' AGCCATGTACGTAGCCATCC 3'	NM_031144
	Beta aktin reverse primer	5' AAGGGTGTAACCGCAGCTC 3'	
QT PCR-hoz	Beta aktin forward primer	5' AGCCATGTACGTAGCCATCC 3'	NM_171992
	Beta aktin reverse primer	5' AGCGCGTAACCCTCATAGAT 3'	
	Ciklin D1 forward primer	5' TAGGGCTGGTAGCATGAGGT 3'	NM_012908
	Ciklin D1 reverse primer	5' CACGGTCCCTACTTCCAAAC 3'	
	Fas ligand forward primer	5' TCTGGTTGGAATGGGGTTAG 3'	NM_012908
	Fas ligand reverse primer	5' TTGGTTTCAGAGGGTGTGC 3'	

## Statisztika

A Western blottok denzitometriás mérését Image Tool (Roswell, GA, USA) programmal végeztük. Az állatkísérletek eredményeit Student t-tesztel, a humán minták adatait ANOVA tesztel, majd Student-Newman-Keul-féle multiple range tesztel analizáltuk.

## Eredmények

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

Eredményeink szerint az Akt protein minden vizsgált életkorban (7, 14, 21, 28 és 35 napos) azonos mértékben expresszálódik, a foszforilációja azonban az életkor előrehaladtával fokozódik.

Az E2 érzékenységet vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy 11 napos korban az Akt foszforilációt az E2 kezelés még nem befolyásolta, viszont a 28 és a 60 napos (ovarietomizált) állatok uterusában fokozta azt.

### **Az Akt expresszálódik és E2 érzékeny módon foszforilálódik patkány uterusban**

Felnőtt, ovarietomizált patkányokat kezeltünk különböző dózisú (1, 10 vagy 100 µg /100 g tt.) E2 injekcióval. Az Akt minden vizsgált állatban expresszálódott, és szintjét az E2 kezelés nem befolyásolta. A pSer<sup>473</sup>-Akt szintje szignifikánsan fokozódott két órával az E2 injekciót követően.

Az ösztradiol (E2) Akt aktiváló hatását nem fokozta a nagyobb dózis, viszont kisebb dózist alkalmazva kicsit megnőtt az injekció beadásától az Akt foszforiláció fokozódásáig eltelt idő.

### **Az Akt ICI 182,780 és Wortmannin érzékeny úton foszforilálódik az uterusban**

Felnőtt patkányokat kezeltünk ICI 182,780-nal, ami szelektív gátlószere az ösztrogén receptoroknak. Az ICI 182,780-nal előkezelt állatok uterusában az E2 nem fokozta az Akt foszforilációját. Az ICI 182,780 kezelés önmagában hatástalan volt.

Az uterus lumenébe beadott Wortmannin (5 µg/állat) szignifikáns mértékben csökkentette az Akt foszforilációt, ami azt mutatja, hogy ovarietomizált patkányok uterusában az Akt PI3K függő úton foszforilálódik. A Wortmannin oldószereként használt DMSO nem befolyásolta az Akt foszforiláció mértékét.

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

Az Akt a FOXO1-et in vivo két helyen, a Thr<sup>24</sup> és Ser<sup>256</sup> oldalláncon foszforilálja. Western blottal vizsgáltuk a FOXO1 foszforiláció változásait PI3K gátlás és két órás E2 kezelés hatására.

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

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

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

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

A Ciklin D1 fontos szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában, a G1-S fázisok közti átmenetet serkenti, és E2 hatására fokozódik a transzkripciója. Ösztradiollal és Wortmanninnal kezeltünk ovariektomizált patkányokat, majd az uteruszokból RNS-t izoláltunk, és kvantitatív RT PCR-ral megnéztük, hogy hogyan alakult a Ciklin D1 és a Fas ligand mRNS-ének szintje. Ösztradiol kezelés után hat órával mintegy 80%-kal



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

### **Az E2 és a Wortmannin kezelés befolyásolja a Fas ligand expressziójának mértékét**

A Ciklin D1 vizsgálatánál használt mintákban meghatároztuk a Fas ligand mRNS szintjét is. A Fas ligand expresszióját Wortmannin jelentősen lecsökkentette hat órával az E2 kezelés után. Az E2 és az E2+Wortmannin kezelt állatokban enyhe csökkenést figyeltünk meg. Tizenkét órával a kezelés után az E2 Fas ligand expressziót gátló hatása erősebb lett, míg a Wortmanninnal kezelt uterusok Fas ligand mRNS szintje megegyezett a hat órás értékkel. A Fas ligand expresszió legerősebb gátlását az E2-lal és Wortmanninnal is kezelt uterusokban tapasztaltuk.

### **A PI3K-Akt útvonalnak szerepe van az E2 kiváltotta vízimbibícióban**

Az uterusz egyik jellemző válasza az E2 kezelésre a vízimbibíció, ami már röviddel az E2 beadása után megfigyelhető. Ehhez a kísérlethez fiatal, 21 napos patkányoknak adtunk intraperitoneális Wortmannin (1,4 µg/g tt.), majd egy órával később E2 (10 µg /100 g tt.) injekciót. Az E2 magában adva az uterusz súlyának növekedését okozta. Ezt a súlynövekedést a Wortmannin kivédte.

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

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

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

mennyiségében, viszont a menopausa kezdeti szakaszában az Akt expressziója szignifikánsan csökkent.

A pSer<sup>473</sup>-Akt szintje alacsony volt valamennyi vizsgált myometrium szövetben. Ugyanez mondható el a menopauzás uterusból származó myomákról is, azonban a ciklus proliferációs és szekréciós fázisában a myomákban fokozott Akt foszforilációt tapasztaltunk.

### **Az antiapoptotikus Bcl-2 és a proapoptotikus hatású Bax fehérje szintje eltér a myomáman a menstruációs ciklus alatt és menopauzában**

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

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

### **Összefoglalás**

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

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

A FOXO1 transzkripciós faktor expresszálódik ivarérett patkányok uterusában. Ezen fehérje Ser<sup>256</sup> és Thr<sup>24</sup>-csoportjainak foszforilációja eltérően válaszol E2 kezelésre és a PI3K Wortmanninnal történő gátlására. A Ser<sup>256</sup>-csoport foszforilációja korábban fokozódik, mint a Thr<sup>24</sup>-é. Ugyanakkor az utóbbi érzékenyebb a PI3K gátlására,

Wortmannin kezelés hatékonyabban csökkenti a pThr<sup>24</sup>-FOXO1, mint a pSer<sup>256</sup>-FOXO1 szintjét.

A FOXO1 Ser<sup>256</sup>-on foszforilált formája elsősorban a magban detektálható mind a kontroll, mind pedig az E2 kezelt állatok uterusában. Ezzel szemben a Thr<sup>24</sup>-en foszforilált forma a citoplazmában helyezkedik el.

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

A Ciklin D1 expresszió E2 kezelés hatására Wortmannin érzékeny módon fokozódik, tehát az E2 ezen hatásában szerepe van egy PI3K-függő útvonalnak. A Ciklin D1 expresszió fokozódása feltehetőleg fontos szerepet játszik az E2 sejtproliferációt serkentő hatásában. A Fas ligand expresszióját az E2 kezelés és a PI3K gátlása is csökkenti.

A human myometrium és myoma szövetminták vizsgálata során azt találtuk, hogy a vizsgált survival faktorok (Akt, pSer<sup>473</sup>-Akt és Bcl-2) szintje magasabb a myomában, mint a környező myometriumban, és a menopausa után lecsökken. A proapoptotikus hatású Bax fehérje szintje a myomában a menopausa után megemelkedik. Ezek a változások összhangban vannak azzal, hogy menopausa után a myoma regressziója figyelhető meg.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a PI3K-Akt-FOXO1 jelátviteli út kimutatható patkány és humán uterusban egyaránt, és fontos szerepe van az E2 sejtproliferációra gyakorolt hatásában, illetve bizonyos patológiás eltérések kialakulásában.

## **Köszönetnyilvánítás**

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

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

Köszönettel tartozom a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról Dr. Kovács Kálmánnak és azoknak a munkatársaknak, akik kollaborációs munkánkban részt vettek.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Sümegi Balázsnak, és a Biokémiai Intézet dolgozóinak, amiért munkámhoz értékes gyakorlati segítséget nyújtottak.

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

Végezetül szeretném megköszönni szüleimnek a segítségüket.

## A témához kapcsolódó tudományos közlemények:

### Folyóirat cikkek:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Folyóiratban megjelent előadás kivonatok:

**Lengyel F**, Vértés Zs, Környei JL, Kovács KA, Sümegi B, Vértés M

Akt/protein kinase B and phosphatase PTEN in rat uterus. **Acta Physiologica Hungarica Vol 93 (2-3) p206, 2006**

**Lengyel F**, Vértés Zs, Környei J, Kovács AK, Sümegi B, Vértés M

The role of forkhead transcription factors in the mechanism of estrogen action. **Acta Physiologica Hungarica Vol 92 (3-4) p276, 2005**

Kovacs, KA., Lengyel F., Vértes Zs., Környei JL. Gőcze, MP, Sümegi B, Szabó I., Vértes, M.

Some aspects of non-genomic estradiol action in human uterus during menstrual cycle and at menopause.

**Climacteric 8: suppl.2 p110, 2005**

**Előadások:**

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

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

Kovacs, KA., Lengyel F., Vértes Zs., Környei JL. Gőcze, MP, Sümegi B, Vértes, M Szabó I.

Differential expression of Forkhead (FKHR) transcription factors in human endometrium and myometrium. **12th World Congress of Gynecological Endocrinology, Florence 2006 abstr.12**

Lengyel Ferenc, Környei József, Vértes Zsuzsanna, Kovács Kálmán A., Sümegi Balázs, Vértes Marietta  
Forkhead transzkripció proteinek szerepe az ösztrogén hatásmechanizmusában **A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXIX. Vádorgyűlése, Budapest, 2005**

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

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

Ferenc Lengyel, Zsuzsanna Vértes, Kálmán A. Kovács, József L. Környei, Balázs Sumegi, Marietta Vértes  
Akt/protein kinase B and phosphatase PTEN proteins in rat uterus **12<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal 2004, 31 Augustus -4 September Abstr.: P456**

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

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

Kovács KA., **Lengyel F.**, Környei JL, Gőcze P., Szabó I.  
PTEN expresszió változásának és szerepének vizsgálata human uterus myometriumban és myomában. **Magyar Szülészeti és Nőgyógyászati Endokrinológiai Társaság III. Kongresszusa, p- 48 Harkány 2004**

Kovács KA., **Lengyel F.**, Környei JL, Gőcze P., Szabó I.  
Receptor függő, nem genomikus ösztadiol hatás szerepe human uterus myoma pathogenezisében. **Magyar Nőorvos Társaság Dél-nyugat Magyarországi Szekciójának VI. Kongresszusa, p.17-18.,Siófok, 2004.**

**Lengyel Ferenc**, Környei József, Vértés Zsuzsanna, Kovács Kálmán A., Sümegi Balázs, Vértés Marietta  
Akt/PI3K jelátvitel in vivo vizsgálata patkány uterusban. **A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXX. Vándorgyűlése, Pécs, 2003**

Kovács KA., **Lengyel F.**, Környei, JL., Szabó I.  
Akt/protein kináz B vizsgálata human uterus myometriumban és myomában. **Magyar Nőorvos Társaság Dél-nyugat Magyarországi Szekciójának V. Kongresszusa, Zalakaros, 2003**

**Egyéb tudományos közlemények:**

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

Környei JL, Kovács KA, Vértés Zs, Gőcze PM, **Lengyel F**, Vértés M  
Altered opiate-progesterone interaction in the regulation of proliferation of human uterine leiomyoma cells. **Acta Physiologica Hungarica Vol 93 (2-3) p196, 2006**

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

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

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

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



Ph.D. Thesis

**MECHANISMS OF CELL PROLIFERATION IN THE  
UTERUS**

**Ferenc Lengyel**

**Program leader: Prof. Dr. László Lénárd, Member of the  
Hungarian Academy of Sciences**

**Supervisor: Prof. Dr. Marietta Vértes, DSci.**

**University of Pecs  
Medical School  
Institute of Physiology**

**Pécs, 2008**

## Introduction

Estradiol (E2) exerts its effects through multiple mechanisms. In the „classic” mode of action E2 binds to estrogen receptor, which in turn facilitates transcription of estrogen responsive genes by binding to the DNA and/or other transcription factors. Other („nongenomic”) effects of E2 can not be prevented by transcriptional inhibitors or are too rapid to be explained by transcriptional changes. These effects include facilitation of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and activation of MAP kinase or phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-Akt pathways. The PI3K-Akt pathway has a central role in regulation of cell cycle, apoptosis and cellular metabolism. This pathway begins with the activation of PI3K leading to phosphorylation of Akt which activates antiapoptotic and inhibit proapoptotic processes and facilitates cell proliferation through phosphorylation of several proteins. The mechanism by which E2 activates PI3K is not clear yet. Though it has been demonstrated that the estrogen receptor can bind to the catalytic subunit of PI3K resulting in its activation, the significance of this mechanism in uterine tissue has not been proven. One of the substrates of Akt are the FOXO proteins which are members of the forkhead-box family of transcription factors. As transcription factors, they regulate cellular physiology by altering the transcriptional activity of the cell. Among others, they induce expression of proteins which arrest the cell cycle or have proapoptotic effects. FOXO proteins are regulated by posttranslational modifications. In cell culture systems phosphorylation of FOXO proteins by Akt inhibits their transcriptional activity, and it may contribute to the antiapoptotic effect of Akt.

Recently, PI3K-Akt pathway has been extensively studied in cell culture systems, and by now the major issues of its regulation and effect have been cleared. However, regulation of physiological and pathological processes *in vivo* is more complex because of the multicellular nature of tissues and the presence of a wide array of endocrine and paracrine mediators. Animal experiments are demanded to study cellular physiology in the context of the whole animal and to develop molecules that could be used to targeted manipulation of signal transduction pathways *in vivo*.

Stimulation of cell proliferation is one of the most important effects of E2. Intensity of cell proliferation is determined by the ratio of survival (proliferative and antiapoptotic) effects and proapoptotic effects. The scientific literature and the prior work done in our laboratory suggests that the PI3K-Akt pathway plays a central role in the mechanism of E2 action, regulation of uterine cell proliferation, and development of different pathological conditions of the reproductive tract. In the present work we examine some aspects of the PI3K-Akt-FOXO1 pathway in rat uterus as an *in vivo* model and in tissue samples derived from cycling and menopausal women.

## **The aim of our study**

In this work we aimed to answer the following questions:

Is Akt expressed and phosphorylated in rat uterus? If so, then does acute E2 treatment have any effect on its expression or phosphorylation?

How does expression, phosphorylation and E2 responsiveness change during development?

Is it estrogen receptor  $\alpha$  or some other, "non-classical" estrogen receptor that mediates the effect of E2 on Akt phosphorylation?

Is Akt activated through a PI3K dependent, or a PI3K independent way in the uterus?

Is FOXO1 expressed in rat uterus? Is it phosphorylated on its two Akt sensitive sites (Thr<sup>24</sup> és Ser<sup>256</sup>)? How do acute E2 treatment and inhibition of PI3K by Wortmannin affect phosphorylation of these residues?

How does the level of Cyclin D1 and Fas-ligand mRNA change in response to E2 treatment and inhibition of PI3K?

What are the characteristics of Akt expression and activation in human uterus during the menstrual cycle and menopause?

## **Methods**

### **Animals**

Sexually immature (7, 11, 14, 21, 28 and 35-day old) and adult female Wistar rats were used for our experiments. Mature rats were ovariectomized five days before treatment under light ether narcosis. The experimental protocol was approved by our Institutional Ethics Committee for Animal Care and Use.

## **Treatments**

The antiestrogen ICI 182,780 (2 mg/ml, in 96% ethanol) was injected intraperitoneally (0.1 mg/100g tt.). Wortmannin was dissolved in DMSO (1 mg/ml) and 5 µl of this solution (or pure DMSO) was injected in the right uterine horn of anesthetized animals. Estradiol (E2) was dissolved in 25% ethanol and injected i.p. at a dose of 10µg/100g bw unless stated otherwise. At the end of the experiments animals were decapitated, their uteri were removed, weighed and the two horns were separated and stored at -80 °C.

.

## **Human uterus**

Examination of human tissue samples was carried out in collaboration with the Department of Obstetrics and Gynecology of our University. The Institutional Human Studies Committee approved the use of the tissues and informed consent was obtained by hysterectomy from the patients. Normal and pathological (leiomyoma) myometrial specimens were obtained from cyclic and menopausal women (aged 38–55 year) undergoing hysterectomy for benign indications with no history of hormonal treatment for at least 3 mo. before hospitalization. The stage of menstrual cycle or the presence of menopause was assessed by histological examination of the endometrium and determination of FSH, estrogen and progesterone levels of the blood taken on the morning of the operation.

After the operation myoma was dissected from the uterus. Myometrial samples, for use as paired controls, were obtained from surrounding normal myometrium. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use.

## **Western blot**

Frozen uteri were homogenized at 4 °C, homogenates were electrophoretised on polyacrylamide gel and blotted on nitrocellulose membrane. Membranes were treated with primary and secondary antibodies. We used anti-rabbit, HRP-conjugated antibody as a secondary antibody. Blots were visualized by peroxidase reaction.

## **Isolation of subcellular fractions**

Tissue samples were partially homogenized by ultra-turax homogenizer in slightly hypotonic isolation buffer, further homogenized using a Dounce Tissue Grinder and centrifuged at 750g. Supernatant was collected and centrifuged at 10 000g, the resulting

supernatant (cytoplasm-rich homogenate) was collected and trichloro-acetic acid was added to denatured proteins. The pellet of the first (low-speed) centrifugation was washed in the presence of a slight detergent and centrifuged again at 750g. The pellet (nucleus-rich homogenate) was dissolved in isolation buffer, and trichloro-acetic acid was added. Denatured proteins from both fractions were washed three times with acetone and after complete drying they were dissolved in the homogenization buffer used for electrophoresis.

## Quantitative RT PCR

Total RNA was isolated using TRIzol reagent, and reverse transcription was performed. The quality of the cDNA was checked by conventional PCR. Quantitative PCR reaction was performed using SyBr Green Supermix, as described by the manufacturer. The program settings were: 3' 95°C, then 45 amplification cycles (10'' 92 °C, 10'' 55 °C, plate read, 12'' 72 °C), and then a final elongation step 1' 72 °C. After the reaction melting curve analysis was performed. Results were analysed using the  $\Delta\Delta C_T$  Livak method. Primers used for our work are listed in table I.

I. táblázat

	Primer name	Sequence	NCBI accession number of the cDNA used for the design of the primer
conventional PCR	Beta actin forward primer	5' AGCCATGTACGTAGCCATCC 3'	NM_031144
	Beta actin reverse primer	5' AAGGGTGTAACCGCAGCTC 3'	
QT PCR	Beta actin forward primer	5' AGCCATGTACGTAGCCATCC 3'	
	Beta actin reverse primer	5' AGCGCGTAACCCTCATAGAT 3'	
	Cyclin D1 forward primer	5' TAGGGCTGGTAGCATGAGGT 3'	NM_171992
	Cyclin D1 reverse primer	5' CACGGTCCCTACTTCCAAAC 3'	
	Fas-ligand forward primer	5' TCTGGTTGGAATGGGGTTAG 3'	NM_012908
	Fas-ligand reverse primer	5' TTGGTTTCAGAGGGTGTGC 3'	

## Statistics

The program Image Tool (Roswell, GA, USA) was used for the densitometric analysis of Western blots. For statistical analysis of the results of animal experiments we used Student's t test, and for the results of human experiments ANOVA test followed by Student-Newman-Keul's multiple range test.

## **Results**

**Akt is expressed in the uterus of developing and adult rats, and it is phosphorylated in an age dependent manner.**

Akt protein was expressed in all animals examined (7, 14, 21, 28 and 35 days old) to the same extent, but the rate of its phosphorylation increased during development.

Estradiol administration increased the rate of Akt phosphorylation in 28 and 60 days old (ovariectomized) rats, but not in 11 days old ones.

**Akt is expressed and phosphorylated in an E2 dependent manner in adult rat uterus.**

Adult, ovariectomized rats were treated with different doses of E2 (1, 10 or 100µg/100g bw.). A two hour E2 treatment (10µg/100g bw) increased the level of pSer<sup>473</sup>-Akt significantly, while it had no effect on the expression of the protein.

Using higher E2 concentration (100µg/100g bw) did not increase effectivity, but lowering the dose to 1µg/100g bw resulted in a delayed response.

**Akt is phosphorylated in an ICI 182,780 and Wortmannin sensitive way in the uterus**

Adult rats were treated with ICI 182,780 (a selective antagonist of estrogen receptor) and one hour later with E2. Estradiol failed to increase phosphorylation of Akt in the uteri pretreated with ICI 182,780. Injecting ICI 182,780 alone had no effect.

Intrauterine injection of Wortmannin (5µg/animal) reduced the level of pSer<sup>473</sup>-Akt, suggesting a role of PI3K in Akt phosphorylation in the uterus.

**FOXO1 is expressed in rat uterus and it is phosphorylated in response to E2 in a PI3K dependent way**

Akt phosphorylates FOXO1 at Thr<sup>24</sup> and Ser<sup>256</sup> residues in vivo. We analyzed changes in FOXO1 phosphorylation in response to E2 treatment and inhibition of PI3K.

The level of pSer<sup>256</sup>-FOXO1 was low in control animals, increased at 2 and 6 hours and returned to control level by 12 hours after E2 injection. Phosphorylation rate of Thr<sup>24</sup> residue of FOXO1 did not respond to a two hour E2 treatment but it was increased 12 and 24 hours after E2 administration. Wortmannin efficiently inhibited phosphorylation of Thr<sup>24</sup>-FOXO1 and reduced phosphorylation of Ser<sup>256</sup> to about 50%.

### **Estradiol influences the intracellular distribution of phosphorylated forms of FOXO1**

Next we isolated nucleus rich and cytoplasm rich fractions from uteri of animals treated with E2 and/or Wortmannin. In the uteri treated with E2 alone a strong pSer<sup>256</sup>-FOXO1 signal was detected in the nuclear fraction. In the uteri treated with Wortmannin or both E2 and Wortmannin this signal was weak. The strength of the signal was not affected by DMSO. Cytoplasm rich fractions contained low levels of pSer<sup>256</sup>-FOXO1 in all treatments. PhosphoThr<sup>24</sup>-FOXO1 was detected in cytoplasm rich fractions only.

### **Cyclin D1 expression changes in response to E2 and Wortmannin treatment**

Cyclin D1 plays a central role in cell cycle regulation by facilitating G1-S transition, E2 was shown to increase its expression in several tissues and cell culture systems. We treated ovariectomized rats with E2 and Wortmannin and analyzed the expression of Cyclin D1 mRNA by quantitative RT PCR. Six hours after E2 administration the level of Cyclin D1 mRNA increased with about 80%, and by 12 hours after the injection it decreased to the control level. Wortmannin not only inhibited this effect of E2, but reduced the expression of Cyclin D1 either used alone or in combination with E2.

### **Estradiol and Wortmannin treatment inhibits Fas-ligand expression**

Next, from the cDNA samples we determined Fas-ligand expression, and found that it was decreased in Wortmannin treated uteri six hours after E2 treatment. A slight decrease was observed in E2 and E2+Wortmannin treated animals too. By twelve hours after the treatment the inhibitory effect on E2 on Fas-ligand expression grew stronger while that of Wortmannin did not change. The strongest inhibition of Fas-ligand expression was detected in the uteri treated with both, E2 and Wortmannin.

### **PI3K-Akt pathway is required for E2 induced water imbibition**

Water imbibition is one of the E2 induced uterine responses occurring shortly after the administration of E2. Young, 21 days old rats were given intraperitoneal Wortmannin (1,4 µg/g bw.) and one hour later E2 (10µg /100g bw.) injections. Some animals were treated with E2 alone. Estradiol caused an increase of the uterine weigh but failed to do it in the presence of Wortmannin.

## **Expression and phosphorylation of Akt is increased in the myoma compared to the matched myometrium of human uterus**

Next we analyzed the expression and phosphorylation of Akt protein in myoma and in matched myometrium of human uterus.

The level of Akt expression was higher in myoma than in samples from the control myometrium. No changes were observed during the menstrual cycle but after menopause the level of Akt protein decreased significantly.

The level of pSer<sup>473</sup>-Akt was low in all myometrium samples examined as well as in menopausal myomas. However, in myomas from cycling uteri the phosphorylation rate of Akt was higher.

## **Differences in the levels of the antiapoptotic Bcl-2 and the proapoptotic Bax between the myoma and the surrounding myometrium**

Abundant expression of Bcl-2 was observed in myomas during the menstrual cycle, with significantly higher levels in secretion than in proliferation phase. Its level was low in myometrial samples and in menopausal myoma.

The highest level of Bax protein was detected in myoma samples from menopausal uteri, in other samples a slight expression was observed only.

## **Discussion**

In this study we aimed to characterize *in vivo* the PI3K-Akt signal transduction pathway, one of the rapid effects of E2. We established a model which allowed us to examine the role of PI3K in rat uterus.

We found, that Akt was expressed and phosphorylated in all studied (7, 14, 21, 28, 35 days old and adult) rats. In response to E2 treatment phosphorylation rate of Akt increased in the uterus in a dose dependent manner. Estradiol-induced Akt phosphorylation was inhibited with the E2 antagonist ICI 182,780, and with the PI3K inhibitor Wortmannin, indicating the role of ER and PI3K in this effect of E2.

The FOXO1 transcription factor is expressed in rat uterus. The two Akt sensitive residues (Ser<sup>256</sup> and Thr<sup>24</sup>) of FOXO1 differs in their responses to either E2 treatment or inhibition of PI3K. Phosphorylation of Ser<sup>256</sup> residue can be detected earlier than that of Thr<sup>24</sup>. On the other hand, the Thr<sup>24</sup> residue is more sensitive to inhibition of PI3K.



Wortmannin treatment decreases the level of pThr<sup>24</sup>-FOXO1 more efficiently than that of pSer<sup>256</sup>-FOXO1.

Phosphorylated form of FOXO1 (pSer<sup>256</sup>) was detected mainly in the nucleus in the uterus of both, control and E2 treated animals, while pThr<sup>24</sup>-FOXO1 was localized to the cytoplasm.

Phosphorylated forms of both, Akt and FOXO1 can be detected in control, non-treated animals. Therefore, it is reasonable to propose that E2 independent mechanisms are also involved in the regulation of PI3K/Akt/FOXO1 signaling cascade and related survival mechanisms in uterus.

Estradiol increases the expression of Cyclin D1 in a Wortmannin sensitive manner, so a PI3K dependent pathway is involved in this effect of E2. This effect of E2 must play a central role in proliferation of uterine cells. Expression of Fas-ligand mRNA is reduced by both, E2 treatment and inhibition of PI3K.

Analysis of human tissue samples revealed that the level of the survival factors examined (Akt, pSer<sup>473</sup>-Akt and Bcl-2) is higher in the myoma than in the matched myometrium, and it attenuates after menopause. Expression of the proapoptotic protein Bax increases in myoma after menopause. The results of our present data suggest that Akt/PI3K signaling seems to be involved in the tightly regulated hormonal hierarchy in human uterine smooth muscles. At present stage of investigation the causative links between the mentioned events are not known. There are many questions: whether changes of E2-ER $\alpha$  signaling or the changes of PI3K/Akt signaling are initiative events in the leiomyoma pathogenesis; how are influenced by different growth factors initiated signaling mechanisms; does in situ estrogen production contribute in the activation of different signaling pathways?

We conclude that the PI3K-Akt-FOXO1 signal transduction pathway functions in rat and human uterus and it has a central role in proliferative effect of E2 and in development of different pathological conditions.

## Publications related to this dissertation:

### Articles:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Printed abstracts:

**Lengyel F**, Vértés Zs, Környei JL, Kovács KA, Sümegi B, Vértés M

Akt/protein kinase B and phosphatase PTEN in rat uterus. **Acta Physiologica Hungarica Vol 93 (2-3) p206, 2006**

**Lengyel F**, Vértés Zs, Környei J, Kovács AK, Sümegi B, Vértés M

The role of forkhead transcription factors in the mechanism of estrogen action. **Acta Physiologica Hungarica Vol 92 (3-4) p276, 2005**

**Kovacs KA**, **Lengyel F**, Vértés Zs., Környei JL. Gőcze, MP, Sümegi B, Szabó I., Vértés, M.

Some aspects of non-genomic estradiol action in human uterus during menstrual cycle and at menopause. **Climacteric 8: suppl.2 p110, 2005**

### Presentations:

**Lengyel Ferenc**, Vértés Zsuzsanna, Kovács A. Kálmán, Környei L. József, Sümegi Balázs, Vértés Marietta

Ösztrogén receptor függő, két lépcsős FOXO1 inaktiváció patkány uterusban **A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXXI. Vádorgyűlése, Pécs, 2007**

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

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

**Lengyel Ferenc**, Környei József, Vértes Zsuzsanna, Kovács Kálmán A., Sümegi Balázs, Vértes Marietta Forkhead transzkripciós proteinek szerepe az ösztradiol hatásmechanizmusában **A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXIX. Vádorgyűlése, Budapest, 2005**

**Kovács KA**, **Lengyel F**, Vértes, Zs, Környei, JL, Gőcze, PM, Sumegi, B. Szabó I., Vértes M. Some aspect of non-genomic action in human uterus during menstrual cycle and at menopause, **11th World Congress on the Menopause, Abstr.Book 0162 Buenos Aires, Argentina 2005, 18-22 October**

**Ferenc Lengyel**, Zsuzsanna Vértes, Kálmán A. Kovács, József L. Környei, Balázs Sumegi, Marietta Vértes Akt/protein kinase B and phosphatase PTEN proteins in rat uterus **12<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal 2004, 31 Augustus -4 September Abstr.: P456**

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

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

**Kovács KA**, **Lengyel F.**, Környei JL, Gőcze P., Szabó I. PTEN expresszió változásának és szerepének vizsgálata human uterus myometriumban és myomában. **Magyar Szülészeti és Nőgyógyászati Endokrinológiaia Társaság III. Kongresszusa, p- 48 Harkány 2004**

**Kovács KA**, **Lengyel F.**, Környei JL, Gőcze P., Szabó I. Receptor függő, nem genomikus ösztradiol hatás szerepe human uterus myoma pathogenezisében. **Magyar Nőorvos Társaság Dél-nyugat Magyarországi Szekciójának VI. Kongresszusa, p.17-18., Siófok, 2004.**

**Lengyel Ferenc**, Környei József, Vértés Zsuzsanna, Kovács Kálmán A., Sümegi Balázs, Vértés Marietta  
Akt/PI3K jelátvitel in vivo vizsgálata patkány uterusban. **A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXX. Vándorgyűlése, Pécs, 2003**

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

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

### **Other publications:**

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

**Környei JL**, Kovács KA, Vértés Zs, Gőcze PM, **Lengyel F**, Vértés M

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

**Környei JL**, Vértés Zs, **Lengyel F**, Kovács KA, Gőcze PM, Vértés M

Opiate-progesterone interaction in the regulation of the proliferation of human myometrial and endometrial cells. **Acta Physiologica Hungarica Vol 92 (3-4) p274, 2005**

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

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

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