

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az I-es típusú luteinizáló hormon-releasing hormon
(LH-RH-I) receptor és a 3-as, 4-es kromoszóma
elváltozásainak vizsgálata humán uveális
melanomában**

Dr. Sipos Éva

Témavezető: Prof. Dr. Halmos Gábor



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2018

Az I-es típusú luteinizáló hormon-releasing hormon (LH-RH-I) receptor és a 3-as, 4-es kromoszóma elváltozásainak vizsgálata humán uveális melanómában

értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

írta: Dr. Sipos Éva okleveles gyógyszerész

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

Témavezető: Prof. Dr. Halmos Gábor, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

tagok: Dr. Zupkó István, PhD

Dr. Szatmári István, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem, GYTK Gyógyszerhatástani Tanszék könyvtára

2018. június 7. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Pongrácz Judit Erzsébet, az MTA doktora

Dr. Fodor Mariann, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Pongrácz Judit Erzsébet, az MTA doktora

Dr. Fodor Mariann, PhD

Dr. Szatmári István, PhD

Dr. Zupkó István, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tantermében

2018. június 7. 13 óra

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	5
2	Célkitűzés.....	7
3	Anyagok és módszerek	8
3.1	Sejtvonalak	8
3.2	Állatok	8
3.3	Vizsgált minták	9
3.4	RNS izolálás, reverz transzkripció és kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR).....	9
3.5	Immuncitokémia	10
3.5.1	Immunperoxidáz jelölés	10
3.5.2	Immunfluoreszcens jelölés	10
3.6	Western blot	11
3.7	Membránpreparálás és ligand kötési assay.....	11
3.8	Fluoreszcencia <i>in situ</i> hibridizáció	12
3.8.1	Lenyomat preparátumok készítése	12
3.8.2	DNS-szondák.....	13
3.8.3	FISH hibridizáció	13
3.8.4	Fluoreszcens mikroszkópia	13
3.8.5	FISH analízis	14
3.9	Statisztikai analízis.....	14
4	Eredmények	16

4.1	Az 1-es típusú LH-RH receptor expresszója human uveális melanomában <i>in vitro</i>	16
4.2	Az 1-es típusú LH-RH receptor expresszója human uveális melanoma xenograft modellekben	16
4.3	Az LH-RH ligand expressziója human uveális melanoma sejtekben és xenograft modellekben	17
4.4	Ligand kötési assay eredmények	17
4.5	Korreláció az LH-RH-I receptor és ligand mRNS expressziós eredmények alapján.....	18
4.6	A 3-as kromoszóma megoszlása	18
4.7	A 4-es kromoszóma megoszlása	19
4.8	Statisztikai analízis	19
5	Összefoglalás	21
6	Köszönetnyilvánítás	23

1 Bevezetés

Az uveális melanoma bár ritka daganat, a szem leggyakoribb primer rosszindulatú elváltozása. Statisztikai adatok szerint évente 1.000.000 főből 7 beteg hal meg ebben a betegségben. Életkori megoszlásának csúcsa 40 és 60 év közé esik.

A tumor prognózisa és elhelyezkedése között összefüggést figyelhetünk meg. Legrosszabb prognózissal a corpus ciliare daganatai, míg legjobbal az iris melanomák rendelkeznek. Legegyértelműbb az iris melanomák felismerése, még kis méret esetén is, így a diagnózis felállítása is ebben az esetben a legegyszerűbb. A szövettani vizsgálatok alapján a hasonló klinikai képet adó uveális melanomák 3 osztályba sorolhatók: epitheloid sejtes, orsósejtes-A/B és kevert típusú.

Uveális melanomában a legjellemzőbb kromoszóma eltérés a 3-as kromoszóma egyik kópiájának elvesztése, mely az esetek 50%-ában jelenik meg és erősen korrelál a metasztázisok kialakulásával. A 8-as kromoszóma hosszú karjának többlete (+8q) az esetek 40%-ában jelenik meg független prognosztikai markerként. Ritkábban megfigyelhető a 11q23-q25 régió elvesztése, az 1-es, 7-es, 9-es, 10-es és 16-os kromoszóma érintettsége.

A hipofízis elülső lebenyének hormon-elválasztását szabályozó hipotalamikus ún. releasing és inhibiting hormonok bizonyítottan befolyásolják különböző humán daganatok növekedését. Amellett, hogy ezen receptorokon keresztül az agonista és antagonistá hatású releasing és inhibiting hormon analógok a tumorsejtekre receptor

mediált módon, közvetlenül is gátló hatással lehetnek, a peptid hormon analógokhoz citotoxikus hatóanyagot vagy radiofarmakont kapcsolva célzottabb daganatterápia valósítható meg, csökkentve ezzel a potenciális mellékhatásokat és fokozva a kezelés hatékonyságát. Ígéretes célpontnak tűnnek a peptidhormon-receptorok, köztük a luteinizáló hormon-releasing hormon (LH-RH) receptorai is. Annak ellenére, hogy ismereteink az LH-RH receptorok expressziós mintázatáról és farmakológiájáról bővülnek, patofiziológiai jellemzőik és a humán daganatokban betöltött szerepük még nem teljesen tisztázott.

Korábbi vizsgálataink során az uveális melanomák jelentős részében, 46 %-ban detektáltuk az I-es típusú Luteinizáló Hormon-Releasing Hormon (LH-RH) receptorát. Az LH-RH receptor génje a 4-es kromoszómán a 4q21.2 régióban helyezkedik el. A 4-es kromoszóma rendellenessége figyelhető meg például glioblastoma multiforme, tüdő adenokarcinóma, és kissejtes tüdőrák esetén, azonban ezen kromoszóma szerepéről az uveális melanoma kialakulásában és prognózisában nem áll rendelkezésre irodalmi adat.

2 Célkitűzés

Kísérleteinkben célul tűztük ki az LH-RH ligand és a receptor mRNS szintű kimutatását OCM-1 és OCM-3 sejtvonalakban. A receptor fehérje jelenlétét immuncitokémiával és Western blottal, funkcióképességét és kötési karakterisztikáit ligand kötési assay-vel is megvizsgáltuk. Az LH-RH-I receptor mRNS és fehérje szintű expresszióját OCM-1 és OCM-3 egér xenograft modelleken is tanulmányoztuk.

Az LH-RH receptor génje a 4-es kromoszómán a 4q21.2 régióban helyezkedik el. Ezért további célkitűzésként 46 db enucleációból származó UM szövetmintán egyidejűleg tanulmányoztuk a 3-as és 4-es kromoszóma alterációit centroméra-specifikus szondákkal. Mintánként megállapítottuk a domináns sejtpopulációkat és kromoszóma indexeket. Tanulmányoztuk az azonos mintákból származó 3-as és 4-es kromoszóma indexek közötti összefüggéseket. Valamint a kapott kromoszóma indexek és a betegek túlélése alapján csoportokat képeztünk és vizsgáltuk lehetséges kapcsolatukat az LH-RH-I receptor expressziójával.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Sejtvonalak

Az OCM-1 és OCM-3 sejteket RPMI 1640 tápfolyadékban tenyésztettük, amely 10%-os FBS-t, 1% L-glutamint és 1% antibiotikumot tartalmazott. 5% CO₂-ot tartalmazó párás közegben 37 °C-on inkubáltuk.

3.2 Állatok

A kísérletekhez csupasz, csecsemőmirigy nélküli, immun-deficiens egereket (Athmic nude mice, Ncr nu/nu) használtunk (Charles River Laboratories, Germany). Minden állat esetében a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság irányelveit tartottuk szem előtt a vonatkozó Európai Uniós-és a „Principles of Laboratory Animal Care” és a „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” előírásaival összhangban. Az állatokat steril körülmények között tartottuk, 12 órás fény/sötét ciklusban; és steril rágszálótápot és vizet kaptak *ad libitum*. 6 millió tumor sejtet injektáltunk subcutan az egerek femoralis régiójába. 4 hét múlva, amikor a tumorok kifejlődtek, aszeptikus körülmények között a daganatokat eltávolítottuk, majd a tumor darabokat (~3 mm³) további állatokba oltottuk. A kísérlet végén az állatokat 3%-os izoflurán narkózissal és érzéstelenítéses túlaltatással leöltük. A tumort eltávolítottuk és szövettani vizsgálat után feldolgozásig -80°C-on tároltuk.

3.3 Vizsgált minták

Vizsgálatainkhoz enucleatio során eltávolított 46 humán uveális melanoma szövetmintát használtunk fel, amelyek a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Szemklinikájáról származtak. A szövetminták molekuláris biológiai vizsgálatát az Intézményi Kutatásetikai Bizottság jóváhagyásával végeztük. Pozitív kontrollként normál limfocita preparátumot használtunk, melyet a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Pathológiai Intézete bocsátott rendelkezésünkre. Szövetmintáinkat feldolgozásig -80°C -on tároltuk.

3.4 RNS izolálás, reverz transzkripció és kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

Totál RNS izolálás Nucleospin RNA and Protein purification kit (Macherey-Nagel, Germany) segítségével történt a gyártó által javasolt protokoll alapján. A reverz transzkripciót 2000 ng RNS átírásával Tetra cDNA synthesis kit (Bioline, UK) segítségével végeztük. A kvantitatív PCR, LH-RH-I receptor és LH-RH ligand specifikus primerekkel, valamint MyiQ2 real time PCR (BIO-RAD, USA) készülékkel történt. A transzkriptumok kvantifikálására $2^{40-\text{Ct}}$ módszert használtunk, az értékeket HPRT1 (hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz1) transzkriptumra normalizáltuk.

3.5 Immuncitokémia

3.5.1 Immunperoxidáz jelölés

A sejtek permeabilizálását és az aspecifikus kötőhelyek blokkolását az elsődleges antitestekkel történő inkubáció követte. A rabbit anti-human LH-RH-R (FL328, sc-13944 Santa Cruz, USA) antitestet 1:50 arányú hígításban alkalmaztuk. Szekunder antitestként EnVision FLEX /HRP (Agilent Technologies, USA) használtunk. Az előhívás mikroszkópos ellenőrzés mellett DAB Substrate puffer+Chromogen (Agilent Technologies, USA) segítségével történt.

3.5.2 Immunfluoreszcens jelölés

A sejtek permeabilizálását és az aspecifikus kötőhelyek blokkolását az elsődleges antitestekkel történő inkubáció követte. A rabbit anti-human LH-RH-R (FL328, sc-13944 Santa Cruz, USA) antitestet 1:50 arányú hígításban alkalmaztuk. Szekunder antitestként anti-rabbit FITC antitestet (ThermoFisher Scientific, USA, 1:1000) használtunk. A sejtmagokat antifade-ben oldott diamino-fenilindollal (DAPI) festettük meg (Molecular probes, USA). Az eredményeket Olympus FV-1000 konfokális mikroszkóppal (Olympus Corporation, Japan) értékeltük ki.

3.6 Western blot

A sejtvonalakból izolált fehérjét 12%-os poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) szeparáltuk, majd 0,2 μ m PVDF membránra transzferáltuk. A membránok blokkolását az elsődleges antitesttel való inkubáció követte. A rabbit anti-human LH-RH-R antitestet (FL328, sc-13944 Santa Cruz, USA) 1:200, az anti-human GAPDH antitestet (D16H11) 1:1000 arányú hígításban alkalmaztuk. Szekunder antitestként anti-rabbit HRP (mouse sc-2357 Santa Cruz, USA) használtunk. Az előhívás Luminata Forte Western HRP szubsztrát (Merck Millipore, Germany) segítségével történt. A fehérje szignálokat Image Lab software (Bio-Rad Laboratories, USA) segítségével kvantifikáltunk.

3.7 Membránpreparálás és ligand kötési assay

Ligand kötési vizsgálatainkhoz a radioaktívan jódozott LH-RH analógot ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LH-RH) chloramine-T módszerrel állítottuk elő és reverz fázisú HPLC-vel (High performance/pressure liquid chromatography nagy teljesítményű folyadékkromatográfia) tisztítottuk. Direkt leszorítási un. ligand kompetíciós vizsgálatok során radioaktívan jelölt LH RH liganddal ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) mértük a membránfrakciók ligand kötési tulajdonságait. 150 μ l végtérfogatú elegyben (50-60 μ g fehérjekoncentráció) található receptorkötő helyeket 60- 80000 percenkénti beütésszáma (counts per minute:cpm) $[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LH RH liganddal inkubáltuk. A

radioaktívan jelölt LH RH ligandot a kötési helyekről a jelöletlen LH-RH 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. A szilikon polypropilénnel bevont centrifugacső alján lévő pelletet leválasztottuk és a radioaktivitás detektálásához a percenkénti beütésszámot (cpm) gamma-counter készülékkel mértük. A fehérje koncentrációját Bradford módszerrel határoztuk meg Bio–Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, USA) segítségével a gyártó leírásainak megfelelően. Az inkubációt, majd a kötött és szabad frakció elválasztását követően a mért radioaktivitásokból a Ligand-PC szoftver segítségével határoztuk meg a receptorok affinitását és koncentrációját.

3.8 Fluoreszcencia *in situ* hibridizáció

3.8.1 Lenyomat preparátumok készítése

A szövetmintánkat -80°C-ról -20°C-ra fagyasztóba tettük, majd a tumorok felszínét egy csipesz segítségével szilanzált tárgylemezhez érintettük. A fixálást metanol:ecetsav 3:1 arányú elegyében végeztük. A lemezeket szárítás után 70%-os ecetsav oldatban és desztillált vízben mostuk, végül emelkedő koncentrációjú (70%, 80%, 90%) etanol sorozattal dehidráltuk, majd levegőn szárítottuk. A kész tárgylemezeket felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.8.2 DNS-szondák

Használt szondáink a 3-as és 4-es kromoszómára specifikus, gyári FISH szondák voltak (CEP Chromosome Enumeration DNA FISH Probes, Vysis, Németország). A hibridizációs elegy 1-1 µl DNS FISH szondát, 7 µl hibridizációs puffert (dextrán-szulfát, formamid, 2xSSC) és 1 µl desztillált vizet tartalmazott.

3.8.3 FISH hibridizáció

A FISH hibridizációt standard protokoll alapján végeztük, kisebb módosításokkal. A tárgylemezen rögzített, fixált sejtmagokat és a lenyomat preparátumokat metanol:ecetsav (3:1 arányú) elegyében fixáltuk -20°C -on 10 percre, majd proteáz kezelésnek vetettük alá, melyhez 15 µl 10 %-os pepszint oldottunk 100 µl 1 M HCl-ban. Lemezeinket 1xPBS pufferrel mostuk, végül emelkedő koncentrációjú (70%, 85%, 100%) etanol sorozattal dehidráltunk, majd levegőn szárítottuk. Ezután a szonda felcseppentése következett, amit a lemezek fedése és a szélek izolálása követett. A denaturálást 75°C -on 5 percre végeztük, a hibridizáció pedig nedves kamrában ment végbe 37°C -on egy éjszakán át. A nem kötődött szondákat másnap mosással távolítottuk el, melyhez 50% formamid/2xSSC oldatot (42°C , 7 perc) és 2xSSC oldatot (42°C , 2x7 perc) használtunk. A sejtmagokat antifade-ben oldott diamino-fenilindollal (DAPI) festettük meg (Molecular probes, USA).

3.8.4 Fluoreszcens mikroszkópia

A FISH hibridizáció eredményeit Leica epifluoreszcens mikroszkóppal értékeltük ki. Megfelelő optikai szűrők alkalmazásával tudtuk a gerjesztő fény hullámhosszát megválasztani. Fluoreszcens fotók rögzítésére ISIS digitális képanalizáló szoftvert használtunk (Metasystems, Németország). Pozitív kontrollként perifériás vérből készült normál limfocita preparátumot használtunk.

3.8.5 FISH analízis

A vizsgált kromoszómák megoszlásának jellemzésére két mutatót használtunk: 1) az egyik a kromoszóma-index, 2) a másik pedig az adott kromoszómára jellemző domináns sejtpopuláció. A kromoszóma-index az adott mintában jelenlevő össz FISH-szignál és a mintában számolt sejtmagok számának hányadosa. Vizsgálatainkban egy mintánál akkor határoztunk meg kromoszóma-vesztést, ha a kromoszóma-index 1,75 alatti volt, míg 2,25 feletti kromoszóma-index esetén kromoszóma többletről beszélünk. Dominánsnak akkor tekintettünk egy sejtpopulációt, ha jelenléte a vizsgált sejtmagok több mint 15%-ára jellemző volt.

3.9 Statisztikai analízis

Az LH-RH-I receptor és LH-RH ligand mRNS expressziók közötti összefüggéseket GraphPad Prism 7 program (USA) segítségével, Pearson korreláció analízissel végeztük.

Az uveális melanoma mintákból meghatároztuk a 3-as és a 4-es kromoszóma indexeket. A csoportok eloszlásának normalitását

D'Agostino-Pearson-féle omnibusz teszttel vizsgáltuk, majd az ugyanazon mintákból származó 3-as és a 4-es kromoszóma indexek kapcsolatát Spearman-féle korrelációval elemeztük. A betegek túlélését Kaplan-Meier-féle túlélés analízissel vizsgáltuk. A statisztikai analízist GraphPad Prism 7 (USA) szoftverrel végeztük.

4 Eredmények

4.1 Az 1-es típusú LH-RH receptor expresszója human uveális melanomában *in vitro*

Az qPCR eredményeink alapján mind OCM-1 és OCM-3 sejtvonalak esetén is detektáltuk mRNS szinten az LH-RH-I receptorát. Azonban OCM-3 sejtek esetén magasabb mRNS expresszió volt megfigyelhető, mint OCM-1 sejtek esetén. Western blot vizsgálataink alapján a receptor fehérje kimutatható volt OCM-1 és OCM-3 sejtvonalak vizsgálata során is. mRNS expressziós eredményeinknek megfelelően az LH-RH-I receptor fehérje magasabb expressziója volt megfigyelhető mind Western blot, mind immuncitokémiai vizsgálataink során.

4.2 Az 1-es típusú LH-RH receptor expresszója human uveális melanoma xenograft modellekben

A qPCR vizsgálataink során kapott eredményeink alapján mindkét xenograft modell esetén detektáltuk az LH-RH-I receptorát mRNS szinten. Az *in vitro* eredményeknek megfelelően, OCM-3 sejtek esetén magasabb mRNS expresszió volt megfigyelhető, mint OCM-1 sejtek esetén. Western blot vizsgálataink alapján a receptor fehérje szintén kimutatható volt az OCM-1 és OCM-3 sejtvonalakból származó szövetminták vizsgálata során is. Hasonlóan az *in vitro*

eredményeinkhez az LH-RH-I receptor fehérje magasabb expressziója volt megfigyelhető OCM-3 modell esetén.

4.3 Az LH-RH ligand expressziója human uveális melanoma sejtekben és xenograft modellekben

Kiegészítve LH-RH receptor vizsgálatainkat, az LH-RH ligand mRNS expresszióját is megvizsgáltuk mind sejtvonalaink mind xenograft modelleink esetén. qPCR eredményeink alapján az LH-RH ligand mRNS expressziója OCM-1 sejtek esetén volt magasabb összehasonlítva az OCM-3 sejtek magasabb LH-RH-I receptor mRNS expressziójával.

4.4 Ligand kötési assay eredmények

A ligand kötési assay során a radioaktívan jelölt LH-RH ligand ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LH-RH) és a jelöletlen LH-RH ligand kompetíciós tulajdonságait vizsgáltuk az uveális melanoma sejtek membránfrakcióiban. A ligand kötési assayvel kapott eredményeink mindkét uveális melanoma modell esetén specifikus, nagy affinitású LH-RH-I receptorok jelenlétét igazolták. Az OCM-1 és OCM-3 sejtek K_d értéke 4.11 ± 0.3 nM és 4.26 ± 0.6 nM volt. OCM-3 sejtek esetén lényegesen magasabb receptor koncentráció volt mérhető (1029.1 ± 68.5 fmol/mg membránprotein), mint OCM-1 sejtekben (233.6 ± 21.7 fmol/mg membránprotein). Nagy affinitású LH-RH-I receptorok jelenlétét uveális melanoma xenograft modelleinkben is

igazolni tudtuk. Az OCM-1 modell K_d értéke 5.85 ± 0.7 nM, míg az OCM-3 model K_d értéke 6.18 ± 0.8 nM volt. Az LH-RH-I receptor fehérje koncentrációk OCM-3 xenograftoknál 2.7-szer magasabbak (713.0 ± 29.4 fmol/mg membránprotein) voltak mint az OCM-1 modell esetében (267.3 ± 38.5 fmol/mg membránprotein). A radioaktívan jelölt LHRH ligand ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]\text{LH-RH}$) kötődése reverzibilis, idő-, és hőmérsékletfüggő volt. A ligand kötési kapacitás egyenes arányosságban volt az uveális melanoma minták fehérjekoncentrációival.

4.5 Korreláció az LH-RH-I receptor és ligand mRNS expressziós eredmények alapján

Statisztikai analízisünk alapján szignifikáns korrelációt figyelhattunk meg az LH-RH-I receptorok és LH-RH ligand mRNS expressziós eredményei között OCM-1 sejtvonalainkban és OCM-1 xenograft modelleinkben (Pearson $r=0.8380$; $p=0.0373$, $CI=0.95$ %). Ezenkívül szignifikáns korrelációt tudtunk kimutatni az LH-RH-I receptor és LH-RH ligand expressziók között OCM-3 sejtekben és OCM-3 UM tumor xenograftokban is (Pearson $r=0.9878$; $p=0.0002$, $CI=0.95$ %).

4.6 A 3-as kromoszóma megoszlása

A 3-as kromoszóma kromoszóma indexe 16 esetben utalt jelentős kromoszóma vesztesre, 6 esetben pedig a 3-as kromoszóma többlete volt megfigyelhető. 24 minta esetében a kromoszóma szám normál

eloszlást mutatott. 26 minta esetében találtunk domináns sejtpopulációként sejtenként 1 szignált, 9 esetben pedig jelen volt egy olyan klón is, ami 3 vagy annál több 3-as kromoszómát tartalmazott sejtenként a sejtmagok több mint 15%-ában. 2 mintánál mind kromoszóma vesztést, mind kromoszóma többletet megfigyeltünk. 13 esetben a mintákat a 3-as kromoszóma tekintetében normálnak, azaz sejtenként 2 kópiát tartalmazónak találtuk. Meg kell jegyeznünk, hogy bár kis százalékban (<15%), de a normálnak tekintett szövetminták is tartalmaztak abnormális sejtpopuláció(ka)t.

4.7 A 4-es kromoszóma megoszlása

A kromoszóma-index 32 esetben utalt jelentős kromoszóma többletre, míg 14 esetben a 4-es kromoszóma normál eloszlást mutatott. 8 minta esetében találtunk domináns sejtpopulációként sejtenként 1 szignált, 41 esetben pedig jelen volt egy olyan klón is, ami 3 vagy annál több 3-as kromoszómát tartalmazott sejtenként a sejtmagok több mint 15%-ában. 6 mintánál mind kromoszóma vesztést, mind kromoszóma többletet megfigyeltünk. 3 esetben a mintákat a 4-es kromoszóma tekintetében normálnak, azaz sejtenként 2 kópiát tartalmazónak találtuk.

4.8 Statisztikai analízis

Statisztikai eredményeink alapján az azonos uveális melanoma mintákból származó 3-as és 4-es kromoszóma indexek között

(Spearman $r = 0,42$; $0,139-0,639$ 95%-os konfidencia intervallum), statisztikailag szignifikáns ($p = 0,0036$) korreláció mutatkozott

A 3-as és 4-es kromoszóma indexek alapján normál (N: $1.75-2.25$) és patológiás (P: <1.75 vagy >2.25) csoportokat képeztünk .

Összehasonlítva a 4 csoport (NN, NP, PN, PP) túlélési adatait mérsékelt különbség volt megfigyelhető az egyes csoportok között ($p=0.38$ the Mantel-Cox test és $p=0.43$ the Gehan-Breslow-Wilcoxon teszt), azonban ez a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. Még a két fő csoport (N, P) túlélése között sem tudtunk szignifikáns különbséget detektálni ($p=0.12$, Mantel-Cox és Gehan-Breslow-Wilcoxon teszt), annak ellenére hogy a túlélési görbék jelentős különbséget mutattak.

Eredményeinket összevetettük 17 mintán korábban elvégzett LH-RH-I receptor expresszióra vonatkozó eredményeinkkel, melynek alapján kijelenthetjük, hogy az LH-RH-I receptor expressziója független a 4-es kromoszóma megoszlásától.

5 Összefoglalás

Korábbi vizsgálataink során az UM-ák jelentős részében (46%) detektáltuk az LH-RH-I receptorát. Az LH-RH-I receptor génje a 4-es kromoszómán helyezkedik el, azonban ezen kromoszóma szerepéről az UM kialakulásában és prognózisában nem áll rendelkezésre irodalmi adat. Kísérleteinkben célul tűztük ki az LH-RH ligand és a receptor mRNS szintű kimutatását OCM-1 és OCM-3 sejtvonalakban. A receptor fehérje jelenlétét immuncitokémiával és Western blottal, funkcióképességét és kötési karakterisztikáit ligand kötési assay-vel is megvizsgáltuk. Az LH-RH-I receptor mRNS és fehérje szintű expresszióját OCM-1 és OCM-3 egér xenograft modelleken is tanulmányoztuk. Ezen kívül 46 db enucleációból származó UM szövetmintán egyidejűleg tanulmányoztuk a 3-as és 4-es kromoszóma alterációit FISH-el, valamint lehetséges kapcsolatukat a minták LH-RH-R-I expressziójával.

Az mRNS expressziós eredményeink alapján az LH-RH-I receptorát sikerült detektáltuk mindkét humán kísérleti sejtvonalon, azonban az OCM-3 sejtek esetén jelentősen magasabb receptor expresszió volt megfigyelhető. Hasonlóan az *in vitro* eredményeinkhez szintén magasabb szintű LH-RH-I receptor expresszió volt kimutatható az UM xenograft *in vivo* modelleinkben is. A receptor fehérje jelenlétét sikerült igazolni immuncitokémia és Western blot technikák segítségével sejtvonalainkban, valamint Western blottal a xenograft modellekből származó szövetmintáinkban. Radioreceptor analitikai eredményeink specifikus nagy affinitású LH-RH-R-I jelenlétét

mutatták mindkét kísérleti modell esetén. Mind OCM-1 és OCM-3 sejtek esetén, mind a tumor szöveteken detektáltuk az LH-RH ligand jelenlétét is. Az általunk vizsgált mintákban a 4-es kromoszóma csak 14 esetben (30 %) volt normál 2 kópiában jelen, 32 esetben (70 %) a 4-es kromoszóma többlete volt kimutatható. A 3-as kromoszóma monoszómiája 16 esetben (35 %) volt megfigyelhető. 6 minta esetében (13%) 3-as kromoszóma többletet, 24 esetben (52 %) pedig normál kromoszóma számot detektáltunk. Eredményeink szerint az azonos uveális melanoma mintákból származó 3-as és 4-es kromoszóma indexek között statisztikailag szignifikáns korreláció mutatkozott. Valamint mérsékelt különbség mutatkozott a különböző patológiai tulajdonságokkal rendelkező UM betegcsoport túlélési idejében. Az általunk vizsgált humán uveális melanomákban azonban az LH-RH receptor expressziója független a 4-es kromoszóma megoszlásától. Eredményeink újabb információkkal szolgálnak ezen igen agresszív daganattípus genetikai hátterének megismeréséhez és a későbbiekben hozzájárulhatnak a betegség prognózisának és LH-RH receptorokon keresztüli célzott terápiájának pontosabb meghatározásához.

6 Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Biofarmácia Tanszék munkatársainak, kiemelten témavezetőmnek, Prof. Dr. Halmos Gábornak, hogy a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Doktori Iskolájának keretein belül lehetővé tette, motiválta és mindenben támogatta munkámat.

Köszönettel tartozom a súlyos betegségben elhunyt Dr. Treszl Andreának, aki bevezetett a fluoreszcens *in situ* hibridizációs módszerek izgalmas világába és munkámat segítette és támogatta. Örökké fog élni emlékezetemben.

Köszönetet mondok kollaborációs partnereinknek, külön megtiszteltetés volt a Nobel díjas Andrew V. Schally-vel közös munkában részt venni.

Ezúton szeretném megköszönni a befektetett energiáját és rengeteg türelmét férjemnek, akinek technikai segítségével nélkül nem született volna meg ez az értekezés, valamint kisfiamnak Botondnak.

A munka elkészítése az (OTKA) K 81596 (H.G.), TAMOP 4.2.2.A- 11/1/KONV-2012-0025 project (H.G.), TAMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 (H.G.) GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (H.G.), Richter Gedeon Talentum Alapítvány (S.É.), EFOP-3.6.1-16-2016-00022 (S.É.) és Az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának (S.É.) támogatásával készült. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. A tanulmány alapjául szolgáló kutatást az Emberei Erőforrások Minisztériuma által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program támogatta, a Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja keretében.



Nyilvántartási szám: DEENK/60/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sipos Éva
Neptun kód: V1LB4Q
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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: <https://doi.org/10.2147/OTT.S148174>
IF: 2.612 (2016)
2. **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: 2.662 (2016)





További közlemények

3. Halász, L., Karányi, Z., Boros-Oláh, B., Kuik-Rózsa, T., **Sipos, É.**, Nagy, É., Mosolygó, Á., Mázió, A., Rajnavölgyi, É., Halmos, G., Székvölgyi, L.: RNA-DNA hybrid (R-loop) immunoprecipitation mapping: an analytical workflow to evaluate inherent biases. *Genome Res.* 27, 1063-1073, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.219394.116>
IF: 11.922 (2016)
4. Szabó, I., Bösze, S., Orbán, E., **Sipos, É.**, Halmos, G., Kovács, M., Mező, G.: Comparative in vitro biological evaluation of daunorubicin containing GnRH-I and GnRH-II conjugates developed for tumor targeting. *J. Pept. Sci.* 21 (5), 426-435, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/psc.2775>
IF: 1.951
5. Hegedűs, R., Manea, M., Orbán, E., Szabó, I., Kiss, É., **Sipos, É.**, Halmos, G., Mező, G.: Enhanced cellular uptake and in vitro antitumor activity of short-chain fatty acid acylated daunorubicin-GnRH-III bioconjugates. *Eur. J. Med. Chem.* 56, 155-165, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.08.014>
IF: 3.499

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,646

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,274

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.

Debrecen, 2018.03.07.



Publikált absztraktok:

Sipos Éva, Fodor Klára, Rózsa Dávid , Treszl Andrea, Schally Andrew, Halmos Gábor: I-es típusú LH-RH receptorok (LH-RH-R) karakterizálása OCM- 1 és OCM-3 humán uvealis melanoma sejtvonalakon

Magyar Onkológia 61: (1)p. 72. Magyar Onkológusok Társasága XXXII. Kongresszusa 2017.11. 16-18. Debrecen

Eva Sipos, Kata Hegyi, Andrea Treszl, Zita Steiber, Klara Fodor, Andrew V. Schally, Gabor Halmos: Concurrence of chromosome 3 and 4 aberrations in human uveal melanoma

Acta Pharmaceutica Hungarica 7th Edition: 3-4. 211. 2017. 10. 5.-7. Balatonfüred

Sipos Éva, Fodor Klára, Rózsa Dávid, Treszl Andrea, Halmos Gábor: I-es típusú LH-RH receptorok (LH-RH-R) mint molekuláris targetek vizsgálata OCM-1 és OCM-3 humán uvealis melanoma sejtvonalakon

Klinikai Onkológia 3:(3) Paper P60. A Magyar Klinikai Onkológiai Társaság IX. Kongresszusa. 2016.11.17 -19 Budapest

Sipos Éva, Dócs Ottó, Steiber Zita, Méhes Gábort, Treszl Andrea, Halmos Gábor: Az FZD6 őssejtmarker vizsgálata humán uvealis melanoma szöveten és sejtvonalakon, Magyar Onkológia 59:(1) p.

64. Magyar Onkológusok Társasága XXXI. Kongresszusa,
2015.11.19-21. Budapest

Sipos Éva, Steiber Zita, Hegyi Katalin, Halmos Gábor, Treszl
Andrea, A 3-as és 4-es kromoszóma aneuploidiajának vizsgálata
uvealis melanomában fluoreszcencia in situ hibridizációval

In: Gyógyszerészet Supplementum: Congressus Pharmaceuticus
Hungaricus XV. p. 100. 2014.04.10-12. Budapest

Zita Steiber, Eva Sipos, Katalin Hegyi, Gabor Halmos, Gabor
Mehes, Andrea Treszl: Aneuploidy of chromosome 3 and 4 in
human uveal melanomas detected by fluorescence in situ
hybridization

INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE
55: p. E-Abstract 6444. (2014)

ARVO. 2014.05.04 -08 Orlando, Amerikai Egyesült Államok

Sipos Éva, Dócs Ottó, Hegyi Katalin, Steiber Zita, Méhes Gábor,
Halmos Gábor, Treszl Andrea:

Az összejt marker FZD6 expressziójának immunhisztokémiai
vizsgálata human uvealis melanomában

Klinikai Onkológia 1. évf. 1. különszám/2014. november

Magyar Klinikai Onkológiai Társaság VIII. Kongresszusa 2014.
november 13-15. Budapest

Sipos Éva, Treszl Andrea, Steiber Zita, Berta András, Halmos Gábor: A 4-es kromoszóma elváltozásainak vizsgálata humán uveális melanómában fluoreszcencia in situ hibridizációval
Magyar Onkológia-Különszám/57.évf., 1.Szuppl.,
Magyar Onkológusok Társasága XXX. Kongresszusa, 2013.
november 14-16., Pécs

Sipos Éva, Treszl Andrea, Steiber Zita, Berta András, Halmos Gábor: A 3-as és 4-es kromoszóma vizsgálata uveális melanómában
Orvostovábbképző Szemle-Különszám, Magyar Klinikai Onkológiai Társaság VII. Kongresszusa, 2012. november 8-10., Budapest

Kongresszusi poszterek:

Sipos Éva, Fodor Klára, Rózsa Dávid, Treszl Andrea, Schally Andrew, Halmos Gábor: I-es típusú LH-RH receptorok (LH-RH-R) karakterizálása OCM- 1 és OCM-3 humán uveális melanoma sejtvonalakon
Magyar Onkológusok Társasága XXXII. Kongresszusa 2017. 11. 16-18., Debrecen

Eva Sipos, Kata Hegyi, Andrea Treszl, Zita Steiber, Klara Fodor, Andrew V. Schally, Gabor Halmos: Concurrence of chromosome 3 and 4 aberrations in human uveal melanoma
7th BBBB 2017. 10. 5.-7. Balatonfüred

Sipos Éva, Fodor Klára, Rózsa Dávid, Treszl Andrea, Halmos Gábor: I-es típusú LH-RH receptorok (LH-RH-R) mint molekuláris targetek vizsgálata OCM-1 és OCM-3 humán uvealis melanoma sejtvonalakon

A Magyar Klinikai Onkológiai Társaság IX. Kongresszusa., 2016.11.17 -.19. Budapest

Sipos Éva, Dócs Ottó, Steiber Zita, Méhes Gábort, Treszl Andrea, Halmos Gábor: Az FZD6 őssejtmarker vizsgálata humán uvealis melanoma szöveten és sejtvonalakon, Magyar Onkológusok Társasága XXXI. 2015.11.19 -.21. Budapest,

Sipos Éva, Steiber Zita, Hegyi Katalin, Halmos Gábor, Treszl Andrea, A 3-as és 4-es kromoszóma aneuploidijának vizsgálata uvealis melanomában fluoreszcencia in situ hibridizációval
Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV. Budapest, 2014.04.10-12.

Zita Steiber, Eva Sipos, Katalin Hegyi, Gabor Halmos, Gabor Mehes, Andrea Treszl: Aneuploidy of chromosome 3 and 4 in human uveal melanomas detected by fluorescence in situ hybridization

ARVO 2014.05.04 08. Orlando, Amerikai Egyesült Államok

Sipos Éva, Treszl Andrea, Steiber Zita, Berta András, Halmos Gábor: A 4-es kromoszóma elváltozásainak vizsgálata humán uveális melanomában fluoreszcencia in situ hibridizációval
Magyar Onkológusok Társasága XXX. Kongresszusa, 2013.
november 14-16., Pécs

Sipos Éva, Treszl Andrea, Steiber Zita, Berta András, Halmos Gábor: A 3-as és 4-es kromoszóma vizsgálata uveális melanomában
Magyar Klinikai Onkológiai Társaság VII. Kongresszusa, 2012.
november 8-10., Budapest

Sipos Éva, Treszl Andrea, Steiber Zita, Berta András, Halmos Gábor: A 3-as és 4-es kromoszóma vizsgálata uveális melanomában
Magyar Klinikai Onkológiai Társaság VII. Kongresszusa, 2012.
november 8-10., Budapest

Treszl Andrea, Steiber Zita, Sipos Éva, Berta András, Halmos Gábor: A 4-es kromoszóma aneuploidijának vizsgálata humán uveális melanoma mintákban Magyar Szemorvostársaság 2012. évi kongresszusa, 2012. június 7-9., Siófok

Kongresszusi előadás:

Sipos Éva, Fodor Klára, Rózsa Dávid, Treszl Andrea, Halmos Gábor: I-es típusú LH-RH receptorok (LH-RH-R) mint molekuláris targetek vizsgálata OCM-1 és OCM-3 humán uveális melanoma

sejtvonalakon, Magyar Klinikai Farmakológusok XVIII.
Továbbképző Napok, Debrecen 2016. december 8-10.

Sipos Éva, Dócs Ottó, Hegyi Katalin, Steiber Zita, Méhes Gábor,
Halmos Gábor, Treszl Andrea:

Az összejt marker FZD6 expressziójának immunhisztokémiai
vizsgálata human uvealis melanomában Magyar Klinikai Onkológiai
Társaság VIII. Kongresszusa, 2014. november 13-15., Budapest