

**New diagnostic and therapeutical  
possibilities in the treatment of  
glioblastoma multiforme**

**Új diagnosztikus és terápiás  
lehetőségek a glioblastoma  
multiforme kezelésében**

**Ph.D. Thesis  
Ph.D Tézisek**

**Dr. Bellyeiné Dr. Pozsgai Éva**

**University of Pécs, Department of Clinical Chemistry and  
Biochemistry**

**Program leader/ Program vezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs**

**Pécs  
2011.**

## Bevezetés

A malignus gliomák, mint a glioblastoma multiforme, a leggyakrabban előforduló primer agydaganatok. A daganatok standard kezelése multimodális: sebészi rezekciót követően adjuváns sugárterápiában és leggyakrabban temozolomid-alapú kemoterápiában részesül a beteg. A malignus agydaganatokra jellemző a diffúz infiltráció az agyszövetbe és az emelkedett rezisztencia a hagyományos daganat terápiákkal szemben. Az utóbbi években elért jelentős terápiás fejlődés ellenére a malignus gliomák korai diagnosztizálása és sikeres kezelése továbbra is nagy kihívást jelent.

A Hő sokk fehérjék (Hsp), a fehérjék egy olyan speciális ubikviter csoportját képezik, melyek a sejt túlélésben játszanak nagy szerepet. A kis molekulású hősokk fehérjék molekuláris súlya 2-43 kDa és hasonlóan a többi Hsp-hez, molekuláris chaperone-ként működnek valamint magas fokban expresszálódnak különböző rosszindulatú daganatokban. A munkacsoportunk az elmúlt években fedezett fel és jellemezett egy új kis molekulású Hsp-t, a Hsp 16.2-t. Mivel az előzetes kísérletek arra utaltak, hogy a Hsp 16.2 megjelenik neuroectodermális daganatokban, ezért megvizsgáltuk, hogy a Hsp 16.2 expresszióját különböző típusú agydaganatokban. Az volt a célunk, hogy kiderítsük, van-e szerepe a Hsp16.2-nek a daganat kialakulásában, illetve, hogy a fehérje expressziója és a tumor malignitása között van-e összefüggés.

A hypothalamusban termelődő növekedési hormont serkentő hormon (GHRH) kötődik a hypophysis-típusú GHRH receptorokhoz (pGHRH-R) és növekedési hormon (GH) szekréciót indít el a hypophysisben. A GH stimulálja az inzulin-típusú növekedési faktor-I (IGF-I)-et, mely utóbbi fontos szerepet játszik a malignus transzformáció, metasztázis és tumorigenezis folyamataiban különböző daganatokban, beleértve az agydaganatokat is. Sikeresen alkalmazták a GHRH antagonistákat különböző daganat modellekben, mint pl. malignus gliomákban. A GHRH antagonisták hatását korábban nem vizsgálták a daganat sejt túlélésre és a sejt jelátviteli útvonalaira. A jelen tanulmányban két új potens GHRH antagonistát, a JMR-132 és MIA-602, hatásmechanizmusát vizsgáltuk meg. Célunk volt, hogy megvizsgáljuk az agydaganat sejtek GHRH antagonistára adott szignál transzdukciós válaszát illetve, hogy felderítsük a MIA-602 *in vivo* hatásosságát.

A GHRH antagonisták *in vivo* daganat növekedésre, invázió és metasztázis képződésre kifejtett gátló hatását korábbi tanulmányok bizonyították. *In vitro* kísérletekkel vizsgáltuk a MIA-602 hatását a sejt proliferációra, motilitásra, invázióra, angiogenezisre

valamint metasztázis képződéssel járó fehérje expresszióra három tumor sejtvonalon, például a DBTRG-05 glioblastoma sejteken.

#### **A vizsgálatok céljai a következők kiderítése volt:**

1. Jelen van-e a Hsp 16.2 a különböző típusú agydaganatokban?
2. Van-e összefüggés a Hsp 16.2 expressziója és az agydaganatok grádusa között?
3. Kifejeződik-e a pGHRH receptor és fő splice variánsa, az SV1, a glioblastoma sejtvonalakon?
4. Milyen módon befolyásolják a sejttúlélést a GHRH antagonisták?
5. Van-e hatásuk a GHRH antagonistáknak a fő jelátviteli útvonalakra a glioblastoma sejtvonalakon?
6. Miként befolyásolják a GHRH antagonisták a glioblastoma sejtek mitokondriális membrán potenciálját?
7. Csökkentik-e a GHRH antagonisták a glioblastoma daganat növekedését kísérletes állatmodellben?
8. Van-e a GHRH antagonistáknak in vitro hatásuk az invázió és metasztázis képződésre?
9. Alkalmask lehetnek-e a GHRH antagonisták malignus gliomák kezelésére?

#### **Eredmények és konklúziók**

1. Hsp 16.2 kifejeződést találtunk a különféle agydaganatokban, az expresszió mértéke azonban különbözött a daganat típusa és grádusa szerint. Mind a 91 tumor mintában közel azonos intranukleáris jelölés volt látható, a különbség a citoplazmatikus festődésben mutatkozott.
2. A Hsp 16.2 csak a daganat sejtekben volt jelen szignifikáns mennyiségben, ép sejtkben alig, és a Hsp 16.2 mennyisége arányos volt a sejt anapláziájának mértékével. A citoplazmatikus Hsp 16.2 expresszió mértéke egyenesen arányos a különféle daganatok grádusával. Eredményeink alapján a Hsp 16.2

értékes markerként szolgálhat a primér agydaganatok diagnosztikájában valamint a Hsp 16.2 antiapoptotikus aktivitása daganatellenes terápiás célpontja is lehet.

3. A pGHRH receptor és fő splice variánsa, az SV1, is megtalálhatóak a DBTRG-05 és U-87MG glioblastoma sejtvonalakon. A pGHRH-R 60, az SV1 39,5 kDa-nál.
4. A GHRH antagonisták, JMR-132 és MIA-602, csökkentették a sejttúlélést mindkét glioblastoma sejtvonalon.
5. A GHRH antagonisták sejtthalált a következő proapoptotikus útvonalakon indukálnak: a foszforilált Akt, GSK3 $\beta$  és ERK 1/2 csökkentése, a PARP és kaszpáz-3 hasítása és az intracelluláris fehérje (AIF, EndoG és Cyt C) transzlokációja révén.
6. A GHRH antagonisták megszüntetik a mitokondriális membrán integritását, mivel a mitokondriális membrán depolarizációját és ezáltal a proapoptotikus jelátvivő molekulák intermembrán térből történő kiszabadulását segítik elő.
7. *In vivo*, GHRH antagonista kezelésre a kísérletes glioblastoma jelentősen megkisebbedett (69%), mely a GHRH antagonista hatásosságát bizonyítja.
8. Az új GHRH antagonista, MIA-602 csökkentette a sejtek proliferációját, migrációját, invázióját és MMP produkcióját 3 különböző daganatos sejtvonalnál (agy, petefészek és emlődaganat). MIA-602 kezelés hatására megnőtt a caveolin-1 és E-cadherin expressziója, míg jelentősen csökkent a  $\beta$ -catenin és NF- $\kappa$ B szintje.
9. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a GHRH antagonisták, mint például a MIA-602, a malignus agydaganatban szenvedőknél a daganatellenes terápia része lehet, mivel daganatnövekedés gátló hatásúak, és gátolják az áttétképződést.

## **Publications in the topic/ Publikációk a témában:**

1: **Pozsgai E**, Schally AV, Zarandi M, Varga JL, Vidaurre I, Bellyei S. The effect of GHRH antagonists on human glioblastomas and their mechanism of action. *Int J Cancer*. 2010 Nov 15;127(10):2313-22. PubMed PMID: 20162575.

**IF: 4.91**

2: **Pozsgai E**, Schally AV, Halmos G, Rick F, Bellyei S. The inhibitory effect of a novel cytotoxic somatostatin analogue AN-162 on experimental glioblastoma. *Horm Metab Res*. 2010 Oct;42(11):781-6. Epub 2010 Jul 27. PubMed PMID: 20665426.

**IF: 2.685**

3: Kovács M, Schally AV, Hohla F, Rick FG, **Pozsgai E**, Szalontay L, Varga JL, Zarándi M. A correlation of endocrine and anticancer effects of some antagonists of GHRH. *Peptides*. 2010 Oct;31(10):1839-46. Epub 2010 Jul 13. PubMed PMID: 20633588.

**IF: 2.705**

4: Bellyei S, Schally AV, Zarandi M, Varga JL, Vidaurre I, **Pozsgai E**. GHRH antagonists reduce the invasive and metastatic potential of human cancer cell lines in vitro. *Cancer Lett*. 2010 Jul 1;293(1):31-40. Epub 2010 Jan 12. PubMed PMID: 20064686.

**IF: 4.89**

5: **Pozsgai E**, Gomori E, Szigeti A, Boronkai A, Gallyas F Jr, Sumegi B, Bellyei S. Correlation between the progressive cytoplasmic expression of a novel small heat shock protein (Hsp16.2) and malignancy in brain tumors. *BMC Cancer*. 2007 Dec 21;7:233. PubMed PMID: 18154656; PubMed Central PMCID: PMC2234428.

**IF: 2.709**

6: Bellyei S, Szigeti A, **Pozsgai E**, Boronkai A, Gomori E, Hocsak E, Farkas R, Sumegi B, Gallyas F Jr. Preventing apoptotic cell death by a novel small heat shock protein. *Eur J Cell Biol*. 2007 Mar;86(3):161-71. Epub 2007 Feb 1. PubMed PMID: 17275951.

**IF: 3.224**

7: Bellyei S, Szigeti A, Boronkai A, **Pozsgai E**, Gomori E, Melegh B, Janaky T, Bogнар Z, Hocsak E, Sumegi B, Gallyas F Jr. Inhibition of cell death by a novel 16.2 kD heat shock protein predominantly via Hsp90 mediated lipid rafts stabilization and Akt activation pathway. *Apoptosis*. 2007 Jan;12(1):97-112. PubMed PMID: 17136496.

**IF: 3.043**

8: Sz Bellyei, **E Pozsgai**, B. Sumegi: Hsp16.2 in Cancers  
Book Chapter in: *Small Stress Proteins and Human Diseases*, Protein Science and Engineering, Nova Science Publisher, New York, 2010

**IF in the topic/ Témához kapcsolódó IF: 23.841**

### **Additional publications/ Egyéb publikációk:**

1: Hocsak E, Racz B, Szabo A, **Pozsgai E**, Szigeti A, Szigeti E, Gallyas F Jr, Sumegi B, Javor S, Bellyei S. TIP47 confers resistance to taxol-induced cell death by preventing the nuclear translocation of AIF and Endonuclease G. *Eur J Cell Biol.* 2010 Nov;89(11):853-61. Epub 2010 Aug 12. PubMed PMID: 20708296.

**IF: 3.314**

2: Hocsak E, Racz B, Szabo A, Mester L, Rapolti E, **Pozsgai E**, Javor S, Bellyei S, Gallyas F Jr, Sumegi B, Szigeti A. TIP47 protects mitochondrial membrane integrity and inhibits oxidative-stress-induced cell death. *FEBS Lett.* 2010 Jul 2;584(13):2953-60. PubMed PMID: 20556887.

**IF: 3.541**

3: Papp A, Cseke L, Farkas R, Pavlovics G, Horvath G, Varga G, Szigeti A, Bellyei S, Marton S, Poto L, Kalmar K, Vereczkei A, **Pozsgai E**, Horvath OP. Chemo-radiotherapy in locally advanced squamous cell oesophageal cancer--are upper third tumours more responsive? *Pathol Oncol Res.* 2010 Jun;16(2):193-200. Epub 2009 Sep 17. PubMed PMID: 19760123.

**IF: 1.152**

4: Szigeti A, Hocsak E, Rapolti E, Racz B, Boronkai A, **Pozsgai E**, Debreceni B, Bogнар Z, Bellyei S, Sumegi B, Gallyas F Jr. Facilitation of mitochondrial outer and inner membrane permeabilization and cell death in oxidative stress by a novel Bcl-2 homology 3 domain protein. *J Biol Chem.* 2010 Jan 15;285(3):2140-51. Epub 2009 Nov 9. PubMed PMID: 19901022; PubMed Central PMCID: PMC2804370.

**IF: 5.520**

5: Boronkai A, Bellyei S, Szigeti A, **Pozsgai E**, Bogнар Z, Sumegi B, Gallyas F Jr. Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by galectin-13 overexpression via activation of Ask-1-p38-MAP kinase and JNK/SAPK pathways and suppression of Akt and ERK1/2 activation in U-937 human macrophage cells. *Eur J Cell Biol.* 2009 Dec;88(12):753-63. Epub 2009 Aug 31. PubMed PMID: 19717209.

**IF: 3.955**

6: Szigeti A, Minik O, Hocsak E, **Pozsgai E**, Boronkai A, Farkas R, Balint A, Bodis J, Sumegi B, Bellyei S. Preliminary study of TIP47 as a possible new biomarker of cervical dysplasia and invasive carcinoma. *Anticancer Res.* 2009 Feb;29(2):717-24. PubMed PMID: 19331227.

**IF: 1.390**

7: Szapary L, Bagoly E, Kover F, Feher G, **Pozsgai E**, Koltai K, Hanto K, Komoly S, Doczi T, Toth K. The effect of carotid stenting on rheological parameters, free radical production and platelet aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2009;43(3):209-17. PubMed PMID: 19847055.

8: Fehér G, Bagoly E, Kövér F, Koltai K, Hantó K, **Pozsgai E**, Komoly S, Dóczi T, Tóth K, Szapary L. [The effect of carotid stenting on rheological parameters, free radical production and platelet aggregation]. *Orv Hetil.* 2007 Dec 16;148(50):2365-70. Hungarian. PubMed PMID: 18055360.

**IF: 18.872**

**Total IF: 42.713**