

I. Gonadotropin-releasing hormone-III (GnRH-III) és új analógjainak FSH-releasing és tumorgátló hatásai

Korábbi irodalmi adatok szerint az egyik GnRH variáns, a lamprey (orsóhal) GnRH-III szelektív FSH-releasing aktivitással rendelkezik patkányban, amely alapján feltételezték, hogy azonos lehet a régóta keresett emlős FSH-releasing faktorral (FSH-RF). Munkacsoportunk az elmúlt években igazolta, hogy a GnRH-III egy gyenge mGnRH receptor agonista, amely dózis-függően stimulálja mind az FSH mind az LH szekréciót. Ugyanakkor kimutattuk azt is, hogy a GnRH-III direkt antiproliferatív hatással rendelkezik human emlő carcinoma sejteken. Feltételezván, hogy a hormon FSH-releasing és/vagy tumorgátló aktivitása növelhető bizonyos szerkezeti változtatásokkal, a GnRH-III különböző analógjait hoztuk létre, és vizsgáltuk azok FSH- és LH-felszabadító hatását. Az analógok gonadotropin-releasing potenciáját összehasonlítottuk a tumorsejt proliferáció-gátló hatásukkal, MCF-7 és MDA-MB-231 human emlő carcinoma sejteken.

Eredményeink szerint, azok az analógok, amelyekben csak egy aminosavat cseréltünk ki különböző pozíciókban (Tyr5-GnRH-III, Asu6-GnRH-III, Phe7-GnRH-III, D-Ala10-GnRH-III), nem mutattak lényeges változást az FSH és LH-releasing aktivitásukban, az antitumor aktivitásuk azonban szignifikánsan csökkent. A GnRH-III molekula C- vagy N-terminusán végrehajtott desaminatio, vagy többszörös aminosavcsere (Lys4,Arg8-GnRH-III, Lys4,Lys6,Asp8-GnRH-III) a GnRH-releasing potencia elvesztését eredményezte. Amikor az N-terminalis pGlu1-t Ac-D-Trp-ra cseréltük, és ezt kombináltuk a C-terminalis Gly-NH2 D-Ala-NH2-dal történő helyettesítésével, szignifikánsan csökkent mind a gonadotropin-releasing, mind az antitumor aktivitás. A GnRH-III molekula oldallánc ciklizációja a 6-8 vagy 4-6 aminosavaknál, szintén jelentősen csökkentette a molekula hormon aktivitását, de csak kismértékben gátolta az antiproliferatív hatást. Az Arg8-GnRH-III analóg gonadotropin-releasing potenciája lényegesen emelkedett, egyetlen szerkezeti változtatás sem növelte azonban a molekula FSH-releasing vagy tumorgátló aktivitását. Az Arg8-GnRH-III peptidet részletes endokrin vizsgálatnak vetettük alá, és LH-, valamint FSH-releasing hatáserősségét nemcsak a lamprey, hanem az emlős GnRH-val is összehasonlítottuk. Ez utóbbi szintén arginint tartalmaz a 8. pozícióban. Eredményeink szerint az Arg8-GnRH-III 3-11-szer nagyobb gonadotropin-releasing hatáserősséget mutatott, mint a GnRH-III, de az emlős GnRH-hoz viszonyított erőssége 1% alatt volt. GnRH antagonist analóg (MI-1544) alkalmazásával vizsgáltuk a molekula receptorspecificitását, és megállapítottuk, hogy specifikusan kötődik az emlős GnRH receptorhoz.

Eredményeinket az Amerikai Endocrine Kongresszuson és 1 közleményben ismertettük, (Kovács et al. *Endo* 2004; Kovács et al. *Peptides* 2007)

A tumorgátló aktivitás fokozása céljából diszulfid hidat tartalmazó dimer GnRH-III analógokat hoztunk létre. A dimer származékok antiproliferatív aktivitása és enzimekkel szembeni stabilitása fokozódott, míg endokrin aktivitása lényegesen csökkent. Az egyik ilyen dimer gonadotropin-releasing aktivitása mintegy harmadára csökkent a monoméréhez képest, ugyanakkor a colon carcinoma sejteken mért antitumor aktivitása 60%-kal emelkedett. Meghatároztuk a GnRH-III korábban kifejlesztett copolymer konjugátumának (P-X-GnRH-III) endokrin és tumorgátló hatáserősségét is. A GnRH-III molekula poly(N-vinylpyrrolidone-co-maleinsavhoz (P) kapcsolása tetrapeptid spacerrel (X) közel zéróra (0.22%) csökkentette a molekula endokrin aktivitását, ugyanakkor kétszeresére fokozta a tumorgátló aktivitását humán emlőcarcinoma sejteken. Adataink arra utalnak, hogy a GnRH analógok tumorgátló szelektivitása fokozható.

Eredményeinket 3 külföldi kongresszuson mutattuk be, és 3 közleményben publikáltuk. (Mező et al. *FEBS Journal* 2005; Szabó et al. *9th Solid Phase Peptide Symposium* 2007; Mező et al.

Peptides 2007; Mező et al. *Current Medicinal Chemistry 2008*)

II. A hypophysis-gonád tengely részleges gátlása GnRH antagonista analóggal

Megelőző vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a klinikumba nemrég bevezetett GnRH antagonista Cetrorelix nagy dózisban történő tartós alkalmazása a gonadectomia hatását megközelítő mértékben csökkenti a keringő szex-hormon szintet, ezáltal alkalmas a szex-hormon függő tumorok kezelésére. Minthogy bizonyos állapotokban az inkomplett hormon szupresszió is elégséges, tanulmányoztuk a Cetrorelix kis dózisban történő tartós alkalmazásának hatásait a hypophysis-gonád rendszerre. Eredményeink szerint, ez az alkalmazási mód nem okoz szignifikáns változást a hypophysis GnRH-R mRNA és protein expressziójában, és kismértékű, átmeneti csökkenést idéz elő a keringő szex-hormon koncentrációban. Mindez arra utal, hogy a GnRH antagonista alkalmas a hypophysis-gonád tengely részleges gátlására, és ezáltal az endometriosis és a prostata hyperplasia kezelésére is.

A Cetrorelix, és más GnRH antagonista analógok endokrin és tumorgátló hatásaival kapcsolatos eredményeinket 1 közleményben és 1 könyvfejezeten publikáltuk (Horváth et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA 2004*, Kovács et al. *Neuropeptides and Peptide Analogs 2009*)

III. Kollaborációs vizsgálatok GHRH analógokkal

Egy amerikai munkacsoporttal kollaborációban új GHRH antagonista analógokat fejlesztettünk ki tumorgátlás céljára. Vizsgáltuk az analógok hypophyisen kifejtett endokrin aktivitását in vivo és in vitro. A tumorsejtek által expresszált GHRH receptor variáns (SV1) kimutatására specifikus SV1 antiserumot fejlesztettünk ki.

A GHRH antagonisták endokrin és tumorgátló hatásainak témájában felkért szimposium előadással vettem részt a European Neuroendocrine Association (ENEA) 2004 kongresszuson, és 3 cikket, valamint 1 összefoglalót publikáltunk. (Varga et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA 2004*; Toller et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA 2004*; Zarándi et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA 2006*; Kovács et al. *Current Medicinal Chemistry 2008*)

IV. A hypophysis inhibin-aktivin-follisztatin (I-A-F) génexpressziójának vizsgálata

Vizsgáltuk a GnRH-gonadotropin rendszer szerepét a hypophyseális inhibin/aktivin alegységeinek (α , β A, β B) és az aktivin-kötő protein follisztatin génexpressziójának szabályozásában in vivo és in vitro. Tanulmányoztuk az ovariectomiát (OVX) követő endogén GnRH/gonadotropin túltermelés és GnRH gátlás (GnRH antagonista analóg alkalmazásával) hatását az I-A-F génexpresszióra, relatív RT-PCR módszerrel

Krónikus OVX hatására az inhibin α és β B lánc génexpressziója is jelentősen emelkedett a kontroll szinthez képest, a β A lánc mRNA szintje azonban nem változott. A GnRH antagonista Cetrorelix tovább emelte az α lánc mRNA szintjét, a β B lánc viszont nem változott szignifikánsan. A follisztatin mRNS szintje is jelentősen emelkedett az OVX után, amely GnRH antagonista hatására a normál szintre esett vissza. In vitro eredményeink megerősítik, hogy a hypophyseális I-A-F génexpresszió szabályozásában szerepet játszik a GnRH-gonadotropin rendszer. Fő szabályozó a GnRH, amely stimulálja a follisztatin génexpressziót, az inhibin-specifikus α lánc és a β B alegység génexpressziót pedig gátolja. A β A lánc mRNS expressziója jelentősen kisebb, mint a β B láncé, ami arra utal, hogy a hypophysisben főként az inhibin/aktivin B forma fordul elő.

Ezen eredményeinket az Amerikai Endocrine kongresszuson ismertettük, és 1 kapcsolódó közlemény publikációja folyamatban van. (Kovács et al. *Endo 2008*; Popovics et al. *J. Endocrinology 2009*)

V. Hypotalamikus GnRH receptor (GnRH-R) génexpresszió szabályozásának vizsgálata

A hypothalamikus GnRH-R mRNA kimutatásához real-time PCR módszer alkalmazására volt

szükség. Minthogy a munka során számos technikai akadályba ütköztünk (DNA-se (Sigma) kitére közel 1 évig vártunk, majd végül le kellett cserélni a kitért, mert leálltak a gyártásával; a publikációban leírt módszer nem volt használható stb..) a módszer beállítása hosszabb időt vett igénybe. Az in vivo kísérleteket elvégeztük (ovariectomia, estrogen és GnRH antagonistá kezelé, antagonistá beadás icv.), és a vizsgálandó agy/hypophysis szövetek összegyűjtése is megtörtént, de a PCR vizsgálatok még folyamatban vannak. Eredményeink közlését az év második felében tervezzük.