

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Luteinizáló hormon-releasing hormon (LHRH) receptoron
alapuló új célzott daganatterápia lehetősége a humán
uvealis melanomában**

Dr. Oláh Gábor

Témavezető: Prof. Dr. Halmos Gábor



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

**Luteinizáló hormon-releasing hormon (LHRH) receptoron alapuló új célzott
daganatterápia lehetősége a humán uvealis melanomában**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Dr. Oláh Gábor gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Halmos Gábor

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Antal István, PhD
Dr. Szatmári István, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2019. március 21. 11 óra, a Debreceni Egyetem GYTK
Biofarmácia Tanszék könyvtára (elméleti tömb 7. emelet).

Az értekezés bírálói:

Dr. Zupkó István, az MTA doktora
Dr. Fodor Mariann, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Zupkó István, az MTA doktora
Dr. Fodor Mariann, PhD
Dr. Antal István, PhD
Dr. Szatmári István, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2019. március 21. 13 óra. Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme.

Tartalom

2. Bevezetés	3
3. Célkitűzés	6
4. Anyagok és módszerek.....	7
Szövetminták.....	7
Szövetminták RNS izolálása, reverz transzkripciója és reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciója (RT-PCR).....	7
Sejtvonalak RNS izolálása, reverz transzkripciója és reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciója (RT-PCR).....	8
Doxorubicin rezisztens OCM3 sejtvonal fejlesztése.....	10
Immunitokémia.....	11
Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos vizsgálatok	12
5. Eredmények	13
Az UM szövetminták 1-es típusú LHRH-R expressziója	13
mRNS vizsgálatok PCR módszerrel	13
Receptor fehérje vizsgálatok IHC segítségével	13
Ligand kötési vizsgálatok.....	13
Az LHRH ligand mRNS expressziója humán UM esetén	14
DOX rezisztens humán UM sejtvonal létrehozása.....	15
Az OCM3 és OCM3 _{DOX320} sejtvonalak LHRH-R expressziójának exonspecifikus vizsgálata	15
Sejt proliferációs vizsgálat	15
A DOX és AN-152 sejtszintű felvételének és eloszlásának vizsgálata OCM3 és OCM3 _{DOX320} esetén konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével	16
6. Megbeszélés.....	17
8. Köszönetnyilvánítás	24

2. Bevezetés

Az American Cancer Society becslése alapján 2016 januárjában, csak az Amerikai Egyesült Államokban (USA) 15,5 millió polgár élt, akit korábban valamilyen daganattal diagnosztizáltak. Óvatos becslések alapján 2026 januárjára ezt a számot 20 millióra teszik (1-4). Európa a világ népességének 9%-át teszi ki, viszont a világ daganatos betegeinek 25%-a európai. Így 2018-ra 3,91 millió új daganatos megbetegedést jósolnak Európában és 1,93 millió halálesetet a daganatok következtében. Külön említést érdemel, hogy a magyar lakosság számos rosszindulatú daganatok esetén európai összehasonlításban a statisztikák legrosszabb helyét foglalja el. Európában a leggyakoribb daganatos megbetegedések 2018-ban a női emlő karcinóma (523000 eset), ezt követi a kolorektális rák (500000 eset), a tüdő rák (470000) és a prosztata karcinóma (450000 eset). Azonban ez a lista, ha a daganatok által okozott haláleseteket nézzük, egészen más sorrendet mutat. A daganatok által okozott halálesetek 2018-as európai statisztikájának vezetője a tüdődaganat (388000 halálozás), ezt követi a colorectalis daganat (243000 halálozás), emlő daganat (138000 halálozás) és hasnyálmirigy daganat (128000 halálozás). Ezek az elborzasztó statisztikák jelentik a hajtóerőt a világszerte jelentős anyagi és szellemi potenciált megmozgató daganatkutatásokhoz. Ugyan a korai diagnózisnak és a hatékony terápiáknak köszönhetően a daganatos betegek túlélése folyamatosan nő, de ez a növekedés daganattípusokra vonatkoztatva koránt sem kiegyensúlyozott. Míg a leggyakoribb daganattípusok esetén (emlő, vastagbél, prosztata), mind terápiás, mind korai diagnosztika területén számos kutatás és gyógyszerfejlesztés zajlik, addig a ritka daganatok esetén meglehetősen kevés információ áll rendelkezésünkre a daganatok molekuláris hátterével kapcsolatban.

Leginkább ez a jelenség okolható azért, hogy az uvealis melanoma (UM) esetén a betegek várható túlélése az elmúlt évtizedekben gyakorlatilag semmit sem javult. Az UM az igen ritka daganatos megbetegedések közé tartozik, Európában mindössze hét új megbetegedés jut 1 millió főre. Azonban az UM a leggyakoribb nem bőr eredetű melanoma típus és a szem leggyakoribb primer intraokuláris daganatos megbetegedése felnőtt korban. Világszerte az új UM megbetegedések számát 7095 esetre becsülik évente. Mivel meglehetősen kevés ismeretanyag áll rendelkezésre az UM kialakulásának, áttétképzésének molekuláris hátteréről, így az új hatékony szisztémás kezelési lehetőségek is váratnak magukra. A primer daganat kezelése leggyakrabban a szem műtéti eltávolításából vagy helyi sugárkezelésből áll. Áttétes UM esetén hatékony kezelési módszer jelenleg nem ismert. A kezelő orvosok sok esetben

próbálkoznak az áttétes cutan melanoma esetén használt kemoterápiával, de ezek az UM és cutan melanoma közötti jelentős patofiziológiai különbségek miatt hatástalanok, sőt a kezelés következtében kialakuló mellékhatások meglehetősen előnytelenek a beteg számára. A nem megfelelően kiválasztott citotoxikus kezelés a kemorezisztencia gyors kialakulásához vezet. Ezért is égetően fontos olyan új hatékony gyógyszer-molekulák kifejlesztése, amelyek a különböző daganattípusok sajátosságait figyelembe véve képesek célzott módon gyorsan és hatékonyan gátat szabni a daganat növekedésének és terjedésének. Kísérletes munkánk során az UM lehetséges célzott terápiás lehetőségeit vizsgáltuk meg. A különböző peptid hormonok (pl.: GHRH, szomatosztatin, LHRH) és azok receptorainak célzott terápiás felhasználása több évtizede számos kutatás tárgyát képezi. A korábbi eredményeink alapján a daganatok eddig többnyire tisztázatlan okból expresszeálhatják az említett peptid hormonokat és azok receptorait. A receptor fehérje tumor sejten stabil és megfelelő szintű jelenléte lehetőséget adhat, olyan hormon analógok szintézisére, amelyekhez akár hasítható módon citotoxikus molekula kapcsolása is lehetségessé válik. Ezek a mesterséges hormon analógok alkalmasak lehetnek arra, hogy specifikusan a tumorban és annak receptor pozitív áttéteiben halmozódjanak, jelentős mértékben csökkentve a citotoxikum terápiás dózisát, csökkentve ezzel a rezisztencia és a mellékhatások kialakulásának esélyét, valamint a peptidkonjugátumként sok esetben pozitívan megváltoztatva annak szerkezetéből történő eliminációját is. Az értekezés tárgyát képező munka elvégzését megelőzően, a következő kérdések foglalkoztattak minket. Vajon ez a viszonylag ritka és agresszív daganattípus a cutan melanomához hasonlóan magas százalékban expresszálja-e az LHRH receptort és annak ligandját? Ha igen, van-e összefüggés a receptor/ligand expresszió és a tumor sajátosságai között? A rendelkezésünkre álló citotoxikus LHRH analógok tesztelésére *in vitro* UM modell alkalmazását terveztük. Másrészt komoly kérdés a gyakorló onkológusok részéről, hogy vajon egy új célzott citotoxikum alkalmazása során a daganatok vajon milyen gyorsan válnak rezisztenssé a kezelésre? Ezen kívül a hagyományos citotoxikum elleni rezisztencia vajon azonos-e az azt tartalmazó célzott párjával szembeni rezisztenciával? A munka elvégzését az is indokolta, hogy nemcsak az UM lehetséges célzott terápiás lehetőségét tudjuk eredményeinkkel támogatni, de egy jól működő modell beállítása daganattípustól függetlenül is számos új és általánosan is jól használható ismeretet nyújthat a peptid hormon alapú célzott terápiák fejlesztéséhez. Külön említést érdemel az a szerencsés körülmény, hogy az UM ritka előfordulása miatt a daganatos szövetminták begyűjtése korántsem egyszerű feladat, azonban a Debreceni Egyetem Klinikai Központja (DE KK) kiemelkedően alkalmas hely az UM vizsgálatára mivel, az országban a betegek túlnyomó többsége itt kerül ellátásra. A DE KK

Szemklinika és Tanszékünk példás együttműködésének köszönhetően néhány év alatt sikerült azt a releváns tumor szövet mintaszámot elérni, amivel megkezdhattuk az LHRH receptor státusz egyedülálló meghatározását.

3. Célkitűzés

Korábbi irodalmi adatok alapján az uveális melanoma (UM) luteinizáló hormon-felszabadító hormon receptor (LHRH-R) és luteinizáló hormon-felszabadító hormon (LHRH) expressziója és lehetséges célzott terápiás alkalmazási lehetőségei nem voltak ismertek. Így PhD értekezésem céljával a következő célokat tűztük ki:

- Az enukleáció során eltávolított humán primer UM daganatos szövetminták LHRH-R és LHRH expressziójának megállapítását mRNS és fehérje szinten.
- A betegek életkorának, nemének, daganat szövettani típusának, megelőző kezelésének esetleges összefüggését a LHRH-R és LHRH expressziójával.
- A műtéti szövetminták LHRH ligandkötési tulajdonságainak meghatározását.
- Olyan doxorubicin (DOX) rezisztens *in vitro* modell létrehozását, amely alkalmas a célzott terápiára fejlesztett citotoxikus LHRH analóg (AN-152) sejtszintű hatásainak vizsgálatára.
- A létrehozott DOX rezisztens sejtvonal LHRH-R exonspecifikus expressziójának vizsgálatát mRNS és fehérje szinten.
- A létrehozott DOX rezisztens és szenzitív humán UM sejtvonalakon az AN-152 felvételének nyomon követését 24 órán keresztül.
- A létrehozott DOX rezisztens és szenzitív humán UM sejtvonalakon az AN-152 sejtproliferációra gyakorolt hatásának vizsgálatát különböző kezelési koncentrációk mellett.

4. Anyagok és módszerek

Szövetminták

A humán UM szövetminták a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Szemklinikájáról származtak. A 39 szövetminta a műtét időpontjában 30-84 év közötti betegektől származott. A kontrollként használt egészséges agyalapi mirigy elülső lebeny mintákat a Debreceni Egyetem Pathológia Intézetében gyűjtöttük. A sebészi eltávolítást követően a szövetminta egy részét használtuk fel, amit azonnal folyékony nitrogénben szállítottunk az intézetünkbe ahol -70°C -on tároltuk a további felhasználásig. Az összes szövetminta esetén a diagnózis hisztopatológiai vizsgálatokkal is meg lett erősítve. A mintagyűjtést megelőzően a Debreceni Egyetem etikai bizottsága engedélyezte a mintagyűjtést és azok felhasználását a vizsgálatainkhoz. A betegek minden esetben megfelelő tájékoztatást kaptak és beleegyeztek a mintagyűjtésbe és azok vizsgálatába.

Szövetminták RNS izolálása, reverz transzkripciója és reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciója (RT-PCR)

A teljes RNS mennyiség a felhasználási utasítások szerint az AllPrep DNA/RNA/protein Mini kit (Qiagen, Germany) segítségével került izolálásra. Minden mintából 250 ng RNS került átírásra a QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Germany) segítségével 20 μl végtérfogatban. Két saját tervezésű primer párt használtunk a vizsgálat ezen részében I-es típusú LHRH-R detektálására (szensz: 5'-GGTGGCATCAAGCATTTAT-3', antiszensz: 5'-ACATAGTAGGGAGTCCAGCAGACA-3'), és az LHRH ligand meghatározására (szensz: 5'-GGCCTTATTCTACTGACTTGG-3', antiszensz: 5'-TCTTCTGCCAGTTTCCTCT-3'). A RNS integritásának ellenőrzésére a β aktin háztartási gén expressziója került felhasználásra (szensz: 5'-GGCATCCTCACCTGAAGTA-3', antiszensz 5'-GGGGTGTGTAAGGTCTCAA-3'). Minden egyes PCR reakció során 1 μl cDNS került amplifikálásra 25 μl -es végtérfogatban ami 1,5 mM MgCl_2 -ot tartalmazott, 1x PCR puffert (Fermentas GmbH, Germany) 0,3 nM minden egyes dezoxinukleotidból (Promega, USA), és 1 egység TrueStart HotStart DNS polymerázt (Fermentas, USA) és 0,25 μM -t minden primerből. A PCR ciklus során 3 perc 95°C -on történő denaturálást követően 40 cikluson keresztül a következő lépések zajlottak: 95°C 45 másodperc, 59°C 30 másodperc, 72°C 1,5 perc, majd a ciklusokat követően 72°C 10 perc inkubálással fejeztük be a reakciót. Minden mintából 10 μl cDNS került

felhasználásra a 1,5%-os agaróz gélelektroforézishez, amit GelRed (Biotium, USA) DNS festékekkel tettünk láthatóvá UV fényben az AlphaDigidoc gél dokumentációs rendszer (Alpha Innotech, USA) segítségével.

Sejtvonalak RNS izolálása, reverz transzkripciója és reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciója (RT-PCR)

A teljes RNS TRI Reagenssel (Molecular Reserch Center, USA) került izolálásra. 30 mg humán hypophysis (ami pozitív kontrollként került felhasználásra) vagy 10^7 OCM3 és OCM3_{DOX320} került inkubálásra 500 µl TRI Reagenssel 5 percen keresztül szobahőmérsékleten, ezután 100 µl kloroformmal kevertük össze alaposan. Ezt követően 12000 g-n 15 percig választottuk el a nem elegyedő fázisokat egymástól 4°C-on. A felső fázist új steril gyűjtőcsőbe tettük és 250 µl izopropil alkohollal 15 percig inkubáltuk és 12000 g-n 10 percig centrifugáltuk 4 °C-on míg RNS pelletet kaptunk. A pelletet kétszer mostuk 500 µl 75%-os alkohollal, majd teljes száradását követően 40 µl RNáz mentes vízben oldottuk fel.

Minden mintából 500 ng RNS került átírásra Tetro cDNS Synthesis kit (Bioline, USA) segítségével 20 µl végtérfogóban. A következő primerpárokat használtuk az LHRH-R exonspecifikus PCR meghatározásához: LHRH-R-1: szensz 5'-GCT TGA AGC TCT GTC CTG GG-3'; antiszensz, 5'-CAG GCT GAT CAC CAC CAT CAT-3'; LHRH-R-2: szensz 5'-AGT CCA ATG GTA TGC TGG AGA-3'; antiszensz 5'-ACC CGT GTC AGG GTG AAG AT-3'; és LHRH-R-3: szensz 5'-TCA TGC TGA TCT GCA ATG CAA-3'; antiszensz 5'-AAT TGA GGC TCT GAA GAC TGA GT-3'. A PCR reakció során 1 µl cDNS került átírásra 25 µl végtérfogóban, ami 12,5 µl MyTaq HS Mix (Bioline, USA), 9 µl vizet és 0,25µM primert tartalmazott. A PCR reakció során 1 perc 95 °C-os denaturálást követően 40 cikluson keresztül 95 °C 15 perc, 60 °C 30 másodperc és 72 °C 10 másodperc periódusok ismétlődtek, ezt követően 2 perc 72 °C-os inkubálással állítottuk le a reakciót. Az PCR termék meghatározása a korábbival azonos módon történt.

Membránpreparátum és radioligand kötési vizsgálat

A kiolvasztott minták megtisztítása után 50 mM Tris-HCl pufferben (pH 7,4) homogenizáljuk, proteáz inhibitorok (0,25 mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid, 0,4% Aprotinin és 2 µg/ml pepstatin A) jelenlétében jégen. A homogenizátum 500 G-n 10 percig

4 °C-on homogenizáltuk és ezt követően reszuszpendáltuk friss pufferben. A végső pelletet reszuszpendáltuk homogenizáló pufferben és -80 °C-on tároltuk a vizsgálatig. A preparátum fehérje koncentrációját Bradford vizsgálat segítségével határoztuk meg Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, USA) segítségével. A radio jóddal jelzett [D-Trp⁶]LHRH chloramie-T módszer segítségével készült és a tisztítását fordított fázisú HPLC segítségével végeztük. Ligand kompetíciós assay alapja a [¹²⁵I][D-Trp⁶]LHRH radioligand specifikus kötődése a membrán frakcióhoz. 50-160 µg fehérje tartalmú membrán homogenizátumok duplikátumokban vagy triplikátumokban kerültek inkubálásra 60-80000 cpm [¹²⁵I][D-Trp⁶]LHRH és növekvő koncentrációjú (10⁻¹²-10⁻⁶ M) nem radioaktív peptiddel, mint kompetítorral 150 µl össztérfogatú kötési pufferben. Az inkubáció végén, szilanizált polipropilén mikrocentrifugacsőben (Sigma-Aldrich GmbH, Germany) 125 µl preparátumot transzferáltunk 1 ml jéghideg kötési puffer tetejére, ami 1,5% marha szérum albumint tartalmazott (BSA). A csöveket ezt követően 12000 g-n 3 percig 4 °C-on centrifugáltuk, ezt követően a felülúszót eltávolítottuk és a kialakult pellet aktivitása került mérésre gamma számláló segítségével (Micromedic System, USA). 20-250 µg/cső fehérje koncentráció tartományt határoztunk meg előzetesen kísérletes úton, ami a lehető legkisebb mennyiség, ami még specifikus kötéshez minimálisan szükséges. Munkánk során 40-180 µg membránfehérje koncentráció volt szükséges a 150 µl inkubációs térfogatban a megfelelő eredmény eléréséhez. A LIGAND-PC számítógépes görbe illesztési program segítségével határoztuk meg a receptor kötés típusát, a disszociációs konstans (K_d) és a maximális kötési kapacitás (B_{max}) értékeit Scatchard szerint ábrázolva. A radioligand kötési vizsgálatok témavezetőm Prof. Dr. Halmos Gábor segítségével készültek.

Immunhisztokémia (IHC)

Formalinban fixált paraffinba ágyazott enukleációból származó szövetminták kerültek immunfestésre. Az antigén feltárást (pH 6,0) és endogén peroxidáz blokkolást követően a 3 µm vastagságú metszetek kerültek inkubálásra az elsődleges LHRH-R antitesttel (NCL-GnRHR A9E4; Novocastra Laboratories Ltd., UK) szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. Háromszori 5 perces foszfát puffer (PBS, pH 7,4) mosást követően a metszetek a másodlagos antitesttel (anti-mouse IgG (Fab-2 kapcsolt tormaperoxidáz (HRP)) kerültek inkubálásra a gyártó utasításai szerint EnVision+ HRP detection kit-el, amiben az aminoethyl-carbasol (AEC; red; Vector Labs, UK) szolgált a peroxidáz szubsztrátjaként. A piros kromogén szubsztrát megfelelően kontrasztos képet adott a melaninban gazdag minták

barna háttere és a pozitív IHC elkülönítéséhez. Az immunhisztokémia eredmények Prof. Dr. Dezső Balázs segítségével készültek.

Statisztikai elemzés

A változók standard statisztikai elemzéssel kerültek leírásra. A feltétlen változók közötti összefüggések Fisher's teszt segítségével, míg a folyamatos változók és a bináris eredmények között a logisztikus regressziót amit hibahatásban (OR) és 95% fiducia intervallumban (CI) fejeztünk ki.

Sejtvonalak és sejttenyésztés

Az OCM3 humán UM sejtvonalat a Debreceni Egyetem Biofizika Intézete biztosította számunkra. A monolayerben növekvő OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtek RPMI-1640 sejttenyésztő tápfolyadékban nőttek (Biosera, USA) 10v/v% hőinaktivált fetal bovine serum (Biosera, USA) és 100 U/ml és 100 µg/ml penicillin-sztreptomycin (Biological Industries, Izrael) jelenlétében. A sejtek 25, 75 vagy 150 cm²-es letapadó, szűrős kupakkal ellátott flaskában nőttek (SPL, Korea). A sejteket standard körülmények között tartottuk 95 % páratartalom, 5 % CO₂ mellett 37 °C-on.

Doxorubicin rezisztens OCM3 sejtvonal fejlesztése

A rezisztencia kialakításához doxorubicin 2 mg/ml-es injekció (TEVA, Izrael) került felhasználásra. Az OCM3 sejteket egyre növekvő koncentrációjú DOX jelenlétében tettük rezisztenssé. Kezdetben 10 nM DOX jelenlétében vártuk meg, míg a sejtek 90% konfluenciát érnek el, ha ez megtörtént, akkor dupláztuk a dózist egészen addig, míg 320 nM-os DOX koncentráció mellett is stabilan nőttek a sejtek. A rezisztenssé vált sejtvonalat OCM3_{DOX320}-nak neveztük el. Minden kísérlet előtt a sejteket legalább 2 napig tartottuk DOX mentes médiumban.

Immuncitokémia

Az OCM3 és OCM3_{DOX320} sejteket fedőlemezen növesztettük 12 well plate-en (SPL, Korea). A sejtek konfluens növekedését követően PBS mosást követően 4% paraformaldehiddel fixáltuk 30 percig 4 °C-on. Három PBS mosást követően a sejteket 0,1% Triton-X-100-PBS oldattal permeabilizáltuk 10 percig, három mosást követően 10% BSA oldattal 1 órán keresztül blokkoltuk az aspecifikus kötőhelyeket. Egy éjszakán keresztül inkubáltuk a mintákat 4 °C-on anti-LHRH-R (GnRHR FL-328, Santa Cruz, USA) elsődleges antitesttel. Ezt követően 1 órán keresztül FITC (fluorescein isothiocyanát) jelzett goat anti-rabbit (sc-2012, Santa Cruz, USA) másodlagos antitesttel inkubáltuk. Autofluoreszcencia kontrollként azonos procedúrával kerültek a minták kezelésre, de semmilyen antitesttel nem lettek kezelve, míg a negatív kontroll esetén csak az elsődleges antitest maradt ki a jelölésből mutatva a másodlagos antitest esetleges aspecifikus kötődésének mértékét. Háromszori PBS mosást követően ProLong® Diamond AntifadeMountant with DAPI (Molecular probes, USA) segítségével fedtük a mintákat. A fluoreszcens képeket Olympus IX71 kamera segítségével készítettük (Olympus Corporation; Tokyo, Japan).

Sejt életképességi vizsgálatok és statisztikai elemzés

A DOX és AN-152 OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtek életképességre gyakorolt hatását Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich, USA) segítségével vizsgáltuk standard MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) protokoll szerint. A wellenként 10^4 sejtet tenyésztettünk 96 well plate-en (SPL, Korea) a kihelyezést követően 24 órával 40 nM, 320 nM, 1 μ M, 2,5 μ M és 5 μ M DOX és AN-152 100 μ l ösztérfogatban a megfelelő kezelések szerint. Ezt követően 72 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk a sejteket. A kísérleteket hat párhuzamos méréssel végeztük és ezeket négy alkalommal ismételtük. A kezelést követően eltávolítottuk a tápfolyadékot a sejtekről és háromszori PBS mosást követően 100 μ l 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT jelenlétében 37 °C-on 2 órán keresztül inkubáltuk a sejteket. Ezt követően az MTT oldatot 100 μ l szolubilizáló oldattal helyettesítettük (izopropil alkohol-HCl), egy órás szobahőn történő fénytől védett inkubálás után az oldat optikai tulajdonságait 570 nm-en FLUOstart optima plate reader (BGM Labtech, Németország) segítségével regisztráltuk. A kezeléshez használt AN-152 vegyületet Andrew V. Schally laboratóriuma szintetizálta és bocsátotta

rendelkezésünkre kísérleteinkhez. Az eredményeket statisztikailag a GraphPad Prism 7. segítségével elemeztük 1-way ANOVA után Tukey's teszttel hasonlítottuk össze a csoportokat.

Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos vizsgálatok

10^4 OCM3 és OCM3_{DOX320} került kiültetésre 1 μ -Slide 8 well ibiTreat mikroszkóp kamrában (Ibidi, Németország). Huszonnégy órával később a sejteket 5 μ M DOX vagy AN-152 kezelésben részesültek 0,5, 1, 6 és 24 óra időintervallumban. A mikroszkópos vizsgálatokat megelőzően a sejteket háromszor mostuk PBS segítségével. A konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálatok Olympus FluoView 1000 mikroszkóppal (Olympus, Japán) végeztük. A DOX és az AN-152 autofluoreszcenciáját 543 nm hullámhosszúságon mértük argon ion lézer gerjesztése segítségével. A DOX fluoreszcens emisszióját 603 nm-es hullámhosszúságon detektáltuk. A felvételeket szekvenciális módban készítettük megelőzve a csatornák közötti zavarást, a képek 1 μ m vastagságú optikai szeletnek felelnek meg 512x512 pixel felbontással 60x UPLSAPO olaj immerziós objektív (NA 1,35) segítségével.

5. Eredmények

Az UM szövetminták 1-es típusú LHRH-R expressziója

mRNS vizsgálatok PCR módszerrel

Az UM szövetminták közül 11 epitheloid, 21 orsósejtes és 7 kevert sejttípusba tartozott. A tumorok vastagsága 6-12,9 mm, míg bazális átmérője 9-19 mm között változott az ultrahangos meghatározás alapján. Ha a tumor vastagsága meghaladta a 8 mm-t és/vagy a legnagyobb átmérője 13 mm-nél több volt, akkor a szem enukleációra került mindenféle előzetes kezelés nélkül. A szemet akkor is enukleálták, amikor ugyan a tumor az előző kritériumoknál kisebbnek bizonyult, de annak ellenére is határozottan növekedett, hogy korábban transzpupilláris hőterápia és/vagy ¹⁰⁶Ruténium plakk brachyterápia került alkalmazásra. A szövetminták vizsgálata során olyan primert terveztünk, amely az LHRH-R splice variánsok közül specifikusan csak a teljes hosszúságú receptor mRNS sokszorosítására alkalmas, viszont a csonka receptorok esetén nem ad jelet. Az általunk tervezett LHRH-R primerpár a 2-es és 3-as exonon átívelő módon képes átírni a PCR terméket, így ezáltal éppen az ismert, nem teljes hosszúságú receptor variánsok hiányzó szakaszai kerülnek átírásra. Az 1-es típusú LHRH-R-ről átíró PCR termék várt hossza 241 bp volt. Az általunk vizsgált szövetminták 46%-a bizonyult LHRH-R pozitívnak. Az epitheloid szövettani típusba tartozó UM minták esetén 11 mintából 6 esetben (55%) volt a receptor pozitív, míg az orsósejtes melanoma 21 mintából 10 esetben (48%) bizonyult LHRH-R pozitívnak. A kevert szövettani típusba tartozó minták (amelyek mind a két sejttípust tartalmazta közel azonos arányban) 7 mintából 2 minta (29%) fejezte ki az LHRH-R-t.

Receptor fehérje vizsgálatok IHC segítségével

A teljes hosszúságú LHRH-R jelenléte immunhisztokémia segítségével is meg lett erősítve, ezek az eredmények jól egybevágtak a RT-PCR eredményekkel. Az RT-PCR által pozitívnak talált UM minták többsége az immunhisztokémiai vizsgálatok során szintén pozitivitást mutatott az LHRH-R-ra, ami piros granulumok formájában jelent meg a metszeteken.

Ligand kötési vizsgálatok

A specifikus LHRH kötőhelyek jelenlétét és azok [¹²⁵I][D-Trp⁶]LHRH kötésének jellemzőjét ligand kompetíciós vizsgálat segítségével vizsgáltuk a humán UM szövetmintákon. A vizsgált

10 szövetmintából 7 mutatott LHRH kötő képességet. A leszorítási vizsgálat alkalmazásával a radiojelzett [D-Trp⁶]LHRH, a jelzetlen analóggal történő leszorítása során az eredmények azt mutatták, hogy jó illesztéssel egy úgynevezett egy kötőhelyes modell áll fenn, ami a nagy affinitású LHRH-R-ok jelenlétét jelzi a nyers humán UM szövetmintákból származó membránpreparátumokban. A számítógépes nemlineáris görbeillesztés és a Scatchard plot analízis kötési adatai a 7 pozitív tumor minta esetén azt jelezték, hogy az egyedi kötőhelyek disszociációs konstansának középértéke (K_d) 3,69 nM (1,35-től 6,36 nM-os tartományban), míg a maximális kötési kapacitás (B_{max}) középértéke 384.5 fmol/mg membrán fehérje (251,5-től 511,6 fmol/mg fehérje tartományban). A receptor ligand kötés biokémiai paramétereinek meghatározása alapvető a specifikus ligandkötés azonosítására. Ezek alapján a [¹²⁵I][D-Trp⁶]LHRH kötése reverzibilis, időfüggő és hőmérséklet függő volt, valamint lineárisan változott a humán UM minták fehérje koncentrációjával. Az LHRH receptoriális kötés specificitását a kompetitív ligand kötés kísérletek igazolták, több hasonló és eltérő struktúrájú peptid felhasználásával.

A vizsgált mintákon az eredmények alapján az LHRH-R mRNS expressziója és a ligand kötés vizsgálat pozitivitása teljes mértékben egybevágtott. Három a tíz mintából nem mutatta az 1-es típusú LHRH-R mRNS expresszióját és a ligand kötetést sem, míg a receptor mRNS expresszióra pozitív minták specifikusan képesek voltak a jelzett ligand kötésére. A receptor expresszió, ligandkötés és a klinikopatológiai adatok között nem találtunk szignifikáns korrelációt.

Az LHRH ligand mRNS expressziója humán UM esetén

A LHRH-R expresszió túl vizsgáltuk a LHRH ligand kifejeződését a mintáinkban. A UM minták többsége 39 mintából 27 esetben (69%) mutatott LHRH ligand pozitivitást. A PCR termék várt hossza 245 bp volt, ezt az epitheloid minták esetén 11 mintából 8 esetben (73%), az orsósejtes minták esetén 21 mintából 15 esetben (71%), a kevert sejtes minták esetén a 7 mintából 4 esetben (57%) fejeződött ki. Tizenkét olyan tumor volt (31%), ahol a receptor és a ligand is kifejeződött, 6 esetben csak az LRHR-R, míg 15 esetben csak az LHRH ligand került expresszióra. A statisztikai elemzés eredményeként kimutatható volt az összefüggés a beteg kora és az LHRH-R mRNS és ligand együttes expressziója között ($p=0,0407$): 10 év életkor növekedés 87%-os esélynövekedést jelentett az együttes expresszióra (OR=1,867, 95% CI 1,027-től 3,393-ig). Másrészt nem volt összefüggés a LHRH ligand és LHRH-R mRNS expresszió a tumor típus és a klinikai paraméterek között. Az UM betegek klinikopatológiai

tulajdonságai és a mRNS szintű eredmények az értekezés 1. táblázatában kerülnek összefoglalásra.

DOX rezisztens humán UM sejtvonal létrehozása

Az OCM3 humán UM sejtvonal DOX rezisztens verziójának fejlesztése során lépésenként emeltük a DOX koncentrációját a tápfolyadékban mindaddig, amíg elértük a 320 nM melletti stabil sejtproliferációt. A kialakított DOX rezisztens OCM3_{DOX320} sejtek, hasonló morfológiát és osztódó képességet mutattak, mint a vad típusú sejtek. Az OCM3_{DOX320} sejtek zavartalanul képesek voltak osztódni 320 nM DOX jelenlétében és ezt a képességüket számos fagyasztás után is megőrizték.

Az OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtvonalak LHRH-R expressziójának exonspecifikus vizsgálata

Az LHRH-R expressziójának vizsgálata céljából olyan primerek kerültek felhasználásra, amelyek alkalmasak voltak az LHRH-R egyes exonjainak különálló vizsgálatára és azok teljes hosszában történő átírására. A várt PCR termék hossza az LHRH-R I-es exonja esetén 436 bp, az LHRH-R II-es exonja esetén 411 bp, az LHRH-R III-as exonja esetén 473 bp volt. Így az RT-PCR során lehetőségünk adódott a teljes hosszúságú és az alternatívan expresszáldó receptor mRNS-ek elkülönítésére.

Az eredményeink alapján mind a két sejtvonal főként az LHRH-R I-es exonját expresszálta, viszont a II-es és III exon csak nagyon alacsony intenzitással került expresszióra az OCM3_{DOX320} sejtvonal esetén. A csonka mRNS fehérje szintű jelenlétét immuncitokémiai vizsgálattal ellenőriztük mindkét sejtvonalon. Az LHRH-R izoforma fehérje szintű expressziójának jelenléte az OCM3 és OCM3_{DOX320} esetén is sikerült igazolni. Az LHRH-R fehérje izoforma elsősorban a citoplazmában és a sejtmembránon volt megfigyelhető.

Sejt proliferációs vizsgálat

Az OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtek életképességét 72 órás kezelést követően MTT assay segítségével követtük nyomon, különböző koncentrációjú (40 nM, 320 nM, 1 μ M, 2,5 μ M, és 5 μ M) DOX és AN-152 kezelés mellett. Az OCM3_{DOX320} sejteken még 1 μ M DOX jelenlétében sem tapasztaltunk szignifikáns sejt pusztulást a kezeletlen kontrolhoz viszonyítva. Mivel az OCM3 sejtek szignifikáns mértékben pusztultak 1 μ M DOX kezelés hatására, így az MTT vizsgálat eredménye is megerősítette az OCM3_{DOX320} sejtek DOX rezisztenciáját. Az AN-152

alacsonyabb koncentrációk mellett (40 nM, 320 nM) a sejtproliferációt szignifikáns mértékben volt képes növelni, összehasonlítva az ekvimoláris dózisu DOX kezeléssel, aminek nem volt hatása a sejtek életképességére. Ugyanakkor a magasabb koncentrációjú AN-152 kezelés hatékonyan képes gátolni a sejtosztódást mindkét sejtvonal esetén. A nagyobb koncentrációjú DOX és AN-152 kezelés esetén (1-5 μ M) az OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtvonalak között nem mutatkozott szignifikáns különbség.

A DOX és AN-152 sejtszintű felvételének és eloszlásának vizsgálata OCM3 és OCM3_{DOX320} esetén konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével

A DOX expozíció hatására az OCM3 humán UM sejtvonal esetén a DOX-hez köthető fluoreszcencia homogén eloszlását tapasztalhattuk elsősorban a sejtmagban, minden egyes vizsgált időszegmensben. Ezzel összehasonlítva az AN-152-vel kezelt sejtek magasabb jelintenzitást mutattak a citoplazmában, valamint a mag és sejtmembránon, igazolva ezzel a membrán mediált felvételét. Ezzel szemben az OCM3_{DOX320} sejtvonal esetén a fluoreszcens jel csak lassan kumulálódott a sejtmagban 0,5-1 óra időintervallumban. A fluoreszcens szignál 6 és 24 órás időperiódusban azonban leginkább a citoplazmában helyezkedett el és csak jelentősen kisebb intenzitással a sejtmagban. Összehasonlítva az OCM3_{DOX320} sejtek esetén az AN-152 esetén egyik időpillanatban sem volt tapasztalható jel halmozódás a sejtmagban. Ugyanakkor erősebb fluoreszcens szignál volt tapasztalható a citoplazmában és citoplazmatikus granulumokban, mutatva az AN-152 membránhoz kötődő felvételét 0,5 és 1 órás kezelés esetén. Az eredményeink alapján mind a DOX érzékeny és DOX rezisztens sejtek sikeresen képesek halmozni az AN-152-t, de a DOX rezisztens OCM3_{DOX320} sejtek esetén a DOX jel a 24 órás kezelést követően jelentősen csökken a sejtmagban.

6. Megbeszélés

A lehangoló statisztikai adatok alapján az UM betegek 45%-a vesztí életét a metasztázisok következtében, annak ellenére, hogy sokszor még azelőtt kerül felismerésre és kezelésre a primer betegség, hogy bármilyen klinikai jele lenne a daganatos sejtek disszeminációjának. Ez arra enged következtetni, hogy a betegség igen korai fázisában jelen vannak olyan mikrometasztázisok amelyek már rejtve, évekkal a klinikailag leírható makrometasztázisok előtt jelen vannak a szervezetben. A kicsi és közepes méretű UM-ák esetén, jelenleg a leginkább hatásosnak talált kezelési módszer a különböző radioterápiák alkalmazása, annak ellenére, hogy jelenleg nem tisztázott ezek a kezeléseket milyen hatással vannak a betegek túlélésére. Az UM szisztémás kezelésének lehetősége jelenleg nem megoldott. Szisztémás adjuváns terápiát leginkább azokban az esetekben alkalmaznak, amikor nagy esély mutatkozik a metasztázis kialakulására vagy esetleg már ki is alakult, azonban a terápiás válasz-készség nagyon alacsony a klasszikus kemoterápiára. Annak ellenére, hogy a primer UM diagnosztikájában és terápiájában volt fejlődés az elmúlt évtizedekben, mégis a metasztázisok okozta halálozás tekintetében nem történt számottevő előrelépés. Ezért is kiemelkedően fontos új terápiás lehetőségek felderítése. Az LHRH receptor, mint lehetséges új molekuláris target jelenlétét, már számos ráktípus esetében leírták és érdekes módon nem csak a reprodukív szervekhez köthető daganatokban és sejtvonalakban. Az is igazoltnak tűnik, hogy a daganatos sejteken kifejeződésre kerülő LHRH-R eltérő szignalizációs utakon fejti ki hatását, mint a hypophysisben található receptorok esetén. Ezek alapján a tumorokban található LHRH-R leginkább a mitogén szignállal, a növekedési faktor receptorokon és az ahhoz kapcsolódó onkogéneken keresztül fejti ki hatását, a tirozin kinázok aktivitásán keresztül. Az elmúlt években igazolták a cutan melanoma LHRH-R expresszióját is, valamint azt, hogy a bőr melanoma sejtek citotoxikus LHRH analóggal történő kezelése során szignifikáns sejtproliferáció gátlás érhető el. Az UM és a bőr melanoma embriológiai szempontból azonos eredetű, így érthető, hogy néhány genetikai tulajdonságukban hasonlóak egymáshoz, ezért is vizsgáltuk az UM esetén is az LHRH-R expresszióját. A célzott daganatterápia egy igen modern terápiás megközelítés, mivel az ezzel a szemlélettel készült gyógyszer-molekulák nagy specificitással képesek a daganatos sejtekbe juttatni a kiválasztott citosztatikus molekulát, így a nagyobb hatékonyság mellett kisebb toxikus hatással számolhatunk. Ismert a daganatok, intrinzik vagy szerzett rezisztenciája is az alkalmazott daganatterápiával szemben, ami hatalmas kihívások elé állítja a gyakorló szakembereket. Azonban számos esetben a molekulárisan

célzott terápia alkalmazása esetén a nagyobb szelektivitás következtében képesek lehetünk a rezisztencia kialakulása előtt elpusztítani a daganatos sejteket. Az áttétes UM terápiájában a DOX rezisztencia nem jellemző a betegek igen rövid túlélése miatt, ugyanakkor a DOX alkalmazása más szerekkel kombinációban leginkább csak próbálkozás, mintsem evidenciákon alapuló hatékony terápia. Viszont a korábban alkalmazott citotoxikus terápia jelentős mértékben képes lehet befolyásolni a későbbi célzott citotoxikus terápiákat is a rezisztencia esetleges indukálása révén. Vizsgálataink során elsőként ezért is tűztük ki célul a humán UM szövetminták LHRH-R és LHRH ligand expressziójának vizsgálatát RT-PCR, radioligand kompetíciós vizsgálat és immunhisztokémia segítségével. Miután meghatároztuk az UM szövetminták LHRH-R expressziójának alapvető sajátosságait, egy olyan kísérletes modell felállításán dolgoztunk, amely *in vitro* körülmények között segít tanulmányozni UM immortalizált sejtvonalakon a DOX érzékeny illetve DOX rezisztens sejtek esetén a DOX és az AN-152 kezelés hatására bekövetkező sejtproliferáció változást. Mivel DOX rezisztens UM sejtvonal nem áll rendelkezésre, így saját fejlesztést követően állítottunk elő és teszteltünk „vad” és DOX rezisztens sejtvonalat. Ezen sejtvonalak LHRH-R expresszióját exon specifikus primerekkel mRNS szinten, ezt követően pedig immuncitokémia segítségével fehérje szinten is bizonyítottuk. A kísérleti modell sejtvonalakon a DOX és AN-152 felvételét és eloszlását konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal követtük nyomon. Az UM szövetminták vizsgálata során olyan primerpár használata mellett döntöttünk, amely az ismert LHRH-R variánsok közül csak a teljes hosszúságú receptor esetén ad jelet. Ezen döntésünket az indokolta, hogy szövetminták esetén csak a teljes hosszúságú LHRH-R mRNS esetén lehettünk biztosak a funkcióképes receptor jelenlétében, ugyan a legtöbb publikációban csupán LHRH-R I-es exonjára specifikus primerek kerültek felhasználásra. Az immunhisztokémia során használt monoklonális elsődleges antitest pedig az 1-29 aminosavig képes felismerni az LHRH-R-t. A vizsgálataink alapján az UM szövetminták 47%-a expresszálta a teljes hosszúságú LHRH-R-t. A ligand kompetíciós vizsgálatok során 10 darab humán UM szövetmintából készítettünk membránpreparátumot és vizsgáltuk a [¹²⁵I][D-Trp⁶]LHRH kötési sajátosságait. Az UM minták 70%-a mutatott specifikus kötést a jelzett ligand iránt, a K_d középértéke 3,69 nM míg a B_{max}-é 384,5 fmol/mg membrán fehérje volt. Fontos megemlíteni, hogy az összes ligand kötési vizsgálattal pozitív minta esetén a receptor kifejeződését gén szinten is sikerült minden esetben igazolni. A receptor fehérje jelenlétét szintén sikerült a vizsgált mintákon immunhisztokémia segítségével is megerősíteni. Ahhoz, hogy jobban megismerjük az LHRH-R és splice variánsainak szerepét az UM célzott terápiájában, DOX érzékeny és rezisztens sejteken vizsgáltuk a DOX és az AN-152 felvételét. Korábban az LHRH-R splice variánsok szerepét

nem vizsgálták UM esetén. Ezért munkánk során az OCM3 és az általunk fejlesztett OCM3_{DOX320} humán UM sejtvonalon mRNS szinten igazoltuk receptor splice variánsok jelenlétét. Az ezekről átíródó izoform fehérjék jelenlétét immuncitokémia segítségével került leírásra. Az AN-152 hatásának alaposabb megértése érdekében az OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtvonalakon vizsgáltuk a DOX és AN-152 sejtproliferációra gyakorolt hatását és azok sejten belüli eloszlását. A DOX és AN-152 hatására az MTT vizsgálat alapján a mikromólos koncentrációtartományban szignifikánsan csökkent az OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtvonalak életképessége. A DOX rezisztens UM sejtvonal esetén a DOX és az AN-152 hasonlóan befolyásolta a sejtosztódást. Ugyanakkor az *in vivo* eredmények esetén jelentős különbségek is várhatóak (131). A jelenlegi vizsgálat alapján 40 nM-os koncentrációban az AN-152 növelte a sejtproliferációt összehasonlítva az ekvimoláris DOX kezeléssel. A OCM3_{DOX320} sejtvonal által szerzett rezisztencia a DOX és az AN-152 hatékonyságát is képes volt csökkenteni. Az alacsony kezelési koncentrációk mellett valószínűleg az AN-152 hormonális tulajdonsága kerül előtérbe, amivel fokozni volt képes a sejtek osztódó képességét. Ugyanakkor azonos koncentrációban a DOX-nek nem mutatkozott citotoxikus hatása. Ez a jelenség leginkább az LHRH-R izoform fehérjén keresztüli sejtosztódást fokozó szignalizációval magyarázható. Az AN-152 erős receptor kötési tulajdonságai révén lehetséges a nanomoláris koncentrációk esetén is a receptoron keresztüli szignalizáció aktiválása, ugyanakkor ebben a koncentrációban a DOX hatástalan, mint citotoxikus szer. Ez a jelenség jól mutatja a szuperaktív citotoxikus LHRH analógok jelentőségét, mint amilyen az AN-207, amelyeknek már nanomólos koncentrációban is jelentős citotoxikus hatásuk van. Az AN-207 szerkezeti szempontból azonos az AN-152-vel de az AN-207 esetén a 2-pyrrolino-DOX felel a citotoxikus hatásért a DOX helyett, ami így még DOX rezisztens daganatok esetekben is képes kifejteni antineoplasztikus hatást (140). A 2-pyrrolino-DOX 500-1000x hatékonyabb, mint a DOX, és nincs a két molekula között keresztrezisztencia. A jelenlegi adatok alapján a kialakuló DOX rezisztencia jelentősen képes csökkenteni az AN-152 hatékonyságát is. A konfokális lézer pásztázó mikroszkópos vizsgálatok alapján látható volt az AN-152 lassabb receptor mediált felvétele, összehasonlítva a DOX gyors passzív diffúzióval történő felvételével. Az OCM3_{DOX320} sejtvonal szerzett rezisztenciája mögött olyan aktív mechanizmusok állhatnak (pl.: LRP), amelyek segítenek a DOX sejten belüli lokalizációjának megváltoztatására, így elkerülve a DOX sejtmagban történő halmozódását. Azonban a felvételeink alapján ezek a folyamatok nem befolyásolták az AN-152 felvételét. Az OCM3_{DOX320} sejtekben DOX kezelés esetén jól megfigyelhető volt a sejtmagok DOX szignáljának gyengülése, különösen a 24 órás kezelést követő felvételeken. Az AN-152 fokozatos felvételének köszönhetően a rezisztens sejtek esetén az AN-152 kezelés hatására

egyik időpillanatban sem volt tapasztalható DOX halmozódás a sejtmagokban. Viszont határozottabb fluoreszcens szignál halmozódás volt megfigyelhető a citoplazmában és a citoplazmában kialakuló granulomokban (0,5 és 1 órás felvételek), ami elsősorban az AN-152 membrán kapcsolt felvételével magyarázható. Az AN-152, [D-Lys⁶] LHRH hordozó peptidre és DOX-ra való hasadásának a féléletideje humán szérumban megközelítőleg 2 óra. A vizsgálataink alapján az AN-152 felezési ideje hasonló érték lehet, mivel a 6 és 24 órás fluoreszcens képek hasonlóak voltak, függetlenül a DOX vagy AN-152 kezeléstől. Ez leginkább abból adódhat, hogy a kezelés 6. órájában az AN-152 molekulák többségéből a DOX szabadabbá vált. Az eredményeink alapján a DOX érzékeny és rezisztens sejtek is sikeresen halmozzák a célzott terápiás szert, azonban a DOX az LHRH hordozójáról való lehasadása után a 24 órás kezelést követő fluoreszcens kép alapján a DOX nem jut be nagy mennyiségben a rezisztens sejtek sejtmagjába. A gyorsan terápia rezisztenssé váló sejtek jelentőségét nem lehet elhanyagolni a daganatok kezelésében. A citotoxikus terápiával szemben kialakuló rezisztencia és a gyakori áttétképzés sok esetben lehetetlenné teszi számos daganat sikeres kezelését. UM esetén a betegek felében kialakul metasztázis, függetlenül a primer daganat sikeres sebészi vagy radioterápiájától. Ugyanakkor jelenleg nincs olyan szisztémás terápiás lehetőség, ami képes lenne javítani az UM betegek túlélését. UM esetén az LHRH-R magas expressziója azt sugallja, hogy ez a rák típus alkalmas célpontja lehet a célzott citotoxikus LHRH alapú terápiáknak, például az AN-152 alkalmazásával. Az AN-152 ezidáig több klinikai vizsgálat alá esett, ahol előnyös antiproliferatív tulajdonsága igazolódott, akár terápia rezisztens tumorok esetén is. Többek között az általunk is használt LHRH peptid hordozóból és a hozzá kapcsolt citotoxikus molekulából álló konjugátumok hatékonyabbnak és kevésbé toxikusnak bizonyultak a konvencionális szisztémás terápiáknál. Használatuk során leginkább jelentkező mellékhatás a mieloszupresszió, ami leginkább a citotoxikus molekula hordozóról történő aspecifikus lehasadásával magyarázható.

Vizsgálataink alapján az LHRH ligand és a LHRH-R gyakori együttes expressziója (31%) valamilyen LHRH alapú autokrin/parakrin szabályozási útvonal meglétét feltételezi UM esetén. Ezt erősíti meg az a megfigyelésünk is, hogy a sejtleletképeségi vizsgálatok során az AN-152 nanomólos koncentrációjú alkalmazásával a sejtosztódás fokozódását tapasztaltuk. Számos sejt proliferációval és motilitással kapcsolatos szabályozó fehérje hozható összefüggésbe az LHRH ligand és az LHRH-R rendszerével, feltételezve ezzel ennek a hormonális útvonalnak a fontosságát a metasztázisok képzésében. Munkánk során elsőként igazoltuk az LHRH és receptorának expresszióját humán UM szövetminták esetén. Az UM esetén az LHRH és receptorainak általunk talált magas expressziója és annak szerepe jelenleg még nem teljesen

tisztázott. Továbbá először írtuk le olyan splice variáns LHRH-R jelenlétét humán UM sejtvonal esetén, amiben a teljes III-as exon hiányzik. Sikeresen felállítottunk egy olyan *in vitro* kísérletes modellt, ami egyszerre alkalmas a csonka LHRH receptor fehérjén keresztüli célzott terápia megvalósítására és tanulmányozására, valamint az általunk kialakított DOX rezisztencia esetén a citotoxikus LHRH analóg AN-152, sejten belüli eloszlásának vizsgálatára. Az LHRH splice variánsok és fehérje izoformák patológiai és terápiás szerepe jelenleg még nem kellően tisztázott. Emellett egyelőre csak korlátozott mennyiségű információ áll rendelkezésre a fehérje izoformákon keresztüli célzott terápia lehetőségéről. Eredményeink felvetik az LHRH-R izoformák, mint daganatterápiás molekuláris célpontok alkalmazását az olyan molekulák számára, mint az AN-152. Véleményünk szerint ez a célzott terápiás modell mindenképp előnyös, és továbbgondolásra érdemes területnek bizonyul. Vizsgálatunk fontos tanulsága az is, hogy a célzott terápiát megelőző esetleges DOX kezelés jelentős mértékben képes rontani az AN-152 hatékonyságát UM esetén. Ugyan az AN-152 vizsgálataink alapján halmozódni tud a DOX rezisztens sejtekben is (ami bizonyos esetekben a rezisztencia teljes kikerülésével is járhat) a LHRH hordozóról lehasadó DOX már hatástalanításra kerül a rezisztencia által. Az LHRH-R terápiás célpontként történő felhasználása esetén a receptor mediált felvétel és az AN-152 elhúzódo hasítása kevésbé provokálja új, a citotoxikus szerrel szembeni rezisztencia kialakulását. A kialakuló rezisztencia ugyanis a gyakorlatban a megghiúsult antraciklin terápia legfőbb oka.

A jelenlegi nem kellőképpen specifikus terápiákkal szemben, munkánk eredményei segíthetnek olyan új és specifikus molekuláris célpontok azonosításában az UM esetén, amelyek alkalmasak lehetnek egy modern, hatékony célzott kezelés kialakítására nem csak az AN-152, hanem más hasonló citotoxikus LHRH analóg segítségével is. Az ilyen terápiák hatással lehetnek az UM elszórt metasztázisaira is. Új lehetséges molekuláris célpontként nem csak a teljes hosszúságú LHRH-R-t, hanem annak általunk leírt és vizsgált variánsait is felhasználhatjuk a jövőben.

Értekezésben elért új eredmények röviden:

- Elsőként írtuk le, hogy a teljes hosszúságú LHRH-R-I a szövetminták 46%-ban expresszálódott, míg az LHRH a szövetminták 69%-ban
- A receptort fehérje szintű jelenlétét is igazoltuk
- Sikeresen kialakítottunk egy DOX rezisztens UM *in vitro* sejtes modellt

- A in vitro sejtes modellen mRNS és fehérje szinten leírtuk egy új LHRH splice variáns/izofoma jelenlétét
- Igazoltuk az újonnan leírt LHRH-R izofoma alkalmasságát az AN-152 felvételére
Leírtuk a DOX és AN-152 sejtproliferációra gyakorolt hatását DOX érzékeny és rezisztens sejteken

7. Összefoglaló

Az elmúlt évtizedekben az uveális melanomas (UM) betegek átlagos túlélése az alkalmazott terápiák ellenére semmit sem változott. Metasztázis esetén a betegek átlagos túlélése nem éri el az egy évet sem, ráadásul a primer tumor kezelésétől függetlenül az esetek több mint felében kialakul áttét. A borzasztó statisztikák háttérében leginkább az UM sejtek szervezeten belüli gyors szóródása és a hagyományos kemoterápiára való érzéketlensége állhat. Az LHRH (luteinizig hormone-releasing hormone) citotoxikus peptid analógjai számos esetben hatékonynak bizonyultak nemi hormon függő daganatokban, mint az endometrium, petefészek és prosztata daganatok, de a nemi hormonoktól nem függő daganatok esetén (mint a humán UM) ismereteink meglehetősen korlátosak.

Vizsgálataink célja az volt, hogy kiderítsük a célzott terápiára alkalmas LHRH receptor és ligand kifejeződését humán UM esetén, valamint egy olyan modell felállítása, amely alkalmas a DOX-nal konjugált citotoxikus LHRH analóg (AN-152, AEZS-108, zotarelin doxorubicin) sejtszintű felvételének vizsgálatára doxorubicin (DOX) rezisztens esetben is.

39 humán uveális melanoma szövetminta esetén került meghatározásra a teljes hosszúságú LHRH receptor és az LHRH ligand expressziója RT-PCR segítségével. Radioligand kötési vizsgálattal határoztuk meg 10 minta esetében a specifikus ligandkötés tulajdonságait. Az LHRH receptor fehérje a szövetminták esetén immunhisztokémia segítségével is igazolásra került. A DOX rezisztens UM sejtes modell kialakításához lépésenként növekvő DOX koncentráció mellett növesztettünk OCM3 humán UM sejteket. A DOX érzékeny (OCM3) és rezisztens (OCM3_{DOX320}) sejtek LHRH receptor expresszióját exononként RT-PCR segítségével, míg fehérje szinten immuncitokémiával vizsgáltuk. A sejtekben a DOX és AN-152 felvételét konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal tettük léthatóvá. MTT vizsgálat segítségével hasonlítottuk össze a DOX és AN-152 sejtproliferációra gyakorolt hatását mindkét sejtvonalon.

Az 1-es típusú LHRH receptor magas százalékban (46%) kifejeződik az általunk vizsgált szövetminták esetén, míg a LHRH ligand a minták 69%-ban mutatott expressziót. Tízből 7 esetben a minták erős ligand kötési affinitást mutattak a ligandkompetíciós vizsgálatokban. Az immunhisztokémia szintén megerősítette a LHRH receptor jelenlétét a szövetminták esetén. Sikeresen kialakítottunk egy stabilan növekvő DOX rezisztens humán UM sejtvonalat. A vizsgálataink alapján az OCM3 és az OCM3_{DOX320} sejtvonalak is kifejeznek LHRH receptor splice variánst és sikeresen igazoltuk az AN-152 LHRH receptor izoformáin keresztüli felvételét a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokkal. Az AN-152 hatékonyan képes volt dóziszfüggő módon gátolni a sejtproliferációt mindkét sejtvonalban.

Eredményeink alapján az LHRH receptor és annak izoformái alkalmas molekuláris célpontjai lehetnek egy modern, hatékony, célzott terápiának UM és annak metastázisai esetén.

8. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani, Prof. Dr. Halmos Gábornak a témavezetésért, munkáért és támogatásért. Különös hálával tartozom Dr. Treszl Andreának, aki idő közben tragikusan fiatalon hunyt el, a számos megtanított kísérletes módszerért, szakmai konzultációért és baráti támogatásért. Köszönöm a közlemények minden társszerzőjének és minden közvetlen és közvetett munkatársamnak a segítséget.

Szeretném megköszönni szüleimnek, testvéremnek, hogy mindvégig támogattak és bátorítottak a munkám elvégzésében. Kitüntetett hálával tartozom feleségemnek, aki sokat segített az elkészült munka szakmai lektorálásában és minden nehézségben mellettem állt.

A munka elvégzését támogatták:

- A tanulmány alapjául szolgáló kutatást az Emberi Erőforrás Minisztériuma által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program támogatta, a Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja keretében (20428-3/2018/FEKUTSTRAT)
- Az értekezés elkészülését támogatta EFOP 3.6.1-16-2016-00022
- Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP-18-3-IV-DE372)
- Richter Gedeon Talentum Alapítvány
- GINOP-2.3.2-15-2016-00043 Szív és érkutatási kiválóságközpont (IRONHEART)
- OTKA K81596 "Rosszindulatú daganatokban expresszáldóluteinizálóhormon-releasing hormon receptorok mint új molekuláris célpontok a pozitron emissziós tomográfia számára" 2010-2014.
- TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 „A felsőoktatás minőségének javítása a kutatás-fejlesztés-innováció-oktatás fejlesztésén keresztül a Debreceni Egyetemen”
- TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 számú Molekuláris Onkológia projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.
- TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú Kutató Egyetemi projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/352/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Oláh Gábor
Neptun kód: H3HZI3
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10044594

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Oláh, G.**, Dobos, N., Vámosi, G., Szabó, Z., Sipos, É., Fodor, K., Harda, K. M., Schally, A. V., Halmos, G.: Experimental therapy of doxorubicin resistant human uveal melanoma with targeted cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analog (AN-152).
Eur. J. Pharm. Sci. 123, 371-376, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.002>
IF: 3.466 (2017)
2. Treszl, A., Steiber, Z., Schally, A. V., Block, N. L., Dezső, B., **Oláh, G.**, Rózsa, B., Fodor, K., Buglyó, A., Gardi, J., Berta, A., Halmos, G.: Substantial expression of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptor type I in human uveal melanoma.
Oncotarget. 4 (10), 1721-1728, 2013.
IF: 6.627





További közlemények

3. Sipos, É., Dobos, N., Rózsa, D., Fodor, K., **Oláh, G.**, Szabó, Z., Székvölgyi, L., Schally, A. V., Halmos, G.: Characterization of Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH-I) receptor type I as a potential molecular target in OCM-1 and OCM-3 human uveal melanoma cell lines.
OncoTargets Ther. 11, 933-941, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/OTT.S148174>
IF: 2.656 (2017)
4. Harda, K. M., Szabó, Z., Szabó, E. K., **Oláh, G.**, Fodor, K., Szász, C. S., Méhes, G., Schally, A. V., Halmos, G.: Somatostatin Receptors as Molecular Targets in Human Uveal Melanoma.
Molecules. 23 (7), 1-13, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23071535>
IF: 3.098 (2017)
5. Sipos, É., Hegyi, K., Treszl, A., Steiber, Z., Méhes, G., Dobos, N., Fodor, K., **Oláh, G.**, Székvölgyi, L., Schally, A. V., Halmos, G.: Concurrence of chromosome 3 and 4 aberrations in human uveal melanoma.
Oncol. Rep. 37, 1927-1934, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3892/or.2017.5496>
IF: 2.976
6. **Oláh, G.**, Steiber, Z., Halmos, G.: Iránytű műkönyvekhez: gyógyszerészeknek.
Gyógyszerészet. 57 (2), 77-80, 2013.
7. **Oláh, G.**, Steiber, Z., Halmos, G.: Mi folyik a műkönyvekkel?
Gyógyszerészet. 56 (11), 663-666, 2012.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,823

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,093**

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



További közlemények:

- 1, Oláh G.: Vásárlói igények, patikai lehetőségek Felmerülő kihívások és lehetséges megoldásuk. Gyógyszertár, XVIII 1. szám (2019. 01.)
- 2, Szabó E., Szabó Zs., Szegedi K., Oláh G., Sággy T., Tóth F., Flaskó T., Kalács K. I., Halmos G.:A shikonin humán vesedaganat sejtvonalakra kifejtett apoptotikus hatása, Klinikai Onkológia, V 3. különszám (2018. 11.)
- 3, Oláh G.: Néhány gondola mit, arról mit tehetünk daganatos betegeinkért a gyógyszertárban. Gyógyszertár, XVII 7-8. szám (2018. 08.)
- 4, Oláh G., Magisztrális gyógyszerkészítés –legyen puszkapor a küzdelemhez, ne homok a gépezetben, Gyógyszertár, XVI 4. szám (2017. 04.)
- 5, Dr. Oláh Gábor: Ördög a részletekben- a száraz szem gyógyszerészeti gondozásának aktualitásai, Gyógyszertár, XV. 2. szám (2016. 02.)
- 6, Szabó Zs., Szegedi K., Flaskó T., Gombos K., Oláh G., Harda K., Halmos G., Onkogén jellegű miR-ek expressziójának vizsgálata világossejtes vesekarcinómában, MUT 19. kongresszusa Siófok (2014. 09.)
- 7, Oláh G., Treszl A., Vámosi Gy., Steiber Z., Halmos G., Uvealis melanomában expresszáldó Luteinizáló Hormon-Releasing Hormon (LHRH) receptorokon alapuló célzott daganatterápia lehetősége citotoxikus LHRH analóggal, Gyógyszerészetsupplementum 48:(Suppl. I.) pp. S52 (2014. 4.)
- 8, Oláh G., Halmos G., A száraz szem gyógyszerészeti gondozása- megéri? 48:(Suppl. I.) pp. S133 (2014. 4.)
- 9, Oláh G, Kerekes I, Törjéki Cs Amerikából jöttem.... GYÓGYSZERTÁR 12:(4) pp. 19-21. (2013. 12.)
- 10, Rózsa D, Oláh G, Kertész I, Trencsényi Gy, Márián T, Treszl A, Mező G, Halmos G Luteinizáló hormon felszabadító hormon receptorához kötődő PET-radiotracer fejlesztése és karakterizálása a tumordiagnosztika számára. MAGYAR ONKOLOGIA 57:(1 szupplementum) pp. 76 (2013. 11.)
- 11, Treszl A., Fodor F., A. V. Schally, Steiber Z., Oláh G., Halmos G. The mechanism of action of targeted cytotoxic LHRH analog AN-152 (AEZS-108) in human uveal melanoma cells. International Journal of Molecular Medicine 32: (1 supplement) pp 43 (2013. 10.)
- 12, Oláh G, Steiber Z, Halmos G Száraz szem sillabusz. GYÓGYSZERTÁR 12:(4) pp. 13-14. (2013. 04.)
- 13, Oláh G, Steiber Z, Halmos G Iránytű műkönyvekhez GYÓGYSZERÉSZET 57:(2) pp. 77-80. (2013. 02.)
- 14, Oláh Gábor, Steiber Zita, Halmos Gábor Mi folyik a műkönyvekkel?! GYÓGYSZERÉSZET 56:(11) pp. 663-666. (2012.11.)

15, Oláh Gábor, Treszl Andrea, Steiber Zita, Rózsa Bernadett, Dezső Balázs, Rózsa Dávid, Halmos Gábor: Luteinizáló hormon-releasing hormon (LHRH) receptoron alapuló célzott terápiás lehetőség humán uveális melanomában, Orvostovábbképző Szemle 2012. November, különszám, 66, (2012)

16, Zita Steiber, Andrea Treszl, Gabor Olah, Armin Buglyo, Bernadett Rozsa, Andras Berta and Gabor Halmos: Expression of Receptors for Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) in Human Uveal Melanomas, Invest Ophthalmol Vis Sci, April 22, 52:6021, (2011)

17, Treszl A, Steiber Z, Oláh G, Rózsa B, Schally AV, Halmos G: LUTEINIZING HORMONE-RELEASING HORMONE RECEPTORS (LHRH) IN HUMAN UVEAL MELANOMA AS POTENTIAL MOLECULAR TARGETS FOR CANCER THERAPY, Abstract #100 pp:51 10th International Symposium on GnRH Salzburg, Austria, (2011)
Kongresszusi poszterek:

Kongresszusi előadások:

1, Gyomorégés és reflux gyógyszeres terápia menedzsmentje, Farmakoterápia aktualitásai Miskolc (2016)

2, A tumor diagnosztika és célzott terápia megvalósítási lehetőségei új molekulári targeteken keresztül, "A molekuláris biológiától a nukleáris medicináig", Debrecen (2015. 11.)

3, Doxorubicin (DOX) rezisztens uveális melanoma Luteinizáló HormonReleasing Hormon receptor (LHRH-R) alapú célzott terápiajának vizsgálata, MAGYAR KLINIKAI FARMAKOLÓGUSOK XIX. TOVÁBBKÉPZŐ NAPOK, Debrecen (2017. 12.)

4, Gyomorégés és reflux gyógyszerészi gondozása, Gyógyszerésztudományok Fóruma Pécs (2016)

5, A tumor diagnosztika és célzott terápia megvalósítási lehetőségei új molekuláris targeteken keresztül, A „Biotechnológia a Debreceni Egyetemen” 2. szimpózium (2015. 11.)

6, A száraz szem gyógyszeres terápia menedzsmentje, MOSZ Gyógyszerészek XXV. országos kongresszusa Siófok (2015)

7, ÚJ MOLEKULÁRIS CÉLPONTOK A DAGANATTERÁPIÁBAN, Fórum az oktató gyógyszerészeknek, Szeged (2015. 04.)

8, A száraz szem gyógyszerészi gondozása, Gyógyszerésztudományok Fóruma Pécs (2015)

9, Amerikai tapasztalatok 1 év távlatából, MOSZ Gyógyszerészek XXIV. országos kongresszusa Siófok (2014)

10, Oláh G., Treszl A., Vámosi Gy., Steiber Z., Halmos G., Uveális melanomában expresszáldó Luteinizáló Hormon-Releasing Hormon (LHRH) receptorokon alapuló célzott daganatterápia lehetősége citotoxikus LHRH analóggal, 15. CPH Budapest (2014)

11, A száraz szem gyógyszerészi gondozása- megéri? I díjazott versenyelőadás, Cholnoky László Szakkollégium Nyitónap Pécs (2014)

12, Gyógyszerészek XXIII. Országos Kongresszusa, Ifjúsági Fórum, Beszámoló a Tennessee Egyetem eltöltött gyakorlatról. Siófok (2013)

13, XLVIII. Rozsnyay Mátyás Emlékverseny, Mit kezdünk a magival?! II. Díjazott versenyelőadás Miskolc (2013)

14, Gyógyszerészek XXII. Országos Kongresszusa, Ifjúsági Fórum, Iránytű műkönyvekhez II. Díjazott versenyelőadás Siófok (2012)

15, XLVII. Rozsnyay Mátyás Emlékverseny, Mi folyik a műkönyvekkel?! II. Díjazott versenyelőadás Debrecen (2012)

16, LHRH receptorokon alapuló új célzott daganatterápia lehetősége humán uveális melanómában, farmakológia szekció III. helyezés (TDK pályamunka) Debrecen (2010)

Egyetemi jegyzetek:

1, Gabor Halmos: Pharmaceutical Care Practical Study Notes, Possible ways of pharmaceutical care in ophthalmology and other topics, Egyetemi jegyzet rész angol nyelven 2015. 01. 31.

2, Dr. Halmos Gábor: Válogatott fejezetek a gyógyszerészi bioanalitikából, Biológiai minták kezelése (gyűjtése, tárolása és homogenizálása) bioanalitikai felhasználásra fejezet, Egyetemi jegyzet rész magyar nyelven 2015. 01. 31.

3, Gabor Halmos: Selected chapters of pharmaceutical bioanalytical methods, Biological sample handling (storage and homogenization) for bioanalytical use, Egyetemi jegyzet rész angol nyelven 2015. 01. 31.

4, Dr. Halmos Gábor: Gyógyszerészi gondozási példák, Szemészeti és egyéb gyógyszerészi gondozási lehetőségek, Egyetemi jegyzet rész magyar nyelven 2015. 01. 31