

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A növekedési hormon-releasing hormon (GHRH) és GHRH- Receptorok (GHRH-R) expressziójának vizsgálata humán endometrium carcinómában és gyermekkori onkohematológiai mintákban

Dr. Juhász Éva

Témavezető: Prof. Dr. Kiss Csongor



DEBRECENI EGYETEM

Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2024.

A növekedési hormon-releasing hormon (GHRH) és GHRH-Receptorok (GHRH-R) expressziójának vizsgálata humán endometrium carcinómában és gyermekkori onkohematológiai mintákban

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Egészségtudományok tudományágban

Írta: Dr. Juhász Éva általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok doktori iskolája
(Anyagcsere és Endokrin betegségek megelőzése és kontrollja programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Kiss Csongor

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kappelmayer János, MTA doktora
tagok: Dr. Bhattoa Harjit Pal, MTA doktora
Dr. Gellén Balázs, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet
2025. február 17. 11:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Koppán Miklós, PhD
Prof. Dr. Zupkó István, MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kappelmayer János, MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Koppán Miklós, PhD
Prof. Dr. Zupkó István, MTA doktora
Dr. Bhattoa Harjit Pal, MTA doktora
Dr. Gellén Balázs, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet "A" épület
2025. február 17. 13:00

BEVEZETÉS

A hypophysis - hypothalamus tengely működése a hypothalamusban termelődő neurohormonok, melyek a hypophysis működését szabályozzák és az ezen hypothalamicus neurohormonok szintézisét és felszabadulását (release) szabályozó idegi struktúrák révén valósul meg. Ezen releasing hormonok egyike a growth hormone releasing hormon (GHRH), egy hypothalamicus polipeptid hormon, melyet maga a hypothalamus szekretál. A GHRH-t termelő idegsejtek elsősorban a nucleus arcuatusból származnak, de kisebb mennyiségben a hypothalamus egyéb régióiban is megtalálhatóak. Stimulálja a növekedési hormon szintézist és release-t a hypophysisből. GHRH szintén stimulálja a hypophysis somatotroph sejtjeinek a szintézisét és proliferációját. Elsődlegesen a GHRH mint egy nagyobb, 108 aminosavból álló preprohormon prekursor molekula szekretálódik, melynek az N-terminális végén levő szignál szekvencia ezután enzimatikusan leszakad, hogy létrehozza az érett 44 aminosavból álló formáját és egy C-terminális GHRH-related peptidet (GHRH-RP). A GHRH, a GHRH-R-k és a GHRH gén különféle extrahypothalamicus szövetekben is jelen vannak, beleértve a gyomor-bélrendszert, a placentát, a petefészket, a herét és számos daganatot.

Frohman és Szabó 1981-ben elsőként írta le acromegalia klinikai képében jelentkező hasnyálmirigyrákban az ektópiás GHRH elválasztást. Ezt követően a 44 és 40 aminosavból álló GHRH formát is izolálták és azonosították humán carcinoid és pancreas tumorokban és csak később izolálták hypothalamusból. Később azt is bebizonyították, hogy a teljes biológiai aktivitást akár az N-terminális mindössze 29 aminosavra lerövidített szekvencia is képviseli [GHRH(1-29)NH₂].

A GHRH szerepe

Kezdetben úgy gondolták, hogy a GHRH szerepe csupán a növekedési hormon és az inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF-1) fiziológiás szintjének szabályozása. További kutatások eredményei arra is utalnak, hogy a GHRH neuroendokrin hatása mellett számos perifériás hatásban is szerepet játszik az autokrin/parakrin mechanizmusokon keresztül. Számos tanulmány számolt be arról, hogy a GHRH és analógjai szabályozzák a sejtproliferációt, a sejttúlélést, a sebgyógyulást, a szívizom regenerációját, a szív működést, a diabéteszes retinopátiát, az 1-es típusú cukorbetegséget, az apoptózist és a differenciálódást számos szövetben és sejttípusban. Napjainkra a GHRH mRNS expresszióját és a biológiailag vagy immunológiailag aktív GHRH jelenlétét különböző humán daganatokban is kimutatták, mint például az emlő-, méhnyálkahártya-, petefészek-, prosztata-, tüdő-, hasnyálmirigy-, gyomor-, vastagbél daganatokban és uvealis melanómában is.

Schally professzor és munkatársai azonosították a GHRH-R-k splice variánsait (SV) számos humán daganatban és más extrapituiter szövetekben, amelyek közvetíthetik a GHRH és GHRH agonista és GHRH antagonistáknak hatásait. E vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy habár négyféle SV került eddig leírásra, az SV1 az, ami kódolja a GHRH-R-k fő izoformáját. A GHRH-R-k expresszióját is megtalálták primer humán prosztata-, emlő-, tüdő- és mellékvese karcinómákban és uvealis melanómákban, valamint a rosszindulatú daganatok gyakorlatilag minden fő típusának kísérleti humán sejtvonalaiiban is kimutatták, beleértve a prosztata-, petefészek- és emlőrákot is, tüdő (SCLC és nem SCLC), vastagbél-, gyomor-, hasnyálmirigy, vese daganatokat, glioblastomát és Ewing-sarcomat, lymphomat és uvealis melanómákat.

Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy különböző humán daganatokban a GHRH és tumoros receptorai autokrin/parakrin mitogén hurkot képezhetnek, amely részt vehet a rosszindulatú folyamatok növekedésének szabályozásában.

Mindezen eredmények birtokában a rosszindulatú daganatok kezelésére szolgáló potenciális új terápiás lehetőség érdekében a GHRH számos hatékony analógját - elsősorban antagonistákat -terveztek és szintetizálták meg. A GHRH antagonisták daganatgátló hatása 16 különböző típusú humán daganat esetében, amelyeket közel 50 experimentális humán daganatmodell képvisel - beleértve a prosztatata-, emlő-, petefészek-, vese-, gyomor-, hasnyálmirigy-, tüdő carcinomákat és a közelmúltban publikált eredmények alapján az akut myeloid leukémiát - , részben úgy tűnik, a lokális autokrin módon stimuláló GHRH rendszerrel történő interferenciáján alapul.

Ígéretes és figyelemre méltó eredményekről számoltak be a GHRH agonistáival kapcsolatban is. Az új GHRH agonisták terápiás hatásai közé tartozik a kardioprotektív hatás, a szív regenerációja infarktus után, a vaszkuláris meszesedés csökkentése és a sebgyógyulás.

Az eddig említettek alapján számos human daganat típusban vizsgálták és mutatták ki a GHRH és GHRH-R-k expresszióját, azonban bizonyos daganatok és kórképek esetén köztük a humán endometrium és a gyermekkori hematológiai és onkológiai kórképek esetén nem állnak rendelkezésünkre ilyen eredmények, vagy csak limitált adatok érhetők el.

Az értekezésben a jelen kutatás tárgyát képező kórképek rövid bemutatása is szerepel. Elsőként említve a humán endometrium carcinomát majd a gyermekkori hematológiai és onkológiai malignus illetve benignus kórképeket, mindkettő esetében előbb a solid majd a csontvelőt érintő betegségeket.

CÉLKITŰZÉS

Jelen kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a GHRH, GHRH-R-k expresszióját eddig még nem vizsgált daganat típusokon, kiemelt hangsúlyt fektetve a humán endometrium carcinomára és gyermekkori hematológiai és onkológiai kórképekre.

- Tanulmányozni kívántuk a fent említett kórképek klinikai mintáiban a GHRH ligand expresszióját mRNS szinten RT-PCR módszer alkalmazásával
- Vizsgáltuk a GHRH-R-k jelenlétét mRNS szinten RT-PCR és fehérje szinten Western-blot és ligand kompetíciós assay alkalmazásával
- A receptor-pozitív minták esetén meg kívántuk állapítani a receptorok kötési karakterisztikáit (receptor koncentráció, kötési affinitás, specificitás)
- Molekuláris biológiai módszerekkel a különböző receptor SV-k expresszióját is tanulmányoztuk
- Elemeztük a korrelációt a receptorok expressziós mintázata és a vizsgált betegek klinikopatológiai jellemzői között
- Gyermekgyógyászati betegek mintái esetén tanulmányoztuk a jó- és rosszindulatú kórképek fennállása és a GHRH-R-k jelenléte közötti összefüggéseket

ANYAGOK

Endometrium carcinoma (EC) minták

A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján 39 beteg (átlagéletkor 62 év; 28-82 év közötti) humán endometrium carcinoma mintáját vizsgáltuk meg. A vizsgálatokhoz körülbelül 5-20 mm³ uterus szövetmintát használtunk, amelyet a staging műtét során eltávolítottak. A molekuláris biológiai vizsgálatok előtt minden mintán kórszövettani vizsgálatot végeztek az endometrium carcinoma jelenlétének megerősítésére. 28 endometrioid (71,8%) és 11 papilláris serosus (28,2%) adenocarcinoma volt. Hét esetben állt rendelkezésre normál endometrium szövet. A szövetmintákat lefagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk a teljes RNS izolálás és a membrán preparálásig. Ezen minták és normál emberi hypophysis minták gyűjtése és felhasználása vizsgálatainkban a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően történt, és a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális Intézmény Etikai Bizottsága (DERKEB/IKEB 2284-004) jóváhagyta. Minden tájékoztatott betegől beleegyezést kaptunk. Öt darab, pozitív kontrollként használt, normál, humán hypophysis referenciamintát anonim módon gyűjtöttünk a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Patológiai Intézet boncolási eseteinek paraffin szövettan tárából.

Gyermekgyógyászati minták

15 gyermek hematológiai és onkológiai mintát vizsgáltunk meg. Az összes rendelkezésre álló klinikopatológiai adatot, beleértve a diagnózis időpontját, a nemet, a daganat vagy a hematológiai rendellenesség típusát a kórszövettani vizsgálat alapján, a minta típusát és a túlélést vizsgáltuk. A betegek átlagéletkora 8,03 év volt (9 hónap és 15 év közötti betegek). A humán minták a Debreceni Egyetem Gyermekgyógyászati Intézetének Gyermekhematológiai-Onkológiai részlegén kezelt betegektől származtak. Hét betegnek volt szolid daganata, nyolc

gyermeknek rosszindulatú vagy jóindulatú hematológiai elváltozása volt. Hét minta csontvelői aspirátum volt, egy hematológiai minta perifériás vérből származott. A solid tumorszöveteket az elsődleges műtét idején vettük. Valamennyi minta esetében rutin kórszövettani vizsgálat is történt, a kórismét a Debreceni Egyetem Patológia Intézetéből helyi patológus igazolta. Kutatómunkánkat a Helsinkai Nyilatkozatnak megfelelően végeztük, a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális Intézmény Etikai Bizottsága (DERKEB/IKEB 2284-004) jóváhagyta. Minden tájékoztatott gyermek esetén szülői beleegyezést kaptunk. A daganatszöveteket azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és a további feldolgozásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Valamennyi diagnosztikai beavatkozást neoplasztikus állapotok gyanúja alapján végeztünk.

MÓDSZEREK

RNS izolálás

Az ***EC szövetmintákat*** Mikro-Dismembrator-U-val (SartoriusB. Braun Biotech, Melsungen, Németország) homogenizáltuk, és az RNS extrakcióhoz Nucleospin Total RNA Isolation Kit-et (Macherey-Nagel, Düren, Németország) használtunk. Az RNS koncentrációját és tisztaságát Nanodrop ND-1000 UV spektrofotométerrel (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) határoztuk meg.

Minden gyermekgyógyászati mintából és humán hypophysis mintából RNS izolációs kittel (Macherey-Nagel, Düren, Németország) teljes RNS izolálást végeztünk. Az RNS koncentrációt és tisztaságot NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) határoztuk meg. Amennyiben a OD260/280 arány több volt mint 1,8 azt

jó RNS tisztaságnak fogadtuk el, ezáltal alkalmasnak tekintettük a génextpresszió mérésére. A további molekuláris biológiai analízis megtörténtéig az RNS mintákat $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

RT-PCR az EC mintákon

A teljes RNS-t (200 ng / μl) MMLV Reverz Transzkriptázzal és oligo(dT)15-tel (Promega Co, Madison, WI, USA) cDNS-sé írtuk át a gyártó utasításai szerint. A GHRH-R-al kapcsolatos vizsgálatainkhoz használt primereket a primer3_www.cgi v 0.2 software segítségével tervezetük.

A primerek specificitásának megerősítéséhez a PCR reakció során kapott PCR-termékeket az ABI-PRISM 3130 Genetic Analyzer segítségével (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mindkét irányban megszekvenáltuk.

A β -aktin housekeeping gén, a GHRH ligand, az SV2, SV3 és SV4 splice variánsokhoz is génspecifikus primereket használtunk.

A β -aktin, GHRH-R, GHRH és SV1 gének esetében a PCR reakciókeverék 1 \times PCR puffert, 1 U Taq polimerázt (Invitrogen, NY, USA), 1,5 mM MgCl_2 -ot, 0,3 μM primert (Invitrogen) és 200 μM -nak megfelelő dNTP-eket tartalmazott (Fermentas, Leon-Rot, Németország). A templátnak megfelelő cDNS-ből 1,0 μL -t használtunk 25 μl végtérfogatban.

Denaturálás után (3 perc $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on) a cDNS-t 45 cikluson keresztül amplifikáltuk (45 másodperc $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on; 30 másodperc $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on és 90 másodperc $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on). A β -aktint 30 ciklussal amplifikáltuk. Ezt követően egy utolsó, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on kivitelezhető, 10 perces elongációs lépést alkalmaztunk, majd a mintákat $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttük le.

Az SV2, SV3 és SV4 splice variánsok esetében a PCR reakciókeverék 1 \times PCR puffert, 1,25 U TruStart Taq polimerázt (Fermentas), 3 mM (SV2, SV4) vagy 4 mM (SV3) MgCl_2 -t, 0,4 μM (SV2, SV4) vagy 0,5 μM (SV3) tartalmazott mindegyik primerből; 300 μM (SV2) vagy 200 μM (SV3, SV4) minden dNTP-ből; és 1,5 μL cDNS volt 25 μl végső térfogatban.

Denaturáció és enzimaktiválás után (3 perc 95 °C-on) a cDNS-t 45 cikluson keresztül amplifikáltuk (30 sec 95 °C-on; 30 sec 63 °C-on és 60 sec 72 °C-on). Ezután egy utolsó 72 °C-on történő 5 perces elongációs lépést alkalmaztunk, majd a mintákat lehűtöttük 4 °C-ra. A PCR-termékeket elektroforézissel választottuk el etidium-bromiddal festett 2%-os agarózgélben.

RT- PCR a gyermekgyógyászati mintákon

250 ng izolált RNS-t minden egyes gyermekgyógyászati mintából reverse-transzkripcióval cDNS-sé lett átírva a Touch Thermal Cycler PCR készülékben (Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, USA) a Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline, London, Egyesült Királyság) segítségével.

A RT-PCR reakciót a gyártó útmutatásai szerint, 20 µl térfogatban, random hexamerek alkalmazásával végeztük.

A PCR reakció 35 ciklusból állt (95 °C 15 másodpercig, 60 °C 30 másodpercig, 72 °C 10 másodpercig és 72 °C két percig). A szennyeződés tesztelésére RT-NTC-t is beiktattunk.

Az RT-PCR reakciót a GHRH és az SV1 kimutatására gyermekgyógyászati mintákban 25 µl végső reakciótérfogatban végeztük génspecifikus primerekkel. Pozitív kontrollként normál humán agyalapi mirigyét, háztartási géneként β-aktint használtunk. Az RT-PCR reakció 35 ciklusból állt (95°C 15 másodpercig, 60-67°C 30 másodpercig, 72 °C 10 másodpercig), és a végső amplifikálás 72 °C-on 2 percig tartott. A PCR-termékeket 1,5%-os GelRed-et (Bioline, London, Egyesült Királyság) tartalmazó agaróz gélen választottuk el, és UV-fényben detektáltuk, majd AlphaDigiDoc™ RT-vel (Alpha Innotech, Santa Clara, CA, USA) digitalizáltuk. A DNS méretének meghatározásához 25 vagy 50 bp DNS-markert (Bioline, London, Egyesült Királyság) használtunk.

A GHRH-R fehérje vizsgálata Western Blot technikával a vizsgálatainkban használt gyermekgyógyászati mintákon

A szöveti lizátum készítéséhez a gyermekgyógyászati mintákat homogenizáltuk és jéghideg fehérje lízis pufferben (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) proteáz- és foszfatázgátlókkal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kiegészítve lizáltuk. A szöveti lizátum fehérje mennyiségi meghatározását Bradford reagenssel végeztük. Az izolált fehérjéket a Western blot előtt 4× Laemmli pufferrel (Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, USA) hígítottuk, majd minden fehérjemintából 40 µg egyenlő térfogatú mintát 95 °C-on 8 percig forraltuk. A lizátumokat a célfehérje molekulatömegének megfelelően 10%-os nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélen választottuk el elektroforézissel (SDS-PAGE). Az elválasztott fehérjék méretének meghatározásához egy molekulatömeg-markert (Precision Plus Dual Color Protein Standard, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, USA) is futtattunk a SDS-PAGE-en.

A fehérjéket polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra vittük át (Millipore, Burlington, MA, USA). 5%-os tej-TBS-Tweennel való blokkolásakor a membránokat elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át, 4 °C-on (anti-GHRH-R, 1:1000 hígítás GHRH-R poliklonális antitest, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), anti-HPRT, 1:2000 hígítás (nyúl monoklonális; Biol. Technology, CA, USA).

A HPRT-t, mint housekeeping azaz „háztartási” fehérjét alkalmaztuk. A TBS-Tweennel végzett mosási lépések után a membránokat anti-nyúl IgG másodlagos antitesttel (1:5000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) inkubáltuk két órán át szobahőmérsékleten. Ezután a membránok TBS-Tweennel történő többszöri mosása után a jelet kemilumineszcenciával detektáltuk Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) alkalmazásával. Az egyes sávok intenzitását HPRT-re normalizáltuk. A

menyiségi meghatározást a Bio-Rad Image Lab 5.2.1 szoftverrel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) végeztük.

Membrán - és radioligand kötési vizsgálatok EC mintákon

A GHRH antagonistá JV-1-42 radioaktív jódozott származékait a korábban leírtak szerint klóramin-T módszerrel állítottuk elő, néhány kisebb módosítással. Humán EC mintákból tumorsejt membránokat állítottunk elő a receptorkötési vizsgálatokhoz mely a korábbi tanulmányokban már leírtak szerint történt. Röviden, a humán tumor mintákat 50 mmol/l Tris-HCl pufferben (pH 7,4) homogenizáltuk, és proteázgátlók (0,25 mmol/l fenil-metil-szulfonil-fluorid, 2 µg/ml pepsztatin A és 0,4% aprotinin (Merck, Darmstadt, Germany) hozzáadásával Ultra-Turrax szövethomogenizátor (IKA Works, Wilmington, NC, USA) segítségével; majd a nyers membránfrakciót a leírtak szerint elkészítettük, és -70 °C-on tároltuk az in vitro vizsgálatig. A fehérjekoncentrációt Bradford módszerével határoztuk meg. A GHRH-R kötődési vizsgálatoknál, amint arról részletesen beszámoltunk, in vitro ligand-kompetíciós vizsgálatokat alkalmaztunk, amelyek a [¹²⁵I]JV-1-42 mint radioligandum kötődésén alapultak humán endometrium carcinoma minták membránfrakcióihoz. A GHRH antagonistá JV-1-42-t és [¹²⁵I]JV-1-42-t, mint radioligandumot, korábban már jellemezték, miszerint nagy affinitású kötődést mutattak patkány és emberi agyalapi mirigyhez, valamint emberi vese-, prosztatá-, emlő- és egyéb daganatokhoz. A radiojóddal kezelt JV-1-42 nagy affinitású kötődését az SV1-hez szintén kimutatták és korábban már közölték.

Röviden, az 50-160 µg fehérjét tartalmazó membrán homogenizátumokat két vagy három párhuzamosban inkubáltuk 60 000-80 000 cpm [¹²⁵I]JV-1-42 és növekvő koncentrációjú (10^{-12} - 10^{-6} mol/l) nem radioaktív peptidekkel, mint kompetitorokkal 300 µl összterfogató kötőpufferben (50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L MgCl₂, 1% BSA és 30

$\mu\text{g}/\text{mL}$ bacitracin, pH 7,4) proteázgátlókkal kiegészítve. Egy óras inkubálás és elválasztás után a receptorhoz kötött frakciót tartalmazó végső pelletet γ -számlálóban. Munson és Rodbard LIGAND-PC számítógépes görbeillesztő szoftverével meghatároztuk a receptorkötés típusát, a disszociációs állandót (K_d) és a receptorok maximális kötőképességét (B_{max}). A membránfehérje frakciók korlátozott mennyisége miatt a GHRH-R kötődését 11 darab EC mintában tudtuk megvizsgálni.

Membrán - és radioligand kötési vizsgálatok gyermekgyógyászati mintákon

A GHRH antagonistá JV-1-42 radioaktív jódozott származékait klór-ramin-T módszerrel állítottuk elő, amint azt korábban közöltük, néhány kisebb módosítással, és HPLC-vel tisztítottuk.

A humán gyermekgyógyászati szolid tumor mintákból előállított sejtmembrán preparátumokon a receptorkötési vizsgálatokat a korábban leírt radioligand kompetíciós assayk szerint végeztük. Röviden összefoglalva, a humán gyermekgyógyászati mintákat felolvasztottuk, majd 50 mmol/l Tris-HCl pufferben (pH 7,4) homogenizáltuk Ultra-Turrax szövethomogenizátorral (IKA Works, Wilmington, NC, USA), és proteáz inhibitorok (0,25 mmol/l fenilmetil-szulfonilfluorid, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A és 0,4% aprotinin) (Merck, Darmstadt, Germany) hozzáadásával. A végső nyers membránfrakciókat a leírtak szerint készítettük és $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk az *in vitro* vizsgálatig. A fehérjekoncentrációt Bradford módszerével határoztuk meg. A GHRH-R kötődési vizsgálatokat a korábban részletesen leírtak szerint végeztük, *in vitro* ligand-kompetíciós vizsgálatot alkalmazva, amelyek a [^{125}I]JV-1-42 radioligandumként való kötődésén alapultak a humán gyermekminták membránfrakcióihoz. A [^{125}I]JV-1-42 jelölt GHRH antagonistá radioligandum korábbi tanulmányok szerint nagy affinitású kötődést mutatott a patkány és az emberi agyalapi mirigyhez, valamint az emberi vese-,

méhnyálkahártya-, prosztata, mell- és egyéb daganatokhoz. A radioaktívan jelölt JV-1-42 specifikus, nagy affinitású kötődését az SV1 receptorhoz korábban is kimutatták és közölték. Röviden, a membrán homogenizátumokat [¹²⁵I]JV-1-42 radioligandummal és növekvő koncentrációjú (10^{-12} - 10^{-6} mol/l) nem radioaktív kompetíciós peptidekkel inkubáltuk kötőpufferben, mely 300 µl ösztérfogatú volt (50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L MgCl₂, 1% BSA és 30 µg/ml bacitracin, pH 7,4), a leírás szerint proteázgátlókkal kiegészítve. Egy órás inkubálás és elválasztás után a receptorhoz kötött frakciót tartalmazó végső pellet radioaktív jelét γ -számlálóban megszámláltuk.

Munson és Rodbard görbeillesztő számítógépes programját (LIGAND-PC) használtuk a GHRH-R-k kötődési jellemzőinek (K_d =disszociációs állandó és B_{max} =receptorok maximális kötőképesége) kiszámításához. A nagyon kis mintaszám és a membránfrakciók korlátozott mennyisége miatt a GHRH-R-k ligandum kompetíciós vizsgálatát mindössze 7 mintában tudtuk elvégezni.

EREDMÉNYEK

Molekuláris biológiai vizsgálataink eredményei az EC mintákon

Új primereket terveztünk a GHRH-R és az SV1 PCR amplifikálására. A PCR-termékeket mindkét irányban szekvenáltuk, és megerősítettük a primerek specificitását. A GHRH-R esetében egy 121 bázispár hosszúságú terméket amplifikáltunk az 1. exonról a 2. exonra, amely csak a teljes hosszúságú receptor mRNS-ben van jelen, és nincs jelen a splice variánsokban. Ez a termék egyetlen EC tumormintában vagy normál endometrium szövetben sem volt kimutatható. Azonban, ahogy az várható volt, a teljes hosszúságú GHRH-R mRNS

expresszióját mind az öt, pozitív kontrollként használt hypophysis mintában ki tudtuk mutatni. Ennek megfelelően csak az ezekből a mintákból nyert GHRH-R PCR-terméket használtuk a szekvenenciaanalízishez. Az SV1 receptor variáns esetében a 415 bp hosszúságú PCR termékek (a 3. introntól = hiányzik a teljes hosszúságú receptorban; a 7. exonig = csak az SV1-ben és a teljes hosszúságú receptorban van jelen, a többi változatban nem) az endometrium tumormintákban azonosak voltak az agyalapi mirigy mintáival. Az SV2, SV3 és SV4 splice variánsok 523, 245 és 120 bp hosszú PCR termékek voltak. Pozitív kontrollként emberi agyalapi mirigy szöveteket vizsgáltunk, melyek mindegyikében mind a négy splice variáns és a teljes hosszúságú GHRH-R is expresszáldott. A GHRH ligandot a 39 vizsgált daganatmintából huszonnégyben (61,5%) és a 7 normál endometrium mintából háromban (42,9%) kimutattuk. A GHRH mRNS expresszióját az öt vizsgált humán agyalapi mirigy szövetben is sikerült kimutatnunk. Az endometrium carcinomában szenvedő betegeknél az SV1 a leginkább funkcionális forma a lehetséges rákterápia szempontjából és kilenc EC mintában (23%) tudtuk kimutatni. A második leggyakoribb variáns az SV4 volt, amelyet 39 rosszindulatú daganatból 8-ban (20,5%) mutattak ki. Az SV2 előfordulását csak három tumor mintában lehetett megfigyelni (7,7%), és az SV3 variáns expressziója nem volt jelen a tumormintákban. A teljes GHRH-R és a splice variánsok jelenléte egyik vizsgált nem tumoros endometrium szövetben sem volt kimutatható. Összességében a 39 EC minta közül tizennégyben (35,9%) tudtuk kimutatni a GHRH-R-k splice variánsait. A GHRH ligandum mRNS és a GHRH-R splice variánsok együttes expresszióját a 39 beteg közül tizennégyben (35,9%) találtuk meg.

Eredményeink azt mutatják, hogy minden GHRH-R splice variáns pozitív minta expresszálta a GHRH ligandum mRNS-ét. A 39 EC minta közül 10 mutatott mRNS-expressziót a GHRH-ra, de nem a GHRH-R-k splice variánsaira. Öt esetben csak az SV1 vagy az SV4

expresszálódott a GHRH-R 4 splice variánsa közül. Egy esetben SV1 és SV2 vagy SV1 és SV4 koexpressziót, másik két esetben SV1, SV2 és SV4 koexpressziót figyeltünk meg.

Radioligand kötési vizsgálatok eredményei EC mintákon

A GHRH-R-k jelenlétét és kötődési jellemzőit, valamint a radiojódozott GHRH analóg JV-1-42 specifikus kötődését humán EC-minták membrán homogenizátumaihoz radioreceptor assay segítségével határoztuk meg. A ligand-kompetíciós vizsgálatokkal vizsgált tizenegy tumormintából kilenc minta (81,8%) mutatott GHRH-kötést.

Vizsgáltuk a GHRH-R-k koncentrációját és kötődési affinitását is EC membránokban. A [¹²⁵I]JV-1-42 kötési görbéinek és a specifikus kötődési adatok Scatchard-analízisének elemzése 9 receptor pozitív tumormintában azt mutatta, hogy a GHRH-R-k átlagos disszociációs állandója (K_d) 5,28 nM (tartomány: 1,63-8,81 nM). A GHRH-R-k átlagos koncentrációja (maximális kötési kapacitás, B_{max}) 385,0 fmol/mg membránfehérje volt humán EC-ből származó membránokban (tartomány: 249,5-509,5 fmol/mg membránfehérje). Receptorkötési eredményeink alapján a one-site azaz egy-kötőhelyes modell biztosította a legjobb görbeillesztést, amely a nagy affinitású GHRH-R-k egyetlen homogén egy-kötőhelyes osztályát képviseli humán EC-mintákban. Meghatároztuk a specifikus kötőhelyek jellemzéséhez elengedhetetlen biokémiai specifikációkat és paramétereket is. Így kimutattuk, hogy a [¹²⁵I]JV-1-42 *in vitro* receptorkötődése specifikus, reverzibilis, hőmérséklet- és időfüggő, és lineáris a fehérjekoncentrációkkal a vizsgált humán endometrium tumormintákban. A radioaktívan jelölt JV-1-42 kötődését a hGHRH(1-44) vagy a hGHRH(1-29)NH₂ koncentrációjának (10⁻¹²-10⁻⁶ M) növelése kiszorította a GHRH-R kötőhelyekről, miközben a szerkezetileg és funkcionálisan nem rokon peptidek, mint például a szomatosztatin, a luteinizáló hormon-felszabadító hormon (LHRH), az epidermális növekedési faktor (EGF),

a [Tyr⁴] bombesin és az inzulinszerű növekedési faktor I (IGF-I) nem gátolták a radiojódozott JV-1-42 kötődését 1 µM koncentrációban sem. Eredményeink azt is mutatják, hogy a ligandumkötést a GHRH-R-k SV1 altípusának mRNS expressziója kísérte minden vizsgált endometriumrák mintában. A radioreceptor vizsgálatok és az SV1 altípusú mRNS vizsgálatok eredményeinek összehasonlító elemzése kimutatta, hogy az SV1 altípus expressziója 100%-ban összhangban van a GHRH antagonistá [125I]JV-1-42 specifikus kötőhelyeinek jelenlétével. Vizsgálatunkban nem találtunk összefüggést a klinikopatológiai jellemzők és a receptorális eredmények között.

Molekuláris biológiai vizsgálataink eredményei a gyermek hematoonkológiai mintákon

A GHRH és a GHRH-R SV1 expressziójának RT-PCR vizsgálata

Az RT-PCR analízisek kimutatták a GHRH peptid ligandumnak megfelelő 150 bp termék jelenlétét a vizsgált gyermekmintákban. A 15 vizsgált minta közül 11 gyermekekből származó minta (73%) mutatott mRNS expressziót GHRH-ra. A CBN, HS, ITP és az egy ALL mintán nem mutattunk ki GHRH expressziót. Annak vizsgálatára, hogy a humán gyermekgyógyászati hematoonkológiai minták membránfrakcióiban jelenlévő receptorfehérje és specifikus, nagy affinitású GHRH kötőhelyek vajon a GHRH-R-k mRNS expressziójának termékei-e, RT-PCR vizsgálatot végeztünk. Az RNS reverz transzkripciója, majd PCR amplifikációja specifikus primerekkel amplifikált 373 bp-os PCR termékeket adott, amely megfelelt a korábban leírt GHRH-R SV1-nek. Hasonlóan a GHRH ligand mRNS expressziós eredményeihez a 15 vizsgált gyermekgyógyászati mintából 11 esetén (73%) tudtuk kimutatni az SV1 mRNS expresszióját. CBN, HS, ITP és mindössze egy ALL minta nem expresszálta az SV1 mRNS-

ét. A negatív kontrollok nem adtak kimutatható jelet, ami arra utal, hogy a PCR-termékek cDNS-ből, nem pedig genomiális DNS-ből vagy más szennyeződésekől keletkeztek.

Gyermekgyógyászati minták GHRH-R fehérje Western blot analízise

Western blot analízis alapján a GHRH-R fehérje mind a hét (7) vizsgált humán gyermekkori szolid tumormintában expresszáldott. Western blot analíziseink során anti-GHRH-R antitesttel 40 kD molekulatömegű sávokat tudtunk kimutatni, amelyek a szakirodalom szerint megfelelnek a GHRH-R SV1-nek a vizsgált gyermekgyógyászati mintákban. A vizsgált minták egymástól eltérő erősségű receptorfehérje-expressziót mutattak.

GHRH receptor kötési analízise gyermekgyógyászati mintákon

A specifikus GHRH-R kötőhelyek jelenlétét és a ^{125}I -vel jelölt GHRH antagonistá JV-1-42 membránreceptorokhoz való kötődésének jellemzőit gyermekkori szolid tumormintákon ligand kompetíciós tesztekkel vizsgáltuk. 7 mintát tudtunk megvizsgálni, és eredményeink azt mutatták, hogy minden tanulmányozott minta, beleértve két jóindulatú daganatot és öt rosszindulatú daganatot specifikus GHRH-R kötődést mutatott. A kiszorítási vizsgálatok és a Scatchard-analízisek elemzése azt mutatta, hogy az egykötőhelyes modell biztosította a legjobb görbeillesztést, jelezve a nagy affinitású GHRH-R-k egyetlen homogén osztályának expresszióját humán gyermekminták sejtmembránjaiban. A GHRH-R kötődés számítógépes kiértékelése a hét gyermekgyógyászati mintában azt mutatta, hogy a GHRH-R-k átlagos disszociációs állandója (K_d) 4,57 nM (tartomány: 1,35-8,99 nM) volt. A GHRH-R-k átlagos receptorkoncentrációja (B_{max} , maximális kötőképesség) 375,7 fmol/mg membránfehérje volt (tartomány: 222,1-733,0 fmol/mg membránfehérje). Radioreceptor vizsgálataink alapján a

[¹²⁵I]JV-1-42 GHRH antagonist analóg kötődése specifikus, idő- és hőmérsékletfüggő és reverzibilis volt, ami alapvető biokémiai paramétereket és specifikációkat mutat be a receptorkötés azonosításához a vizsgált humán mintákban. A ligand-kompetíciós vizsgálatok eredményei jól korreláltak a Western blot eredménnyel, amely azt mutatja, hogy a GHRH-R fehérje jelenléte 100%-ban összhangban van, vagyis szoros korrelációban van a ¹²⁵I-vel jelölt JV-1-42 GHRH analógot kötő specifikus kötőhelyek expressziójával.

Nemcsak a GHRH-R-k SV1 altípusának az mRNS-ét azonosítottuk, hanem Western blot és ligandumkötési vizsgálattal a receptorfehérje is azonosításra került minden vizsgált gyermekmintában. A GHRH-R fehérje analízis és az SV1 altípusú mRNS vizsgálatok eredményeinek összehasonlító elemzése alapján hét mintát vizsgálva találtunk szoros összefüggést. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy az SV1 altípus expressziója 100%-ban konzisztens volt a Western-blottal vizsgált GHRH-R fehérjék jelenlétével és a GHRH antagonist [¹²⁵I]JV-1-42 specifikus kötődésével, amelyeket radioreceptor vizsgálatokkal vizsgáltunk.

MEGBESZÉLÉS

Endometrium carcinoma mintákon kapott eredményeink megbeszélése

Az endometrium carcinoma világszerte a nők morbiditásának és halálozásának egyik jelentős oka, és a nők körében a hatodik leggyakoribb rosszindulatú daganat. A korai stádiumú EC prognózisa általában kedvező, de számos nőbetegben agresszív rosszindulatú daganat formájában fordulhat elő.

Munkánk során azt találtuk, hogy az EC minták körülbelül egyharmada (35,9%) volt pozitív a GHRH-R egy vagy több splice variánsára (SV1-4), de a normál endometriumszövetek egyike

sem és 23%-ban kimutattuk az SV1 mRNS expresszióját is. Egy korábbi tanulmányban az endometrium rákos szöveteinek 43%-a pozitívnak bizonyult az SV1 fehérje expressziójára immunhisztokémiával. Ez az enyhe eltérés azzal magyarázható, hogy ebben a vizsgálatban az SV1 fehérje kimutatására használt antiszérumok az SV1 fehérje N-terminálisán lévő első 25 aminosavra specifikusak, amely az SV2 és SV4 altípusokban is jelen van.

Míg az SV1, SV2 és SV4 méret alapján megkülönböztethető a Western blot alapján, addig az immunhisztokémia mindhárom GHRH-R izoforma esetében pozitív jeleket ad. Ezenkívül pozitív immunhisztokémiai jeleket csak az endometrium adenocarcinómák mirigyeinek hámsejtjeinek citoplazmájában mutattak ki, a sejt felszínén azonban nem. Azt találtuk, hogy szövetsorozatunk második leggyakrabban kifejezett splice variánsa az SV4 volt (20,5%). A fennmaradó két splice variáns, az SV2 és SV3 jelenléte csak három mintában volt kimutatható, illetve SV3 egyik mintában sem. Az SV3-ból és SV4-ből származó GHRH-R izoformák azt sugallják, hogy valószínűleg nem képviselnek érett receptorfehérjéket, amelyek a sejtfelszínen megnyilvánulnának. Az SV2, amely rendelkezik az SV1 csonkolt N-terminális extracelluláris doménjével, de csak két transzmembrán domént tartalmaz, a sejtfelszínre kerülhet.

Az agyalapi mirigy típusú GHRH-R mRNS-eit nem tudtuk kimutatni sem endometrium carcinómában, sem normál endometrium szövetekben. Korábbi vizsgálatokban a hypophysis GHRH-R expresszióját valós idejű kvantitatív PCR-rel kimutatták különböző rákos sejtvonalakban, beleértve a non-Hodgkin limfómát, a hasnyálmirigyrákot, a glioblasztómát és a kissejtes tüdőcarcinómát, de az expresszió mértéke alacsony az extrapituiter normál szövetekben. Eredményeink egybevágóak azokkal a korábbi eredményekkel, amelyekben a klasszikus hypophysis típusú GHRH-R expressziója különböző humán tumorszöveteken nem volt kimutatható, vagy ritkábban volt jelen, mint az SV1.

Tizenegy esetben tudunk membránfehérje frakciókat előállítani radioligand kötési vizsgálatokhoz, hogy igazoljuk a specifikus GHRH kötőhelyek jelenlétét. Ligand-kompetíciós

vizsgálatokkal kimutattuk a GHRH-ra specifikus, nagy affinitású receptorok jelenlétét. Molekuláris biológiai elemzések és radioligandumkötési vizsgálatok egyértelműen kimutatták, hogy a GHRH-R-k SV1 altípusának mRNS-expressziója 100%-ban összhangban van a radioaktívan jelölt JV-1-42 GHRH analóg specifikus receptorainak jelenlétével. Az agyalapi mirigy típusú GHRH-R-ek mRNS-expresszióját azonban nem mutatták ki. Fontos megjegyezni azt is, hogy a ligand kompetíciós vizsgálattal vizsgált összes receptor-pozitív humán EC minta jól kimutatható mennyiségben expresszálta az SV1 típusu GHRH-R gént. Ezenkívül a GHRH ligandum PCR-termékeit a 39 humán EC minta közül 24-ben (61,5%) találtuk meg. 14 mintában (35,9%) mind a GHRH, mind a GHRH-R splice variánsok mRNS-ét kimutattuk. Míg a legvalószínűbb funkcionális receptor splice variáns, az SV1 a vizsgált EC-minták mindössze 23%-ában volt jelen, a GHRH ligandum a tumoros szövetek több mint 60%-ában és a normál endometrium szövetek 40%-ában volt kimutatható. Egy korábbi tanulmányban a GHRH mRNS kimutatható volt normál endometriumban és EC-ben; az endometrium GHRH mRNS-ében azonban nem mutattak ki változást az ugyanattól a betegtől származó normál és neoplasztikus szövetek között. A szintek azonban magasabbak voltak, mint a jóindulatú nőgyógyászati betegségekben szenvedő más betegek myometriumszöveteiben. Ezért felmerült, hogy a GHRH elősegítheti az endometrium proliferációját, és részt vehet az EC és az endometriózis patogenezisében. Egy másik tanulmányban, amely a GHRH és az SV1 jelenlétét vizsgálta különböző normál egérszövetekben, beleértve a méhnyálkahártyát is, a GHRH expressziót kimutatták, de ennek SV1 receptorát azonban nem. A szerzők azt feltételezték, hogy a GHRH jelenléte ezekben a szövetekben nem véletlen, hanem fiziológiailag fontos, és összhangban lehet a neurohormonok parakrin/endokrin hatásával és a GHRH extrapituiter hatásaival, amelyeket nemcsak az SV1, hanem más receptor(ok) közvetít. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a GHRH antagonisták, mint például az MZ-J-7-118, MZ-5-156 és JMR-132, gátolják a humán kísérleti

EC-k növekedését mind in vitro, mind in vivo. Ezen antagonisták jótékony onkológiai hatásai a kísérleti rákkezelésben az agyalapi mirigy-máj IGF-I tengely szuppressziójának, valamint a GHRH antagonistáknak az agyalapi mirigy GHRH-R-hoz és/vagy tumorokon jelenlévő splice variánsaihoz való kötődése révén történő közvetlen gátlásának tulajdoníthatók. Egy közelmúltbeli tanulmány egy olyan mechanizmust is bemutatott, amellyel a GHRH-R antagonisták, például a MIA-602 esetén az SV1-et célozzák meg, és gátolják az SV1 által közvetített oesophagus squamosus cell carcinoma tumornövekedését. Eredményeik arra utalnak, hogy az SV1 egy hipoxia által kiváltott onkogén promotor, amely a GHRH-R antagonisták potenciális célpontja lehet.

Mindazon eredmények alapján, hogy a GHRH antagonisták képesek voltak gátolni a kísérleti daganat modellek tumornövekedését és, hogy a EC minták egy része expresszálta a GHRH-R-k a hatékony új GHRH antagonisták alkalmazása alkalmas lehet az ilyen típusú rosszindulatú daganatok kezelésében. Ennek a feltételezésnek az igazolására azonban további vizsgálatokra van szükség.

A jövőben szeretnénk kiterjeszteni vizsgálatainkat és megpróbálni még nagyobb számú humán EC-mintát gyűjteni, hogy tovább tanulmányozzuk és elemezzük a GHRH-R-ek expresszióját az ilyen humán tumorszövetekben. Ezek a vizsgálatok új kvantitatív adatokat is szolgáltathatnak a GHRH-R-k és splice variánsaik mRNS- és fehérjeszintjéről. Ezekből az eredményekből feltehetően meg tudjuk jósolni a betegek potenciális válaszát a GHRH-R alapú terápiára.

Gyermekgyógyászati mintáinkon kapott eredményeink megbeszélése

A GHRH-ról és a GHRH-R-k splice variánsairól a gyermekkori daganatos megbetegedések esetén nagyon korlátozottak a közzétett adatok és információk. Jelen tanulmányunkban magának a GHRH valamint a GHRH-R-k mRNS-expresszióját és a GHRH-R-k SV-jeinek expresszióját vizsgáltuk RT-PCR-rel, a GHRH-R fehérje jelenlétét Western-blottal, valamint a GHRH-R SV1 kötési jellemzőit radioreceptor vizsgálattal számos humán gyermekgyógyászati hematológiai és onkológiai betegségben, beleértve a Hodgkin lymphomát (HL), a rhabdomyosarcomát (RMS), a teratomát (TR), az akut lymphoblastos leukémiát (ALL), a fibrosus dysplasiát (FD), a mesenchymalis hamartómát (MH), az infantilis myofibromatosis (IM), a krónikus jóindulatú neutropeniát (CBN), a hereditér spherocytosis (HS) és az immunthrombocytopeniát (ITP).

A kísérleteinkben vizsgált 15 humán minta közül 11 gyermekgyógyászati mintán (73%) tudtuk kimutatni a GHRH mRNS expresszióját. Ez a 11 minta a GHRH-R SV1 mRNS-ét is expresszálta. A GHRH-R fehérjét két jóindulatú daganatmintában és öt rosszindulatú daganatban tudtuk igazolni Western blottal. A specifikus, nagy affinitású GHRH-R kötőhelyek jelenlétét mind a hét vizsgált humán gyermekgyógyászati solid tumormintában kimutattuk. A gyerekmintákon kapott eredményeink részben összhangban vannak Jimenez és munkatársai közelmúltbeli publikációjával akik kimutatták a GHRH-R jelenlétét 3 humán akut myeloid leukémia (AML) sejtvonalban (KG-1a, K-562 és THP-1), valamint 9 AML-ben szenvedő betegről származó mintában. A GHRH antagonistá MIA-602-vel végzett kezelést követően *in vitro* e sejtvonalak sejtproliferációjának jelentős gátlását találták. Ezenkívül a három humán AML-modell tumorxenograftját hordozó egerek MIA-602-vel történő kezelése hatékony tumornövekedés-gátlást eredményezett. Legjobb tudomásunk szerint ez az egyetlen publikáció

a GHRH-R expressziójáról és a GHRH-R jelátvitel lehetséges szerepéről egy hematológiai rendellenesség, például az AML patofiziológiájában.

Eredményeink azt mutatják, hogy a GHRH és a GHRH SV1 gyakori előfordulása a gyermekek hematológiai és onkológiai rendellenességeiben alátámasztja a GHRH-R-k további vizsgálatának szükségességét, mint a diagnózis és a terápia lehetséges molekuláris célpontjait. Ezek az új eredmények potenciális új terápiás megközelítést kínálhatnak ezekre a rosszindulatú daganatokra.

Esetükben a hatékony, újonnan szintetizált GHRH receptor antagonisták, mint lehetséges terápiás ágensek jöhetnek szóba, valamint jelen új eredményeink a GHRH-R jelátvitel lehetséges funkciójára utalhatnak különböző gyermekkori hematológiai és onkológiai rendellenességek patológiájában.

Legjobb tudomásunk szerint munkánk az első olyan kutatás, amely a GHRH és GHRH-R SV-k expresszióját vizsgálta különböző gyermekkori daganatokban és más neoplastikus állapotokban.

Összességében elmondható, hogy eredményeink nem csak a gyermekrákkutatás horizontját tágíthatják, hanem hozzájárulnak további célok eléréséhez, például az új, hatékony erős GHRH peptid analógok potenciális diagnosztikai és terápiás alkalmazásainak kifejlesztéséhez és létrehozásához a gyermekonkológiában és -hematológiában.

Eredményeink megnyithatják az utat a GHRH-R alapú célzott daganatterápia új, rendkívül potens GHRH peptid analógjainak további fejlesztése előtt, amelyek a jelenlegi kezelési stratégiák érvényes alternatívájaként szolgálhatnak.

A DISSZERTÁCIÓ LEGFONTOSABB EREDMÉNYEINEK ÖSSZEGZÉSE ÉS KONKLÚZIÓJA

1. Kimutattuk, hogy a GHRH valamint a GHRH-R SV-k mRNS-einek, de nem a hypophysis típusú GHRH-R mRNS-einek az expresszióját humán EC szövetekben, ami egy autokrin/parakrin GHRH hurok létezésére utalhat. Az endometrium carcinoma minták mintegy harmada expresszálja a GHRH receptor valamely variánsát, leggyakrabban a legnagyobb jelentőséggel bíró SV1 variánst.
2. Az EC minták egy részéből radioligand technikával mutatunk ki GHRH-ra specifikus, nagy affinitású receptorokat, valamint meghatároztuk a kötődésre jellemző paramétereket.
3. Munkánk az első olyan kutatás, amely a GHRH és GHRH-R SV-k expresszióját különböző gyermekkori daganatokban és más neoplasztikus állapotokban is vizsgálta klinikai minták felhasználásával.
4. A vizsgált gyermekonkológiai és hematológiai szövetminták 73%-ban expresszáltak GHRH-t és a GHRH-R SV1 variánsát. Eredményeink azt mutatják, hogy a GHRH és a GHRH-R SV1 előfordulása a gyermekek hematológiai és onkológiai rendellenességeiben gyakori.
5. A radioreceptor vizsgálatra alkalmas gyermek hematoonkológiai szövetminták egy részében szintén kimutathatók voltak a nagy affinitású és specifikus GHRH kötőhelyek.
6. Eredményeink összességében arra utalnak, hogy az SV1 feltehetően egy hypoxia által kiváltott onkogén promoter, amely a GHRH-R antagonisták potenciális célpontja lehet.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Kiss Congor** professzor úrnak, hogy már orvostanhallgató, majd kezdő orvos korom óta figyelemmel kísérte pályámat és támogatta nemcsak a mindennapi gyermekgyógyászként végzett, hanem a tudományos munkámat is. Köszönettel tartozom neki, azért, hogy a felmerülő problémákat sajátjaként kezelte, mindig rendelkezésemre állt, hasznos tanácsaival, értékes javaslataival támogatott.

Köszönettel tartozok mindazon gyermekendokrinologus, endokrinológus és gyermekgyógyász elődeimnek, tanítómestereimnek, akik megismertették velem az endokrinológia és a gyógyítás szépségét.

Köszönöm minden eddigi munkahelyi vezetőmnek, hogy lehetővé tette számomra a munkavégzést az általuk vezetett debreceni Gyermekgyógyászati Klinikán.

Hálásan köszönöm **Dr. Szabó Zsuzsannának**, hogy a molekuláris biológiai módszerek rejtelseibe, a kísérleti labormunkába bevezetett, és tanított, továbbá mindazt a segítséget melyet a publikációk elkészítésében tőle is kaptam.

Köszönet illeti **Dr. Harda Kristófot** és **Király Józsefet** a molekuláris biológiai vizsgálatok elsajátításában és elvégzésében nyújtott sok segítségükért.

Köszönöm minden társszerző munkáját, külön megtiszteltetés számomra, hogy az általam nagyrabecsült **Professzor Andrew V. Schally** Nobel díjas kutatóval együttműködésben volt szerencsém dolgozni ezen tudományterületen, illetve a közlemények megírása kapcsán.

Köszönet illeti Barátaimat, akik e hosszú úton támogattak, hittek bennem, és mindvégig mellettem álltak.

Hálával tartozom családomnak támogatásukért, kitüntetően férjemnek soha véget nem érő türelméért és támogató szeretetéért, hogy bevezetett a tudományos kutatás világába, illetve hogy biztosítja a szerető, békés otthoni légkört számomra.

Köszönettel tartozunk pályázati támogatóinknak a munka anyagi támogatásáért:

- OTKA K143021 (K.C.)
- Leukémiás gyermekekért alapítvány (K.C.)
- “GINOP-2.3.2-15-2016-0004” (H.G.)
- TKP2021- EGA-20 (H.G.) Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program, Debreceni Egyetem Biotechnológiai tématerületi Programja
- A projektek az Európai Unió támogatásával, a Magyar Állam és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával való



Nyilvántartási szám: DEENK/477/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Juhász Éva
Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Juhász, É.**, Szabó, Z., Schally, A. V., Király, J., Fodor, P., Kónya, G., Dezső, B., Szabó, E., Halmos, G., Kiss, C.: Expression of Growth Hormone-Releasing Hormone and Its Receptor Splice Variants in a Cohort of Hungarian Pediatric Patients with Hematological and Oncological Disorders: a Pilot Study.
Int. J. Mol. Sci. 25 (16), 1-12, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25168831>
IF: 4.9 (2023)
2. Szabó, Z., **Juhász, É.**, Schally, A. V., Dezső, B., Huga, S., Hernádi, Z., Halmos, G., Kiss, C.: Expression of Growth Hormone-Releasing Hormone and Its Receptor Splice Variants in Primary Human Endometrial Carcinomas: novel Therapeutic Approaches.
Molecules. 27 (9), 1-13, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27092671>
IF: 4.6

További közlemények

3. Gomena, J., Modena, D., Cordella, P., Vári, B., Randelović, I., Borbély, A., Bottani, M., Vári-Mező, D., Halmos, G., **Juhász, É.**, Steinkühler, C., Tóvári, J., Mező, G.: In vitro and in vivo evaluation of Bombesin-MMAE conjugates for targeted tumour therapy.
Eur. J. Med. Chem. 277, 1-13, 2024.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116767>
IF: 6 (2023)
4. Szabó, I., Biri-Kovács, B., Vári, B., Randelović, I., Vári-Mező, D., **Juhász, É.**, Halmos, G., Bősze, S., Tóvári, J., Mező, G.: Targeting the Melanocortin 1 Receptor in Melanoma: biological Activity of alpha-MSH-Peptide Conjugates.
Int. J. Mol. Sci. 25 (2), 1-21, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25021095>
IF: 4.9 (2023)





5. Szegedi, K., Szabó, Z., Kállai, J., Király, J., Szabó, E., Bereczky, Z., **Juhász, É.**, Dezső, B., Szász, C., Zsebik, B., Flaskó, T., Halmos, G.: Potential Role of VHL, PTEN, and BAP1 Mutations in Renal Tumors.
J Clin Med. 12 (13), 1-18, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm12134538>
IF: 3
6. Király, J., Szabó, E., Fodor, P., Fejes, Z., Nagy, B. J., **Juhász, É.**, Vass, A., Choudhury, M., Kónya, G., Halmos, G., Szabó, Z.: Shikonin Causes an Apoptotic Effect on Human Kidney Cancer Cells through Ras/MAPK and PI3K/AKT Pathways.
Molecules. 28 (18), 1-22, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28186725>
IF: 4.2
7. Halmos, G., Szabó, Z., **Juhász, É.**, Schally, A. V.: Signaling mechanism of growth hormone-releasing hormone receptor.
In: *Hormone Receptors: Structures and Functions* / Gerald Litwack, Academic Press Inc Elsevier Science, San Diego, 1-26, 2023, (Vitamins and Hormones, ISSN 0083-6729 ; 123.)
8. Schuster, S., **Juhász, É.**, Halmos, G., Neundorf, I., Gennari, C., Mező, G.: Development and Biochemical Characterization of Self-Immolative Linker Containing GnRH-III-Drug Conjugates.
Int. J. Mol. Sci. 23 (9), 1-18, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23095071>
IF: 5.6
9. Harda, K. M., Szabó, Z., **Juhász, É.**, Dezső, B., Kiss, C., Schally, A. V., Halmos, G.: Expression of Somatostatin Receptor Subtypes (SSTR-1-SSTR-5) in Pediatric Hematological and Oncological Disorders.
Molecules. 25 (23), 1-14, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25235775>
IF: 4.411
10. Soltész, G., Kozári, A., Cvenitsné Árkus, Á., Stomfai, S., Erhardt, É., Rózsai, B., Bokor, S., **Magyar Gyermekdiabetes Epidemiológiai Munkacsoport**: A gyermekkori (0-14 év) 1-es típusú diabetes incidenciájának alakulása Magyarországon (2014-2018): 30 éves a Magyar Gyermekdiabetes Epidemiológiai Hálózat.
Diabetol. Hung. 27 (4), 221-226, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.24121/dh.2019.17>
11. Halmos, G., Dobos, N., **Juhász, É.**, Szabó, Z., Schally, A. V.: Hypothalamic Releasing Hormones.
In: *Hormonal signaling in biology and medicine : comprehensive modern endocrinology*. Ed.: by Gerald Litwack, Academic Press, London, 43-68, 2019.





12. Ilyés, I., Felszeghy, E. N., **Juhász, É.**: Az inzulinrezisztencia gyermek- és serdülőkorban I.
Gyermekgyógyászat. 65 (4), 265-268, 2014.
13. Ilyés, I., Felszeghy, E. N., **Juhász, É.**: Az inzulinrezisztencia gyermek- és serdülőkorban II.
Gyermekgyógyászat. 65 (5), 339-342, 2014.
14. Felszeghy, E. N., **Juhász, É.**, Káposzta, R., Ilyés, I.: A gyermek- és serdülőkori elhízás
következményei: a metabolikus szindróma és további következmények.
Gyermekgyógyászat. 63 (4), 157-162, 2012.
15. Ilyés, I., **Juhász, É.**: Gyermekkori endokrin hipertoniák.
Gyermekgy. Továbbk. Szle. 16 (5), 203-206, 2011.
16. **Juhász, É.**, Kondás, J., Ságodi, L., Fodor, B., Kiss-Tóth, E., Barkai, L.: Alacsony
cardiorespiratoricus teljesítőképesség metabolikus szindrómás serdülőkben.
Diabetol. Hung. 18 (4), 303-309, 2010.
17. Felszeghy, E. N., Káposzta, R., **Juhász, É.**, Kardos, L., Ilyés, I.: Alterations of carbohydrate and
lipoprotein metabolism in childhood obesity: impact insulin resistance and acanthosis
nigricans.
J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 22 (12), 1117-1126, 2009.
IF: 0.738
18. Felszeghy, E. N., **Juhász, É.**, Káposzta, R., Ilyés, I.: A glükoreguláció zavarai gyermekkori
elhízásban: összefüggés az inzulinrezisztenciával és a hyperinsulinaemiával.
Metabolizmus. 6 (4), 234-238, 2008.
19. Felszeghy, E. N., **Juhász, É.**, Káposzta, R., Ilyés, I.: Alterations of glucoregulation in childhood
obesity: association with insulin resistance and hyperinsulinemia.
J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 21 (9), 847-853, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/JPEM.2008.21.9.847>
IF: 0.938
20. **Juhász, É.**, Felszeghy, E. N., Ilyés, I.: A hashitoxicosisról gyermek- és serdülőkorban.
Gyermekgyógyászat. 57 (4), 489-492, 2006.
21. **Juhász, É.**, Majnik, J., Felszeghy, E. N., Ilyés, I., Rácz, K.: PROP-1 mutáció következtében
létrejött multiplex hypophysishormon-hiány.
Gyermekgyógyászat. 56 (5), 570-574, 2005.





22. **Juhász, É.**, Felszeghy, E. N., Ilyés, I.: A szénhidrát-anyagcsere vizsgálata serdülőkorú elhízott gyermekekben.

Diabetol. Hung. 12 (4), 281-286, 2004.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 39,287

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,5**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.09.13.

