

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Humán Luteinizáló hormon-releasing hormon receptor-I,
Luteinizáló hormon-releasing hormon receptor-I transzkript
variánsok és a Luteinizáló hormon-releasing hormon-I
expressziója humán benignus prosztata hiperpláziában**

Rózsa Bernadett

Témavezető: Dr. Halmos Gábor



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2010.

Témavezető:

Prof. Dr. Halmos Gábor

Doktori Iskola

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

A szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Pórszász Róbert, Ph.D.

Dr. Gardi János, Ph.D.

A védési bizottság elnöke:

Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

Opponensek:

Dr. Vecsernyés Miklós, Ph.D.

Prof. Dr. Mező Gábor, az MTA doktora

A védési bizottság tagjai:

Dr. Pórszász Róbert, Ph.D.

Dr. Gardi János, Ph.D.

A védés helye, ideje: DE OEC I.sz. Belgyógyászati Klinika tanterme
2010. november 24. 13:00

Bevezetés

Az idősödő férfiak körében a benignus prosztata hiperplázia (BPH) a leggyakoribb urológiai megbetegedés. A 60 év körüli férfiak 60 %-ának vannak tünetei. Rizikó faktorok a prosztata volumen, az életkor és a PSA-szint.

Az elmúlt 15 évben a daganatos betegségek háttérben álló molekuláris mechanizmusok vizsgálatai során reflektorfénybe kerültek a különböző peptid hormonok és azok receptorainak expressziós vizsgálatai. Ezen peptid hormonok illetve receptoraik különböző mértékben expresszálódhatnak egyes daganatos betegségekben, lehetőséget teremtve mindezzel egy esetleges célzott daganatterápia megvalósítására. Napjainkban számos kutatás folyik a benignus illetve malignus daganatos megbetegedések háttérben álló molekuláris mechanizmusok pontosabb megértése céljából, és az elmúlt 20 év molekuláris biológiai kutatásai igazolták, hogy a hipofízis gonadrotrop sejtjeinek hormon elválasztását szabályozó Luteinizáló hormon – releasing hormon-I (LHRH-I) vagy másnéven Gonadotropin hormon – releasing hormon-I (GnRH-I) befolyásolhatja a különböző daganatok működését. A LHRH agonista illetve antagonisták analógok közvetlenül receptor-mediált módon is hathatnak a daganatos sejtekre, valamint „carrier”/szállító molekulaként felhasználva őket, szintén kifejtethetik hatásukat és fontos szerepet játszhatnak a modern célzott terápiákban. A benignus és malignus betegségek háttérben lévő molekuláris mechanizmusok kutatásainak egyik központi kérdésévé vált ezen betegségek során megjelenő, normálistól eltérő fehérje expressziós tulajdonságok elemzése.

A BPH során alkalmazott terápiát a beteg panaszai határozzák meg. A BPH kezelésének célja az alsó húgyúti tünetek csökkentése, az életminőség javítása, valamint egyéb szövödmények kialakulásának megelőzése. Helyes indikáció esetén a gondos követés (Watchfull waiting-WW) hatékony módszer.

Kezdeti, mérsékelt fokú klinikai panaszok mellett a BPH növényi kivonatokkal történő kezelése is ismert. A fűrészpálma (*Sabal serrulata*, *Serona repens*) gyümölcsének kivonata antiflogesztikus és antikongesszív szöveti hatásával és 5 α redukáz aktivitás csökkentésével fejt ki terápiás hatását. A csalángyökér (*Urtica radix*) kivonat a fehérjéhez

kötött tesztoszteron csökkentésével, a tökmagkivonat (*Cucurbita semen*) a dihidrotesztoszteron receptor kötődés gátlásával csökkenti a beteg panaszait. A rozspollen (*Secale cereale*) antiflogisztikus és antikongesztív, a liliom növény (*Hypoxidace*) a prosztataaglandin szintézis gátlás útján kialakuló antiflogisztikus aktivitásán keresztül fejt ki hatását.

A növényi kivonatok hatékonyságának bizonyítása nem minden szer esetében egyértelmű, a pontos hatásmechanizmusuk nem tisztázott - emiatt további randomizált, placebokontrollált vizsgálatok elvégzésére lenne szükség.

Gyógyszereskezelés során jelenleg az FDA az α -blokkolókat és az 5- α reduktáz inhibitorok alkalmazását engedélyezi. Az α -blokkolók (*prazosin, doxazosin, alfuzosin, terazosin, tamzulosin*) a prosztataállomány simaizomzatában és a hólyagnyakon elhelyezkedő α -1 adrenoreceptorok közvetlen blokkolása útján fejtik ki hatásukat. A terápiás gyógyszerhatás eredményeként a tünetek gyorsan csökkennek, az uroflowmetriás paraméterek javulnak. Az α -1 receptor blokkolókat a közepesen súlyos és a súlyos alsó húgyúti tünetektől szenvedő betegek elsőként választandó gyógyszeres kezelésének ajánlják.

Az 5- α reduktáz inhibitorok (*finaszterid, dutaszterid*) az 5- α reduktáz enzim működésének gátlásával megakadályozzák a tesztoszteron – dehidrotesztoszteron átalakulást, így csökken a szérumban a dihidrotesztoszteron (se DHT) szintje. A prosztata növekedésében közvetlenül aktív szerepet játszó DHT tartós depléciója által a BPH visszafejlődik, a prosztata térfogata csökken, a vizeletáramlás szabaddá válik. A gyógyszer tartós alkalmazásával bizonyos esetekben a teljes vizeletelzáródás megszüntethető. A dutaszterid a finaszteriddel ellentétben az 5 α reduktáz enzim mindkét izoenzimjének szupressziójára képes, ezáltal a se DHT szint 90 %-os csökkenését okozza.

A dutaszteriddel kapcsolatban lefolytatott tanulmányok alapján elmondható, hogy a dutaszterid jól tolerálható készítmény, az észlelt hatékonyság, mellékhatások és tolerálhatóság tekintetében a finaszteriddel megegyező képet mutat, azonban e tekintetben további randomizált összehasonlító tanulmányok elvégzése szükséges.

Az 1990-es években Eri LM. és munkatársai széleskörű tanulmányokat folytattak a BPH LHRH agonista analógokkal történő kezelése terén. Ezek a tanulmányok igazolták, hogy a BPH LHRH agonista kezelés során a tesztoszteron szint jelentősen (kasztrációs

szintre) csökken az alsó húgyúti tünetek (LUTS) javulása azonban csekély mértékű. Az LHRH antagonisták analógok lehetnek a lehetséges új gyógyszermolekulák a BPH illetve a prosztatata karcinóma kezelésében. Az LHRH antagonisták analógok direkt módon gátolják az LHRH-receptorokat, így elmarad az LHRH agonista analógok alkalmazása során kialakuló „flare up jelenség” – melynek következménye az emelkedett LH és FSH felszabadulás illetve a megemelkedett tesztoszterontermelés. Az LHRH antagonisták analógokkal történő kezelés során így nem szükséges a kezelést megelőző antiandrogén kezelés sem. A BPH kezelésében alkalmazható LHRH antagonisták közül a Cetrorelixnek vannak a legszélesebbkörű vizsgálatai, de BPH-ban történő klinikai alkalmazásához további randomizált összehasonlító tanulmányok elvégzése szükséges.

A Luteinizáló hormon – releasing hormon-I (LHRH-I) a reprodukív hormonális rendszer egyik központi szabályozója. Először 1971-ben két egymástól független kutatócsoport izolálta az LHRH-I-et emlős hipotalamuszból. Andrew V. Schally és Roger Guillemin egymástól függetlenül írta le az LHRH-I, mint dekaeptid pontos aminosav szekvenciáját (pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂), melyért 1977-ben mindketten Nobel-díjban részesültek. Az LHRH-I-et a hipotalamusz neuroszekretoros idegsejtjei termelik. A hipotalamusz neuroszekretoros idegsejtjei által termelt hormonok a hipofízis portális keringésébe szekretálódnak. A hipofízis gonadotróp sejtjei pulzatilis módon juttatják a szisztémás vérkeringésbe a gonadotróp hormonjaikat: a luteinizáló hormont (LH) és a follikulusz stimuláló hormont (FSH). Az LH és FSH fő feladata az ivarmirigyek ivarsejtjeinek és szteroid hormon termelésének serkentése.

A Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor-I (LHRH-R-I) az irodalomban számos szinoním névvel szerepel: Gonadotropin hormon – releasing hormon receptor (GnRHR), Luliberin receptor (LRHR), 1-típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I). Tézisemben az LHRH-R-I nomenklaturát követem. Az LHRH-R-I génje a 4. kromoszóma hosszú karján (4q21.1) lokalizálódik és 3 exonból és 2 intronból épül fel. Az LHRH-R-I 7 transzmembrán doménnel (TM) rendelkező, 60 kDa nagyságú G-protein kapcsolt receptor (GPCR: G-protein coupled receptor), mely az adenohipofízis gonadotróp sejtjeinek felszínén expresszálódik. A 7 TM-hez 3

extracelluláris és 3 intracelluláris loop csatlakozik. A humán LHRH-R-I az egyetlen ismert GPCR, mely nem rendelkezik C-terminális farki résszel.

Az elmúlt 15 évben megjelent számos tanulmány igazolja, hogy az LHRH-R-I expresszálódhat extrahipofizeális normál és tumor szövetekben is. A gonadrotrop sejtekben és az extrahipofizeális szövetekben végbement szignál transzdukciós útvonalak, azonban különböznek egymástól. Az LHRH-R-I ligand kötődése után számos jelátviteli utat aktivál. Ezen jelátviteli utak közül leginkább tanulmányozottak a G-protein kapcsolt szignál transzdukciós útvonalak, melyeket alapvetően a fehérje α -alegysége határoz meg. Ez utóbbiak az LHRH-R-I ligand kötése esetén, jelen ismereteink szerint a humán hipofízis gonadotrop sejtjeiben a G_s (stimulatórikus/stimuláló G-protein) és a $G_{q/11}$, míg extrahipofizeális szövetekben (benignus ill. malignus betegségekben) elsősorban a G_i (inhibitórikus/gátló) lehetnek. A G_s fehérje aktivációját követően az adenilát cikláz foszforilálja a ciklikus adenzin-monofoszfátot (cAMP), majd a keletkező aktív cAMP cAMP-függő protein kinázokat, azok pedig további fehérjéket indukálnak. A $G_{q/11}$ szignál transzdukciós útvonala különbözik G_s szignál transzdukciós útvonalától. A $G_{q/11}$ elsőként a foszfolipáz C- β (PLC- β) fehérjét aktiválja, majd a foszfatidil-4,5-biszfoszfátot (PIP₂) diacil-glicerolra (DAG) és inozitol-trifoszfátra (IP₃) hidrolizálja. A DAG protein kináz C (PKC) aktivációt vált ki, míg az IP₃ intracelluláris Ca²⁺ felszabaduláshoz vezet. A perifériás szövetekben a G_i fehérje aktivációját követően az adenilát cikláz (AC) gátlása következtében csökken az intracelluláris cAMP szint, melynek következtében bekövetkezik a sejtek proliferációjának a gátlása (antiproliferatív hatás).

A humán 1-es típusú LHRH-receptornak eddigi irodalmi adatok szerint két transzkript variánsát igazolták. A két transzkript variáns az LHRH-R-I gén 2. exonját érintő deléció következtében alakul ki. Az irodalmi nomenklaturát követve az LHRH-R-I sb2 transzkript variáns az LHRH-R-I gén 2. exonjának 128 bázispáros (bp) deléciója, míg az LHRH-R-I sb3 transzkript variáns az LHRH-R-I gén teljes 2. exon (220 bp) deléciója miatt jön létre. A delécióval kialakult LHRH-R-I transzkript variánsokról transzlálódó fehérje izoformok is eltérnek a teljes LHRH-R-I génről transzlálódó 7 TM-mel rendelkező 328 aa-ból felépülő hipofizeális fehérjétől. Az LHRH-R-I sb2 transzkript variánsról egy 249 aa-ból felépülő 5 TM-mel rendelkező fehérje izoform transzlálódik. Az

LHRH-R-I sb3 transzkript variánsról eddigi irodalmi adatok nem igazolták a translációt, az mRNS expresszióját egérben mutatták ki.

Számos korábbi irodalmi adat igazolta már a LHRH-I expresszióját humán benignus és malignus szövetekben. Az LHRH-R-I extrahipofizeális expresszióját igazoló irodalmi adatok azonban limitáltak. Bár számos kutatócsoport vizsgálta napjainkig a humán LHRH-R-I mRNS expresszióját, az mRNS expressziós mérésekhez használt primereket általában nem a teljes LHRH-R-I génre tervezték és receptorális fehérje vizsgálataikat a rendelkezésre álló nem minden tekintetben specifikus antitestekkel végezték.

Célkitűzések

I. PhD munkám során tanulmányozni kívántam az 1 – típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon (LHRH-I) valamint receptora az 1 – típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor-I (LHRH-R-I) mRNS expresszióját human BPH szövetmintákban és humán hipofízisben reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) saját tervezésű és irodalomban már közölt primerpárok segítségével.

II. A humán LHRH receptor-I expresszióját immunhisztokémiával (IHC) terveztem vizsgálni humán BPH szövetmintákban és pozitív kontrollként alkalmazott humán hipofízis szövetben. Az IHC mérések alapvető célkitűzése, hogy vizsgáljuk az LHRH-R-I illetve és/vagy LHRH-R-I izoform(ok) expresszióját BPH szövetmintában a kontrollként használt hipofízishez képest.

III. Az LHRH-R-I funkcióképességét ligand kötési assay segítségével mértük kollaborációs kísérleteink során a BPH szövetminták membránfrakcióiban.

IV. A direkt leszorítási vizsgálatok során LHRH antagonistá (Cetrorelix) és agonista (Buserelin) analógok alkalmazásával mértük a BPH szövetminták membránfrakcióiban

elhelyezkedő LHRH receptorok kötési affinitását, valamint ezen potenciálisan a terápiában is alkalmazható farmakonok kötési tulajdonságait.

Anyagok és Módszerek

1. Mintagyűjtés

2006–2008 között műtéti úton eltávolított 35 BPH szövetminta (átlag életkor: 67.9 év \pm 0.5; életkor tartomány: 55-82 év) állt a rendelkezésünkre molekuláris biológiai vizsgálatokhoz a Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum Urológiai Klinikájáról. Pozitív kontrollként 3 humán hipofízis mintát használtunk, melyet a Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum Patológiai Intézetéből kaptunk. A Miami Egyetem Patológiai Intézetével folytatott kollaborációs munka során további 20 BPH szövetmintában történtek molekuláris biológiai és funkcionális vizsgálatok. A mintákat feldolgozásig mélyfagyasztottuk, melyre a mRNS expressziós vizsgálatok miatt volt szükség. Kísérleteink tervezése és kivitelezése során a Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum Etikai Bizottsága által jóváhagyott protokollok szerint jártunk el.

Alkalmazott módszerek

2.1. Homogenizálás és teljes RNS izolálás

A BPH mintákat és humán hipofízis mintákat mechanikusan kapszulás homogenizátorral (*Mikro-Dismembrator U Sartorius, Németország*) homogenizáltunk, ezt követően a szövet homogenizátumokból teljes RNS-t izoláltunk (*NucleoSpin Total RNA Isolation Kit Macherey-Nagel, Németország*) gyári kit segítségével a gyári protokollt optimalizálva. Az izolált teljes RNS-t felhasználásig -70°C -on tároltuk. Az RNS koncentrációját és tisztaságát Nanodrop spektrofotométerrel (*Nanodrop[®] ND-1000 UV Spectrophotometer, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA*) határoztuk meg. Az RNS-t a reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióhoz (RT-PCR-hez) megfelelő koncentrációjúnak (100-1000 ng/ μl) és tisztaságúnak tekintettük, ha a minták abszorpciója 260/280 és 260/230 nm-en 1,8-2,0 közötti érték volt.

2.2. Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR)

Az ismert RNS koncentrációk függvényében normalizáltuk az egyes mintákat majd reverz transzkripció segítségével az RNS-t komplementer DNS-é konvertáltuk. A reakció során mintánként 100-250 ng RNS-ből indultunk ki. A reverz transzkripció MMLV reverz transzkriptáz enzim (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase Reverse Promega Co, Madison, WI, USA*) segítségével történt két lépésben a gyári protokoll utasításai szerint. A reverz transzkripció sikerességét belső standard gén (humán beta – aktin: bACT) mRNS expressziójával igazoltuk. Minden esetben humán hipofízis szövetet használtunk pozitív kontrollként. Negatív kontrollként ún. no – templát kontrollt használtunk (azaz a mintát nem, de a reakcióhoz szükséges mindenmás reagenst tartalmazó elegyet) annak céljából, hogy kizárjuk a kontamináció ill. fals pozitivitás lehetőségét. A PCR-termékek detektálása minden esetben az alábbiak szerint történt: az amplifikált PCR-termékeket 1,5 %-os etidium bromidot tartalmazó agaróz gélen választottuk el, UV-fényben tettük láthatóvá és géldokumentációs rendszerrel (*DigiDoc RT2 Alpha Innotech, USA*) detektáltuk. 50 bp-os DNS-markert használtunk (*Promega, USA*) a PCR-termékek méretének ellenőrzéséhez.

Az irodalmi adatok összevetése és a specifikusabb mRNS expresszió mérése céljából az LHRH-R-I mRNS expresszióját három a humán LHRH-R-I kódoló szekvenciájára specifikus (CDS) primerpárral mértük, melyből egy kutatócsoportunk által tervezett primerpár volt.

Az LHRH-R-I F1/R1, LHRH-R-I F1'/R2' és bACT primerpárral az alábbi PCR protokoll alapján mértük a humán LHRH-R-I és a bACT mRNS expresszióját: 2 µl cDNS-t amplifikáltunk 1,5 mM MgCl₂-ot, 1xPCR puffert (*Invitrogen*), az egyes dNTP-ékből (dGTP,dCTP,dATP,dTTP) (*Promega, WI, USA*) 200 µM-t tartalmazó elegyben 1U Taq DNS polimeráz (*Invitrogen*) segítségével, 0,25 µM (LHRH-R-I F1/R1:F1:5'-GACCTTGCTCTGGAAAGATCC-3' (1.exon)) és 0,25 µM (R1: 5'-TGATGGTGGTGCAGCCTG-3' (1.exon)), 0,25 µM (LHRH-R-I F1'/R2':F1': 5'-TAGTGTCTTTGCAGGACCACA-3'(1. exon)) és 0,25 µM (R2': 5 - AATCATCTTACCCTGACACG-3' (2. exon)), és 0,25 µM (bACT: F3: 5'-

GGCATCCTCACCTGAAGTA-3' (3. exon)) és 0.25 μ M (R4: 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3' (4. exon)) primer koncentráció mellett 25 μ l végtérfogatban. A kezdeti denaturációs lépést, melyet 94 °C-on 3 percig végeztünk melyet a PCR 45 ciklusa követte, mely az alábbi lépésekből állt: denaturálás 94 °C-on 45 s-ig, anellálás 60 °C-on 30 s-ig, extenzió 72 °C-on, 90 s-ig. A 45 ciklus után egy végső extenziós lépést végeztünk 72 °C-on 10 percig.

Az LHRH-I ligand és az LHRH-R-I F2/R3 primerpárral az alábbi PCR protokoll alapján mértük az humán LHRH-I és az LHRH-R-I mRNS expresszióját: 2 μ l cDNS-t amplifikáltunk 3 mM MgCl₂-ot, 1xPCR puffert (*Invitrogen*), az egyes dNTP-ékből (dGTP,dCTP,dATP,dTTP) (*Promega, WI, USA*) 200 μ M-t tartalmazó elegyben 1U Taq DNS polimeráz (*Invitrogen*) segítségével, 0.25 μ M (LHRH-I: F1: 5'-CTACTGACTTGGTGCGTGGA-3' (1.exon)) és 0.25 μ M (R3: 5'-CTGCCAGTTTCCTCTTCAA-3' (3.exon) és 0.25 μ M (LHRH-R-I F2/R3:F2:5'-AGCAGACAGCTCTGGACAGACAAAA-3' (2.exon)) és 0.25 μ M (R3: 5'-TGTCTGCTGGACTCCCTACTATGT-3' (3.exon).

2.3. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) expressziójának mérése Immunohisztokémiával (IHC)

A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) immunohisztokémiai mérések célja az volt, hogy kutatócsoportunk igazolja, hogy extrahipofizeálisan a humán BPH szövetmintákban elsősorban nem a hipofizeális LHRH-R-I, hanem az LHRH-R-I valamely izoformja expresszálódik.

4%-os formalinban fixált paraffinba ágyazott 10 BPH szövetmintából és 2 humán hipofízis mintából 2-3 μ m vastag metszetet készítettünk mikrotómmal (*MICROM HM 335E*), 3-amino-propil-treitoxi-szilánnal (APES) előkezelt tárgylemezre (*SuperFrost Ultra Plus Thermo*). A metszeteket 56°C-on egy éjszakán át szárítottuk, majd deparafinálását (xilol 2x5 min; leszálló alkoholsor: abszolút alkohol, 96 %-os etanol, 70 %-os etanol; desztillált H₂O) követően kuktában a maximális nyomás kialakulását

követően 3 percig főztük az antigén feltárás céljából magas pH-jú citrát pufferben (*Target Retrieval Solution, pH 9 10X Dako*).

A hipofizeális LHRH–R–I kimutatására egérben termeltetett monoklonális anti-LHRH–R–I antitestet használtunk (*NCL-GnRHR A9E4 NovoCastra*) 1:20 hígításban. Az alkalmazott antitest a humán hipofizeális LHRH–R–I 1-29 aminosavszekvenciájára specifikus. Az immunreakciót Bond™ automatával (*NovoCastra Visionbiosystems Bond™*) végeztük el a rendszerrel kompatibilis kit (*Bond™ Polymer Refine Detection Kit, NovoCastra Visionbiosystems Bond™*) segítségével. Az immunreakcióhoz alkalmazott kit tartalmazta az endogén H₂O₂ gátlásához, az aspecifikus reakciók gátlásához és az előhíváshoz szükséges reagenseket. Az immunreakció előhívása torma – peroxidázzal (horseradish peroxidáz: HRP) konjugált polimer segítségével történt, melyhez a festék 3,3'-diaminobenzidin (DAB) volt. A háttér magfestést metilzölddel jelenítettük meg. Kontroll kísérletet végeztünk az aspecifikus reakciók és a háttérfestődés kizárása céljából, melynek során a primer antitestet kihagytuk az inkubáció során.

2.4. Ligand kötési assay (LBA)

A fenti molekuláris biológiai vizsgálatokat funkcionális kísérletekkel is kiegészítettük, amelynek során a BPH szövetminták membránfrakciójában elhelyezkedő LHRH–receptorok ligand kötési vizsgálatára került sor. Ezen vizsgálatokat kollaborációs kísérletek során végeztük a Miami Egyetem Patológiai Intézetével.

2.4.1. Kísérleti preparátumok – Membránpreparálás

A BPH szövetmintákat kis darabokra vágtuk és folyamatos hűtés mellett szöveti homogenizátorban (*Ultra-Turrax tissue homogenizer IKA Works, Wilmington, NC*) 50 mM Tris-HCl pufferben (pH 7.4) homogenizáltuk. A puffer proteáz inhibitorokat tartalmazott a fehérjebontó enzimek aktivitásának csökkentése céljából (0.25 mM fenil–metil–sulfonil–fluorid (PMSF), 0.4 v/v% aprotinin és 2 µg/ml pepstatin A). A nukleáris sejtszövetevőket és a lipid frakciót centrifugálással választottuk el, melynek során a

szövet homogenizátumot 10 percig 500xg fordulatszámon 4 °C-on centrifugáltuk. Az üledéket friss pufferben kétszer szuszpendáltuk és ultracentrifugában (*Beckman L8-80 M*) 70,000xg fordulatszámon 50 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A pelletet homogenizáló pufferben reszuszpendáltuk és a ligand kötési tanulmányok elvégzéséig - 80 °C-on tároltuk. A fehérje koncentrációját Bradford módszerrel határoztuk meg Bio-Rad protein assay kit (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*) segítségével a gyártó leírásainak megfelelően.

2.4.2. Ligand kompetíciós vizsgálatok

2.4.3. A BPH szövetminták membránfrakcióiban elhelyezkedő LHRH-receptorok ligand kötési tulajdonságainak vizsgálati radioaktívan jódozott LHRH analóg ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) alkalmazásával direkt leszorítási vizsgálatok során

A radioaktívan jódozott LHRH analógot ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) chloramine-T módszerrel állítottuk elő és reverz fázisú HPLC-vel (High performance/pressure liquid chromatography nagy teljesítményű folyadékromatográfia) tisztítottuk. Direkt leszorítási un. ligand kompetíciós vizsgálatok során radioaktívan jelölt LHRH liganddal ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) mértük a BPH membránfrakció ligand kötési tulajdonságait. 150 μL végtérfogatú elegyben (50-60 μg fehérjekoncentráció) található receptorkötő helyeket 60-80000 percnkénti beütésszámú (counts per minute:cpm) $[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH liganddal inkubáltuk. A radioaktívan jelölt LHRH ligandot a kötési helyekről a jelöletlen LHRH ligand növekvő koncentrációival (10^{-12} – 10^{-6} M) szorítottuk le. Az inkubációt követően a szuszpenzió 125 μL -ét 1 mL jéghideg 1.5 %-os BSA-t (marha szérum albumin–bovine serum albumin) tartalmazó kötő puffer réteg felszínére pipettáztuk és szilikon polypropilénnel bevont centrifugacsőben (*Sigma-Aldrich*) 12000xg fordulatszámon 3 percig 4°C-on centrifugáltuk (*Beckman J2-21M*). A szilikon polypropilénnel bevont centrifugacső alján lévő pelletet leválasztottuk és a radioaktivitás detektálásához a percnkénti beütésszámot (cpm) gamma-counter készülékkel mértük (*Micromedic System*,

Huntsville, AL). Előzetes kísérleteink során meghatároztuk azt a minimális fehérjekoncentrációt, mely szükséges a specifikus ligand kötési tanulmányok elvégzéséhez és elemzéséhez. Kísérleteink alapján a 150 µl végtér fogatú inkubációs elegyben 40-180 µg protein koncentráció volt a legmegfelelőbb a ligand kötési assay elvégzéséhez.

A direkt leszorítási vizsgálatok során az LHRH antagonistá Cetrorelix és az LHRH agonista Buserelin specifikus LHRH-receptor kötőhelyhez történő kompetícióját vizsgáltuk a BPH szövetminták membránfrakciójában. Ezekből a típusú vizsgálatokból következtettünk a BPH szövetminták membránfrakciójában található LHRH-receptorok specificitására is. Az LHRH agonista Buserelin és az LHRH antagonistá Cetrorelix direkt leszorítási vizsgálatait összevetettük más peptidok, így az epidermális növekedési faktor (EGF: Epidermal Growth Factor), a szomatosztatin, [Tyr⁴]bombesin, a humán növekedési hormon – releasing hormon (GH-RH: human Growth Hormone-Releasing Hormone) és az inzulinszerű növekedési faktor-I (IGF-I: Insulin like Growth Factor-I) radioaktívan jelölt LHRH liganddal ([¹²⁵I][D-Trp⁶] LHRH) szembeni kompetícióival.

2.4.4. Matematikai analízis

A specifikus ligand kötési kapacitást és affinitást a Munsun és Rodbrand szerinti Ligand-PC “curve-fitting program” segítségével elemeztük (53). Meghatároztuk a receptor ligandkötését, az 50 %-os telítettséghez tartozó ligandkoncentrációt (IC_{50}), a disszociációs konstanst (K_d) és a receptor maximális kötési kapacitását (B_{max}). A mért adatokat Scatchard módszerrel analizáltuk (54), melynek segítségével a mért adatok feldolgozásakor a kapott telítési görbe matematikai átalakításokkal egyenessé alakítható, amiről a K_d és (B_{max}) érték egyszerűen meghatározható. Az átalakítás lényege, hogy a kötött ligand mennyiségének függvényében ábrázoljuk a kötött/szabad radioaktívan jelölt ligand mennyiségét. Az így kapott egyenes meredeksége az $1/K_d$ értékét adja meg, a tengely metszete pedig a kötési kapacitást (B_{max}) mutatja.

V. Eredmények

1. Reverz transzkripciót követő polimeráz lánreakció (RT-PCR) mRNA expressziós eredmények

1.1. A humán beta-aktin (bACT) és a humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon ligand (LHRH-I) mRNA expressziója humán hipofízisben és BPH-ban

Minden minta pozitivitást mutatott a humán bACT mRNA expressziójára. Összesen 35 humán BPH szövetmintában és 3 pozitív kontrollként használt humán hipofízis mintában mértük RT-PCR segítségével a LHRH-I ligand mRNA expresszióját. A pozitív kontrollként használt humán hipofízis minták mindegyike pozitív volt LHRH-I mRNA expresszióra és a vizsgált 35 BPH mintából 18 mintában mértünk LHRH-I mRNA expressziót. Az LHRH-I mRNA expressziója 50 % feletti volt a vizsgált BPH mintákban, mely felveti az autokrin szabályozás lehetőségét.

1.2. Az 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) mRNA expresszió humán hipofízisben és BPH-ban

1.2.1. LHRH-R-I F1/R1 primerpárral mért mRNA expresszió humán hipofízisben és BPH-ban

RT-PCR-rel összesen 55 humán BPH szövetmintában (ebből 35 BPH szövetmintát a Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum Urológiai Klinikájáról és 20 BPH szövetmintát kollaborációs kísérleteink során a Miami Egyetem Patológiai Intézetétől kaptunk) és 3 humán hipofízis szövetmintában mértük a humán LHRH-R-I mRNA expresszióját az LHRH-R-I F1/R1 primerpárral. Az LHRH-R-I F1/R1 primerpárral a humán hipofízis minták mindegyike pozitív volt, míg a vizsgált 55 BPH szövetmintából 39 mintában (71 %) mértünk LHRH-R-I mRNA expressziót.

1.2.2. LHRH–R–I F2/R3 primerpárral mért mRNA expresszió humán hipofízisben és BPH-ban

Az LHRH–R–I F2/R3 primerpárral mért humán LHRH–R–I mRNA expressziója a BPH mintákban jóval alacsonyabb volt, az LHRH-R-I F1/R1 primerpárral mért mRNA expresszióhoz képest. A vizsgált 35 BPH mintából mindössze 5 minta (14 %) mutatott mRNA LHRH–R–I pozitivitást, míg a humán hipofízis minták mindegyike pozitív volt. Az LHRH–R–I F2/R3 primerpárral pozitív 5 BPH minta mRNA koexpressziót mutatott az 1. exonra tervezett LHRH–R–I F1/R1 primerpárral.

1.2.3. LHRH–R–I F1'/R2' sajáattervezésű primerpárral mért mRNA expresszió humán hipofízisben és BPH-ban

A hipofízeális, 219 bp-ral amplifikálódó LHRH–R–I mRNA expresszióját csak a humán hipofízis mintákban mértük. Abban az 5 BPH szövetmintában, amelyek mRNA koexpressziót mutattak LHRH–R–I F1/R1 és LHRH–R–I F2/R3 primerpárral azonban nem. Az LHRH–R–I sb2 transzkript variáns mRNA expresszióját nem mértük sem a humán hipofízis mintákban sem a BPH szövetmintákban.

2. Immunhisztokémiai eredmények

2.1. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) immunreakció kvalitatív értékelése humán hipofízisben

A pozitív kontrollként használt humán adenohipofízisben a humán LHRH–R–I expressziója jelentősen magasabb volt, mint a neurohipofízisben. Humán LHRH–R–I fehérje pozitivitást elsősorban humán adenohipofízis acidofil sejtjei mutattak.

2.2. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) immunreakció kvalitatív értékelése humán BPH szövetmintában

A BPH mintákban a hipofízeális humán LHRH–R–I expressziója a pozitív kontrollként vizsgált humán hipofízisben mért LHRH–R–I expressziójához képest

alacsony volt. A BPH mirigyhámsejtek nem mutattak pozitívítást a hipofízeális LHRH–R–I fehérjére. Azonban a BPH sztrómasejtekben alacsony mértékű LHRH–R–I pozitívítás megfigyelhető.

3. A BPH szövetminták membránfrakcióiban elhelyezkedő LHRH–receptorok ligand kötési tulajdonságai radioaktívan jódzott LHRH analóg ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) alkalmazásával ligan kompetíciós assay során

A BPH szövetminták membránfrakcióiban elhelyezkedő LHRH–receptorok funkcióképességének vizsgálatait ligand kompetíciós kötési assay során a Miami Egyetem Patológiai Intézetével folytatott kollaborációs munka során végeztük el.

A kompetitív ligand kötési assay során a radioaktívan jelölt LHRH ligand ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) és a jelöletlen LHRH ligand kompetíciós tulajdonságait vizsgáltuk a BPH szövetminták membránfrakcióiban. A vizsgált 20 BPH szövetmintából 18-ban mértünk LHRH–receptor kötést (90 %). A standard leszorítási görbe céljából a jelöletlen LHRH ligand növekvő koncentrációit (10^{-12} - 10^{-6} M) alkalmaztuk. A 18 LHRH–receptor kötést mutató BPH szövetmintában Munsun és Rodbrand szerinti Ligand-PC “curve-fitting program” és Scatchard analízis segítségével határoztuk meg a disszociációs konstans (K_d) és a receptor maximális kötési kapacitását (B_{\max}). A K_d értéke: 4.04 nM (1.09 - 7.26 nM) volt, a B_{\max} értéke: 527.6 fmol/mg membránprotein (344.7 - 900.2 fmol/mg protein) volt. A radioaktívan jelölt LHRH ligand ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) kötődése reverzibilis, idő-, és hőmérsékletfüggő volt. A ligand kötési kapacitás egyenes arányosságban volt a BPH minták fehérjekoncentrációival (ezek az utóbbi adatok nem szerepelnek a dolgozatban).

A BPH szövetminták membránfrakcióiban elhelyezkedő LHRH–receptorokon megvizsgáltuk az utóbbi évek során egyik leginkább tanulmányozott LHRH antagonistá analóg, a Cetrorelix receptor kötési tulajdonságát. Az LHRH antagonistá analóg Cetrorelix leszorította a radioaktívan jelölt LHRH-t ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) Meghatároztuk az 50 %-os receptor gátláshoz tartozó koncentrációt (IC_{50}). Az IC_{50} értéke: 0.94 ± 0.07 nM volt. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a BPH szövetminták membránjában

elhelyezkedő LHRH-receptorok nagy ligand kötési affinitással kötik a terápiában potenciálisan alkalmazható LHRH antagonistá Cetrorelixet.

A Miami Egyetem Patológiai Intézetével folytatott kollaborációs munka során további 20 BPH szövetmintában mértük az LHRH-R-I mRNS expresszióját a humán LHRH-R-I gén 1. exonjára tervezett LHRH-R-I F1/R1 primerpárral. A vizsgált 20 BPH szövetmintából 18 mintában (90 %) mértünk az LHRH-R-I mRNS expresszióját. Az LHRH-R-I mRNS expresszióra és a ligand kötési assay-re pozitív BPH szövetminták korrelációt mutattak. Az a két BPH szövetminta, amely negatív volt LHRH-R-I mRNS expresszióra, a ligand kötési assay során is negativitást mutatott.

A vizsgált BPH minták klinikai adatait az mRNS expresszió és/vagy a ligand kötési assay között nem volt korreláció.

A ligand kötési assay során az LHRH antagonistá analóg Cetrorelix és az LHRH agonista analóg Buserelin LHRH receptor kötési tulajdonságait vizsgáltuk.

A BPH szövetminták membránfrakcióiban az LHRH antagonistá analóg Cetrorelix és az LHRH agonista analóg Buserelin növekvő koncentrációi leszorították a radioaktívan jelölt LHRH-t ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH). Azonban más natív/jelöletlen peptidek, mint az EGF, a $[\text{Tyr}^4]$ bombesin, a GH-RH és az IGF-I nem voltak képesek leszorítani a radioaktívan jelölt LHRH ligandot ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) a kötési helyéről.

Diszkusszió

A benignus prosztata hiperplázia (BPH) az idősebb férfiak leggyakoribb betegsége. Az érintettek számát tekintve a BPH-t népbetegségnek kell tekinteni. A BPH etiológiája multifaktoriális, a kialakulását elsősorban az életkor és a hormonális változások határozzák meg. Az epidemiológiai tanulmányok alapján a tünetekkel érintettek száma az életkor előrehaladtával évtizedenként megduplázódik. A jelenlegi irodalmi adatok, klinikai tapasztalatok, valamint a betegség okozta komplikációk alapján a betegséget progresszívnek tekintik. A kockázat-elemző és longitudinális tanulmányok (Olmsted Country, PLESS) alapján a legfontosabb rizikófaktorok az életkor, a PSA-szint és a prosztata volumene. Ezen tényezők segítségével meghatározható a magasabb kockázati csoportba sorolható betegek köre.

A daganatos betegségekben szenvedők száma továbbra is évről évre emelkedik, ezért a háttérben álló molekuláris mechanizmusok vizsgálata és tisztázása egyre inkább sürgetővé válik. A daganatos betegségek során végbemenő molekuláris mechanizmusok ismeretében pontosabb diagnosztikai és hatékonyabb terápiás lehetőségek kifejlesztésére nyílt lehetőség. A 70-es évek elején két egymástól független kutatócsoport azonosította az adenohipofízis hormon elválasztásra ható gonadotropin termelését szabályozó Luteinizáló hormon – releasing hormont (LH–RH, LHRH–I, GnRH, GnRH–I). A kutatások fontosságát jelzi, hogy 1977-ben mindkét kutatócsoport vezetőjét, Andrew V. Schallyt és Roger C.L. Guillemit is orvosi Nobel–díjjal jutalmazták.

Ezzel egyidőben megindultak a kutatások abba az irányban, hogy egyes aminosavak kicserélésével az eredeti LHRH molekulánál hatásosabb LHRH analógokat fejlesszenek ki. A fejlesztések hatására először agonista LHRH analógokat szintetizáltak, melyek közül több viszonylag gyorsan gyógyszer formájában is hozzáférhetővé vált. A klinikumban használható antagonist LHRH analógok kifejlesztése hosszabb időt vett igénybe, azonban már néhány éve ezek is hozzáférhetőek gyógyszer formájában. Eri LM. és munkatársai a BPH-ban szenvedő betegek LHRH agonista analógokkal történő kezelése során igazolták, hogy az LHRH agonista terápia hatásaként a tesztoszteron szint jelentősen (kasztrációs szintre) lecsökken, az alsó húgyúti tünetek (LUTS) javulása azonban csak csekélyebb mértékű. Az adenohipofízis gonadotrop sejt felszíni 1-es típusú LHRH–receptorok telítődnek az LHRH agonista analógok hatására, melynek következménye a receptorok deszenzitizációja és „downregulációja”/alulszabályozása. A kezdeti megnövekedett LH és FSH elválasztást/release-t (úgynevezett „flare up” jelenség), majd az LH és FSH termelés (le)csökkenése követi, így következményesen csökken a gonádok hormon termelése is.

Az LHRH agonista analógok tehát közvetve csökkentik a tesztoszteron termelődését. A prosztata karcinóma kezelésében az LHRH agonista analógokkal történő kezelés előnyös vagy előnyösebb lehet más terápiával szemben, azonban a BPH hosszútávú kezelésében nem bizonyultak hatékony, biztonságos vegyületeknek. Bár az LHRH agonista analógokkal kezelt BPHs betegek szérumban a dihidrotesztoszteron szintje és prosztata mérete csökken, a vizelet ürítési valamint az erektilis funkciók rövidtávon

javulnak, hat hónappal az LHRH agonista analógokkal történő kezelést követően a prosztata mérete közel azonos lesz az LHRH agonista analógokkal történő kezelése előtti mérettel.

Az LHRH antagonistá analógok válhatnak új, hatékony gyógyszermolekulákká a BPH illetve a prosztata karcinóma kezelésében. Az LHRH antagonistá analógok „flare up jelenség” nélkül, direkt módon, reverzibilisen gátolják az adenohipofízis gonadotrop sejtjeinek sejt felszíni LHRH receptorait. LHRH antagonistá analógokkal történő kezelés hatására azonnal csökken az LH és FSH termelés és következményesen a gonádok hormon termelése is. Az LHRH antagonistá analógokkal történő kezelés során így nem szükséges a kezelést megelőző antiandrogén kezelés sem. A BPH kezelésében alkalmazható LHRH antagonistá analógok közül a Cetrorelixet vizsgálták a legbővebben, azonban a Cetrorelix BPH-ban történő klinikai alkalmazásához további randomizált összehasonlító tanulmányok elvégzése szükséges.

Számos kísérleti és klinikai vizsgálat eredménye igazolja, hogy kimutatható az LHRH-I ligand jelenléte humán BPH-ban. A funkcionális hipofízeális LHRH-R-I extrahipofízeális expresszióját igazoló irodalmi adatok azonban limitáltak. Számos kutatócsoport vizsgálta a humán LHRH-R-I mRNS expresszióját, de az mRNS expressziós mérésekhez használt primereket általában nem a teljes LHRH-R-I génre tervezték és receptorális fehérje vizsgálataikat a rendelkezésre álló nem minden tekintetben specifikus antitestekkel végezték. A molekuláris biológiai vizsgálatok mellett számos funkcionális vizsgálat igazolja, hogy a humán BPH szövetminták membránjában jelen vannak a funkcionális, ligand kötéssel rendelkező LHRH-receptorok. Az azonban, hogy ez a receptor a hipofízeális LHRH-R-I receptor vagy annak valamely izoformja, még nem tisztázott. Ezért tűzte ki célul kutatócsoportunk, hogy mind irodalomban közölt, mind saját tervezésű primerpárral mérje az LHRH-R-I mRNS expresszióját az irodalmi adatok összevetése és a specifikusabb mRNS expresszió meghatározása céljából.

Az irodalomban eddig két humán LHRH-R-I transzkript variáns expresszióját igazolták. A humán LHRH-R-I gén 2. exonjának teljes deléciója (220 bp) következtében jön létre a gén kisebb LHRH-R-I sb3 transzkript variánsa, míg az LHRH-R-I sb2 transzkript variáns a 2. exon 128 bp-os deléciója következtében alakul ki. A transzkript

variánsokról transzlálódó fehérje izoformok is eltérnek a teljes LHRH-R-I génről átiródó 7 TM-mel rendelkező hipofizeális proteintől.

Eddigi irodalmi adatok csak az LHRH-R-I sb2 transzkript variánsról igazoltak translációt. Az sb2 transzkript variánsról egy 5 TM-mel rendelkező fehérje izoform jön létre. LHRH-R-I sb3 transzkript variánsról eddig nem igazoltak translációt. Az sb3 mRNS expresszióját egérben mutatták ki.

Számos kísérleti és klinikai vizsgálat eredménye igazolja, hogy kimutatható az LHRH-I ligand jelenléte humán BPH-ban. A funkcionális hipofizeális LHRH-R-I extrahipofizeális expresszióját igazoló irodalmi adatok azonban limitáltak. A molekuláris biológiai vizsgálatok mellett számos funkcionális vizsgálat igazolja, hogy a humán BPH szövetminták membránjában jelen vannak a funkcionális, ligand kötéssel rendelkező LHRH-receptorok. Az azonban, hogy ez a receptor a hipofizeális LHRH-R-I receptor vagy annak valamely izoformja még nem tisztázott. Ezért tűzte ki célul kutatócsoportunk, hogy mind irodalomban közölt, mind saját tervezésű primerpárral mérje az LHRH-R-I mRNS expresszióját az irodalmi adatok összevetése és a specifikusabb mRNS expresszió meghatározása céljából.

A humán BPH szövetmintákban a humán hipofízis mintákhoz képest vizsgáltuk a humán LHRH-R-I mRNS expresszióját három a humán LHRH-R-I gén különböző szekvenciáira tervezett specifikus primerpárokkal.

Összesen 55 humán BPH szövetmintában és 3 humán hipofízis szövetmintában mértük a humán LHRH-R-I mRNS expresszióját az LHRH-R-I F1/R1 primerpárral. A pozitív kontrollként használt minták mindegyike pozitív volt LHRH-R-I F1/R1 primerpárral, míg a vizsgált 55 BPH mintából 39 mintában (71 %) mértünk LHRH-R-I mRNS expressziót. Az LHRH-R-I F2/R3 primerpárral végzett RT-PCR mRNS receptorális vizsgálataink célja az volt, hogy specifikusan meghatározzuk a hipofizeális teljes hosszúságú LHRH-R-I mRNS expresszióját a vizsgált BPH szövetmintában a kontroll hipofízis mintákhoz képest. A hipofízis minták pozitivitást mutatottak ezzel a primerpárral, azonban a vizsgált 35 BPH szövetmintákban nagyon alacsony mRNS LHRH-R-I pozitivitást mértünk. Mindössze 5 BPH mintában tudtuk az mRNS LHRH-R-I expressziót detektálni. Ezekben a mintákban az 1. exonra tervezett LHRH-R-I F1/R1

primerpárral is pozitív eredményt mértünk. Mindhárom pozitív kontroll mintában kimutattuk a 219 bp-os termékkel amplifikálódó hipofízeális teljes hosszúságú LHRH-R-I mRNS expresszióját. A 91 bp-ral amplifikálódó LHRH-R-I sb2 transzkript variáns mRNS expresszióját azonban nem detektáltuk. A vizsgált 35 BPH mintában nem mértünk pozitivitást ezzel a primerpárral, abban az 5 BPH mintában sem, melyek koexpressziót mutattak az LHRH-R-I F1/R1 és LHRH-R-I F2/R3 primerpárokkal.

A három humán LHRH-R-I génre specifikus primerpárral mért mRNS LHRH-R-I expressziós eredmény alapján kutatócsoportunk azt feltételezi, hogy a humán LHRH-R-I gén 1. exonja végén is történik delécio és a humán LHRH-R-I génnek az irodalmi adatok alapján igazolt két transzkript variánson kívül több transzkript variánsa is létezik. Hipotézisünket nukleotid szekvencia analízissel tervezzük a későbbiek során igazolni. Amennyiben BPH-ban sikerülne bizonyítani egy hipofízisben nem expresszálódó humán LHRH-R-I transzkript variánst, az további kérdéseket vet(het)ne fel. Hisz amennyiben a hipotetikus BPH-ban expresszálódó „új” humán LHRH-R-I transzkript variánsról történik transláció és a translálódó humán LHRH-R-I izoform funkcióképes azaz ligandkötési tulajdonsággal rendelkezik, lehetőséget nyílhatna a célzott terápia megvalósítására.

Összesen 35 humán BPH szövetmintában és 3 humán hipofízis szövetmintában mértük a humán LHRH-I mRNS expresszióját RT-PCR segítségével irodalomban közölt primerpárral. A humán hipofízis minták mindegyike pozitív volt LHRH-I mRNS expresszióra és a vizsgált 35 BPH mintából 18-ban (51 %) mértünk LHRH-I ligand mRNS expressziót. A magas LHRH-I mRNS expresszió felveti az autokrin szabályozás lehetőségét.

A BPH szövetmintákban immunhisztokémiával ellenőriztük, hogy a hipofízeális teljes hosszúságú 7 TM-mel rendelkező LHRH receptor-I és/vagy a receptor valamely izoformja van-e jelen. Az IHC mérésekhez a hipofízeális LHRH-R-I-re specifikus monoklonális antitestet használtunk. A pozitív kontrollként használt humán hipofízis

elülső lebenyében található acidofil sejtek expresszálták legnagyobb mértékben az LHRH-R-I-t, ehhez képest a hipofízis hátsó lebenyében mért LHRH-R-I expresszió jóval alacsonyabb volt. A BPH mintákban a hipofízeális LHRH-R-I expressziója a pozitív kontrollhoz viszonyítva alacsony volt. A BPH mirigyhámsejtek nem expresszálták az LHRH-R-I fehérjét. Azonban a BPH sztrómasejtek alacsony pozitivitást mutattak a vizsgált LHRH-R-I expressziójára.

A molekuláris biológiai vizsgálatokat funkcionális kísérletekkel is kiegészítettük, amelynek során a BPH szövetminták membránfrakciójában elhelyezkedő LHRH-receptorok ligand kötését tanulmányoztuk. Ezeket vizsgálatokat kollaborációs munka keretében végeztük a Miami Egyetem Pathológiai Intézetével. Az LHRH-receptorok ligand kötési tulajdonságait 20 BPH szövetminta membránfrakciójában mértük radioaktívan jódval jelölt LHRH ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) alkalmazásával ligand kompetíciós assay segítségével. A vizsgált 20 BPH szövetmintából 18 membránfrakciójában (90 %) sikerült specifikus LHRH-receptor jelenlétét igazolni. A standard leszorítási görbe céljából a natív ligand növekvő koncentrációit alkalmaztuk. A vizsgált BPH mintákban meghatároztuk az 50 %-os telítettséghez tartozó a disszociációs konstans (K_d) értékét és a receptor maximális kötési kapacitását (B_{\max}).

Az utóbbi évek során az egyik leginkább tanulmányozott LHRH antagonistá Cetrorelix és az LHRH agonista Buserelin alkalmazásával vizsgáltuk a BPH szövetminták LHRH receptorainak kötési affinitását. Az LHRH antagonistá Cetrorelix leszorította a radioaktívan jelölt $[\text{D-Trp}^6]$ LHRH-t. Meghatároztuk az 50 %-os receptor gátláshoz tartozó koncentrációt (IC_{50}). Az LHRH-receptorok funkcionális eredményei arra utalnak, hogy a BPH szövetmintákban expresszáldó LHRH receptorok erős ligandkötési affinitással rendelkeznek.

A fenti 20 BPH szövetmintában vizsgáltuk az LHRH-R-I mRNS expresszióját a humán LHRH-R-I gén 1. exonjára tervezett LHRH-R-I F1/R1 primerpárral. A 20 BPH mintából 18 minta mutatott pozitivitást (90 %). Az LHRH-R-I F1/R1 primerpárral pozitív 18 BPH minta együttes pozitivitást mutatott a ligand kötési assay során is. Az a két BPH szövetminta amely negatív volt LHRH-R-I F1/R1 mRNS expresszióra, a ligand kötési tanulmányokra is negativitást mutatott.

A vizsgált BPH minták klinikai adatait az mRNA expresszió és/vagy a ligand kötési tanulmányok között nem volt korreláció.

Következtetések

Molekuláris biológiai vizsgálataink eredményei alapján feltételezzük, hogy a humán LHRH-R-I-nek az irodalmi adatok által igazolt két transzkript variánsán kívül további transzkript variánsai is lehetnek. Ezen hipotézisünk igazolására a jövőben további a humán LHRH-R-I génre specifikus primerpárok tervezése szükséges. Munkacsoportunk célkitűzése, hogy nukleotid szekvencia analízissel meghatározza az 1. exonra tervezett LHRH-R-I F1/R1 primerpárral pozitív 16 BPH minta, valamint az LHRH-R-I F1/R1 és LHRH-R-I F2/R3 primerpárral együttes pozitivitást mutató 5 BPH minta pontos nukleotid szekvenciáját. A vizsgált BPH mintákban mért LHRH-R-I transzkript variánsok pontos nukleotid szekvenciájának ismeretében tervezzük vizsgálni a transzkript variánsokról történő transláció mértékét. Amennyiben sikerül ezen új LHRH-R-I transzkript variánsokról translációt igazolni, ligand kötési tanulmányokat tervezük a transzlálódó LHRH-R-I izoformok funkcióképességének vizsgálatára.

Tervezzük a Miami Egyetem Patológiai Intézetével kialakult kollaboráció folytatását, melynek során mérni kívánjuk a vizsgált BPH szövetmintában a humán LHRH-R-I mRNA szintű expresszióját a saját tervezésű LHRH-R-I F1'/R2' és a 2. és 3. exonra tervezett LHRH-R-I F2/R3 primerpárokkal is. Valamint immunhisztokémiai módszerrel a humán LHRH-R-I-re specifikus monoklonális antitesttel vizsgálni szeretnénk, hogy a funkcionálisan vizsgált 20 BPH mintában a hipofizeális 7 TM-mel rendelkező LHRH-R-I expressziója igazolható-e, vagy a ligandkötési assay során pozitív 18 BPH mintában a funkcióképességért azaz a ligandkötésért valamely LHRH-R-I izoform a felelős.

Nem tisztázott, hogy a humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor transzkript variánsoknak milyen fiziológiás illetve patológiás szerepe lehet. Azonban amennyiben malignus illetve benignus betegségek során a hipofizeális 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor valamely transzkript variánsának

az expressziója megnő, illetve erről a transzkript variánsról transláció történik, ez lehetőséget teremthet új farmakonok tervezésére, mely célzottan fejtheti ki hatását a benignus illetve malignus szövetekben expresszálódó 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor izoformokra.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Bernadett Rózsa, Mehrdad Nadji, Andrew V. Schally, Balázs Dezső, Tibor Flaskó, György Tóth, Melinda Mile, Norman L. Block, Gábor Halmos. Receptors for Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) in BPH as potential molecular targets for therapy with LHRH antagonist Cetrorelix

2010 The Prostate (*accepted, Article first published online: 21 SEP 2010*). **IF: 3,08**

Bernadett Rózsa, Aliz Juhász, Andrea Treszl, György Tóth, Tibor Flaskó, Balázs Dezső, Norman L. Block, Andrew V. Schally, Gábor Halmos. Expression of mRNA for human type-I LHRH receptor transcript forms and LHRH-I ligand in human benign prostatic hyperplasia

2009 International Journal of Oncology **35** 1053-1059. **IF:2,295**

Bernadett Rózsa, Aliz Juhasz, György Tóth, Tibor Flaskó, Csaba Tóth, Balázs Dezső and Halmos Gábor. Expression of mRNA for Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) and LHRH receptor splice variants in human prostate and testicular cancers and in benign prostatic hyperplasia

2009 Acta Physiologica Hungarica **96 (1):**120-121 **IF: 0,48**

Kertész István, Pótári Norbert, Jószai István, Semjéni Mariann, **Rózsa Bernadett**, Galuska László, Halmos Gábor. The development of an 18F-labeled luteinising hormone-releasing hormone receptor targeting peptide ligand series

2009 Acta Physiologica Hungarica **96 (1):**90-91 **IF: 0,48**

Juergen Engel, **Bernadett Rózsa**, Andrew V Schally, Balázs Dezső, György Tóth, Tibor Flaskó, Mehrdad Nadji and Gábor Halmos. Luteinizing hormone–releasing hormone (LHRH) receptors in BPH as potential molecular targets for therapy with Cetrorelix.

2008 The Journal of Urology **179**:449-450.

IF: 4,016

Egyéb közlemények

Bernadett Rózsa, András Gyetvai, Melinda Mile, Kálmán Tóth and Gábor Halmos. Expression of mRNA for three bombesin/gastrin-releasing peptide receptor subtypes in human connective tissue sarcomas

2009 Acta Physiologica Hungarica **96 (1)**:119-120

IF: 0,48

Anna Molnár, **Bernadett Rózsa**, Melinda Mile, István Szegedi, Csongor Kiss and Gábor Halmos. Expression of somatostatin receptors in childhood tumors and other malignancies

2009 Acta Physiologica Hungarica **96 (1)**:106-107.

IF: 0,48

Katayoun Djazayeri, Zoltán Szilvássy, Klára Benkő, B, **Bernadett Rózsa**, A.József Szentmiklósi, Ilona Benkő. Effect of rosiglitazone, an insulin sensitizer, on myelotoxicity caused by repeated doses of 5-fluorouracil.

2006 Pharmacological Research **53**:156-161.

IF: 2,42

Ilona Benkő , Katayoun Djazayeri, **Bernadett Rózsa**, Zsuzsanna Kovács, Zoltán Dinya, A.József Szentmiklósi. Protective effects of fruit extract with high polyphenol content against doxorubicin-induced myelotoxicity.

2004 Fundamental and Clinical Pharmacology **18**. S1, 89.

IF: 1,052

Összesített impakt faktor: 15,438

A disszertáció témájához kapcsolódó, fel nem használt magyar nyelvű publikációk:

Rózsa Bernadett, Tóth György, Tóth Csaba, Flaskó Tibor, Dezso Balázs, Halmos Gábor. Luteinizáló hormon-releasing hormon receptorok expressziója humán prosztata karcinóma és benignus prosztata hiperplázia mintákban.

2007 Hungarian Oncology **51éfv./4. szám** 389

Rózsa Bernadett, Tóth György, Flaskó Tibor, Tóth Csaba, Juhász Aliz, Dezső Balázs, és Halmos Gábor. Luteinizáló hormon-releasing hormon receptor-I (LHRH-R-I) splice variánsok és a Luteinizáló hormon-releasing hormon-I (LHRH-I) expressziója humán benignus prosztata hiperpláziában

2009. október Magyar Urológia

Tóth György, Semjéni Mariann, **Rózsa Bernadett**, Tóth Csaba, Flaskó Tibor, Dezső Balázs és Halmos Gábor. Luteinizáló hormon-releasing hormon receptor-I (LHRH-R-I) splice variánsok és a Luteinizáló hormon-releasing hormon-I (LHRH-I) expressziója humán hólyag tumorokban

2009. október Magyar Urológia

A disszertáció témájához nem kapcsolódó egyéb magyar nyelvű publikációk:

Vámos Zoltán , Cséplő Péter, Tóth Péter, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Koller Ákos. Differences in Angiotensin I- and II-induced responses of isolated carotid arteries. Role of ACE and AT1 receptors

2009 Érbetegségek **16.évf./2.szám** 55.

Tóth Péter, Vámos Zoltán, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Komoly Sámuel , Koller Ákos. Flow/Shear stress-induced constrictions of rat middle cerebral artery

2009 Érbetegségek **16.évf./2.szám** 55.

Rózsa Bernadett, Bagi Zsolt, Vámos Zoltán, Tóth Péter, Koller Ákos. Az angiotenzin II receptor 1 (AT1R) funkcionális dinamikája hipertóniában és diabetes mellitusban (DM). Saját adatok és irodalmi összefoglaló.

2009. november Hypertonia és Nephrológia

Vámos Zoltán, Tóth Péter, Cséplő Péter, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Koller Ákos. Az öregedés hatása a carotis artériák angiotenzinogén, angiotenzin-I és angiotenzin-II-re adott vazomotor válaszaira. Az AT1 receptorok feltételezett szerepe

2009. november Hypertonia és Nephrológia

A disszertáció témájához kapcsolódó konferenciák és poszterek:

Rózsa Bernadett, Juhász Aliz, Dezső Balázs, Tóth György, Flaskó Tibor, Klekner Álmos, Mezey Géza, Bognár László, Molnár Anna, Kiss Csongor, Gyetvai András és Halmos Gábor. Gonadotropin hormon-releasing hormon-I (GnRH-I), Gonadotropin hormon-releasing hormon receptor-I (GnRHR-I) és splice variánsainak expressziója humán benignus és malignus szövetekben

Magyar Onkológusok Társasága XXVIII. Kongresszusa

2009. november 12-14. Budapest

Molnár Anna, **Rózsa Bernadett**, Szegedi István, Kiss Csongor, Halmos Gábor. Vazoaktív intestinális peptid receptorok kifejeződése gyermekkori vérképzőszervi malignus betegségekben és szolid tumorokban

Magyar Onkológusok Társasága XXVIII. Kongresszusa

2009. november 12-14. Budapest

Rózsa Bernadett, Tóth György, Flaskó Tibor, Tóth Csaba, Juhász Aliz, Dezső Balázs, és Halmos Gábor. Luteinizáló hormon-releasing hormon receptor-I (LHRH-R-I) splice

variánsok és a Luteinizáló hormon–releasing hormon–I (LHRH–I) expressziója humán benignus prosztatata hiperpláziában

Magyar Urológusok Társaságának 2009. évi Kongresszusa

2009. október 01-03. Keszthely

Tóth György, Semjéni Mariann, **Rózsa Bernadett**, Tóth Csaba, Flaskó Tibor, Dezső Balázs és Halmos Gábor. Luteinizáló hormon–releasing hormon receptor–I (LHRH–RvI) splice variánsok és a Luteinizáló hormon–releasing hormon–I (LHRH–I) expressziója humán hólyag tumorokban

Magyar Urológusok Társaságának 2009. évi Kongresszusa

2009. október 01-03. Keszthely

Norbert Pótári, István Kertész, Melinda Mile, **Bernadett Rózsa**, László Galuska and Gábor Halmos. F-fluoro-deoxyglucose, a putative prosthetic group for peptide labeling

Seventh International Conference on Nuclear and Radiochemistry

24-29 August 2009 Budapest

István Kertész, János Gardi, Mariann Semjéni, **Bernadett Rózsa**, László Galuska and Gábor Halmos. The synthesis of ¹⁸F- labeled Luteinising hormone–releasing hormone receptor targeting peptide ligand

Seventh International Conference on Nuclear and Radiochemistry

24-29 August 2009 Budapest

Kertész István, Pótári Norbert, Józai István, Semjéni Mariann, **Rózsa Bernadett**, Galuska lászló és Halmos Gábor. Tumorokban expresszáldó Luteinizáló hormon–releasing hormon receptorokhoz kötődő PET radiofarmakon sorozat fejlesztése

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése

2008. június 4-6. Debrecen

Rózsa Bernadett, Gyetvai András, Mile Melinda, Tóth Kálmán és Halmos Gábor. Gastrin–releasing peptid receptorok expressziója humán végtagokon kialakult kötőszöveti sarcomákban

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése

2008. június 4-6. Debrecen

Rózsa Bernadett, Juhász Aliz, Tóth György, Flaskó Tibor, Tóth Csaba, Dezső Balázs és Halmos Gábor. Luteinizáló hormon–releasing hormon receptor–I (LHRH–R–I) splice variánsok és a Luteinizáló hormon–releasing hormon–I (LHRH–I) expressziója humán urogenitális daganatokban.

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése

2008. június 4-6. Debrecen

Molnár Anna, **Rózsa Bernadett**, Mile Melinda, Szegedi István, Kiss Csongor és Halmos Gábor. Szomatosztatin receptorok vizsgálata gyermekkori rosszindulatú daganatokban

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése Debrecen, 2008. június 4-6

2008. június 4-6. Debrecen

Juergen Engel, **Bernadett Rózsa**, Andrew V Schally, Balázs Dezső, György Tóth, Tibor Flaskó, Mehrdad Nadji and Gábor Halmos. Luteinizing hormone–releasing hormone (LHRH) receptors in BPH as potential molecular targets for therapy with Cetrorelix.

American Urological Association (AUA) Annual Meeting 17-22 May 2008 Orlando, Florida USA

Gabor Halmos, **Bernadett Rozsa**, Mehrdad Nadji, Balazs Dezso, Tibor Flasko, Gyorgy Toth, Mariann Semjeni, Norman L. Block and Andrew V. Schally. Receptors for Luteinizing hormone–releasing hormone (LHRH) in benign prostatic hyperplasia (BPH)

as potential molecular targets for therapy with LHRH antagonist Cetrorelix. Miami VA Research Awareness Day Poster Session, T.C. Dougherty Auditorium

May 13, 2008

Rózsa Bernadett, Tóth György, Tóth Csaba, Flaskó Tibor, Dezso Balázs és Halmos Gábor. Luteinizáló hormon–releasing hormon receptorok expressziója humán prosztata karcinóma és benignus prosztata hiperplázia mintákban

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság IX. Kongresszusa

2007. november 29-december 01. Debrecen

Rózsa Bernadett, Tóth György, Tóth Csaba, Flaskó Tibor, Dezso Balázs és Halmos Gábor. Luteinizáló hormon-releasing hormon receptorok expressziója humán prosztata karcinóma és benignus prosztata hiperplázia mintákban

Magyar Onkológusok Társasága XXVII. Jubileumi Kongresszusa

2007 Hungarian Oncology 51éfv./4.szám 389

Rózsa Bernadett, Tóth György, Tóth Csaba, Flaskó Tibor, Dezso Balázs és Halmos Gábor. Luteinizáló hormon–releasing hormon receptorok expressziója humán prosztata karcinóma és benignus prosztata hiperplázia mintákban

Magyar Onkológusok Társasága XXVII. Jubileumi Kongresszusa

2007. november 8-10. Budapest

Huga Sándor, Treszl Andrea, **Rózsa Bernadett** és Halmos Gábor. Bombesin/Gastrin–realising peptid receptorok, mint molekuláris célpontok az endometrium karcinóma kezelésében

Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság „Gyógyszerkutató Szimpózium”

2006. december 1-2. Debrecen

Mile Melinda, Treszl Andrea, Juhász Aliz, Huga Sándor, **Rózsa Bernadett**, Buglyó Ármin és Halmos Gábor. Endometrium karcinómák célzott terápiájának lehetősége szomatostatin receptorokon keresztül

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság VIII. Kongresszusa

2006. december 14-16. Debrecen

A disszertáció témájához nem kapcsolódó egyéb konferenciák és poszterek:

Rózsa Bernadett, Bagi Zsolt, Vámos Zoltán, Tóth Péter, Koller Ákos. Az angiotenzin II receptor 1 (AT1R) funkcionális dinamikája hipertóniában és diabetes mellitusban (DM). Saját adatok és irodalmi összefoglaló.

Fiatál hypertonológusok IV. Fóruma

2009.szeptember 25-27. Hajdúszoboszló

Vámos Zoltán, Tóth Péter, Cséplő Péter, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Koller Ákos. Az öregedés hatása a carotis artériák angiotenzinogén, angiotenzin-I és angiotenzin-II-re adott vazomotor válaszaira. Az AT1 receptorok feltételezett szerepe

Fiatál hypertonológusok IV. Fóruma

2009.szeptember 25-27. Hajdúszoboszló

Vámos Zoltán, Tóth Péter, Cséplő Péter, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Koller Ákos. Az öregedés hatása a carotis artériák angiotenzinogén, angiotenzin-I és angiotenzin-II-re adott vazomotor válaszaira. Az AT1 receptorok feltételezett szerepe

Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése

2009. augusztus 27-29. Budapest

Vámos Zoltán, Cséplő Péter, Tóth Péter, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Koller Ákos. Differences in Angiotensin I- and II-induced responses of isolated carotid arteries. Role of ACE and AT1 receptors

6. Magyar Mikrokeringés Kongresszus

2009. Május 22-23. Balatonfüred

Tóth Péter, Vámos Zoltán, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Komoly Sámuel, Koller Ákos. Flow/Shear stress-induced constrictions of rat middle cerebral artery

6. Magyar Mikrokeringés Kongresszus

2009. Május 22-23. Balatonfüred

Vámos Zoltán, Cséplő Péter, Tóth Péter, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Koller Ákos. Differences in Angiotensin I- and II-induced responses of isolated carotid arteries. Role of ACE and AT1 receptors

Works and Views in Endothelium-Dependent Vasodilation Conference Iasi

13-14 May 2009 Romania

Tóth Péter, Vámos Zoltán, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Komoly Sámuel, Koller Ákos. Flow/Shear stress-induced constrictions of rat middle cerebral artery

Works and Views in Endothelium-Dependent Vasodilation Conference Iasi

13-14 May 2009 Romania

Ilona Benkő, Katayoun Djazayeri, **Bernadett Rózsa**, Zsuzsanna Kovács, Zoltán Dinya and A.József Szentmiklósi. Protective effects of fruit extract with high polyphenol content against doxorubicin-induced myelotoxicity. EPHAR

July 14-17., 2004 Portugália, Porto

Bernadett Rózsa, Boglárka Szabó, Katayoun Djazayeri, Tünde Erdélyi, Zsolt Szoby, Zoltán Dinya, József Szentmiklósi and Ilona Benkő. Protective effects of fruit extract with high polyphenol content against doxorubicin induced myelotoxicity in vivo.

Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság (MMPET) II. Nemzetközi Kongresszusa.

2005.április 1-3. Pécs