EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A lizofoszfatidil sav potenciális szerepe ovárium tumorok molekuláris diagnózisában és kezelésében.

Dr. Tanyi János

Témavezető:
Dr. Rigó János Jr., PhD., egyetemi docens

Opponensek:
Dr. Valent Sándor, PhD., egyetemi adjunktus
Dr. Póka Róbert, PhD, egyetemi docens

A bizottság elnöke:
Prof. Dr. Pajor Attila, MTA doktora

A bizottság tagjai:
Dr. Kulka Janina, PhD., egyetemi docens
Dr. Demeter János, főorvos, az orvostudományok kandidátusa

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Budapest
2008

BEVEZETÉS

A nőgyógyászati daganatok között az ovárium tumorok rendelkeznek a legmagasabb halálozási arányszámmal. Ez a lehangoló adat annak a következménye hogy effektív szűrővizsgálatok hiányában az esetek többsége előrehaladott stádiumban kerül felismerésre. Az elmúlt 25 év során kifejlesztett számos új terápiás lehetőség ellenére a tényleges túlélés lényegesen nem változott. A legtöbb beteg rövid időn belül kemoterápia rezisztenssé válik és belehal progrediáló betegségébe, így a tényleges 5 éves túlélés mai napig 30% alatt van. Az elmúlt évtizedekben végzett genetikai vizsgálatok számos molekuláris genetikai eltérést fedeztek fel az ovárium tumorokban. Ez a genetikai instabilitás hozzájárul a kezelésre rezisztens tumorsejtek kialakulásához. Ennek eredményeképpen, bár némely első vonalú kemoterápia hatásossága jelentős, a gyógyulási arány hosszútávon mégis kompromizált.

A lizofoszfatidil sav (LPA, 1-acyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphate) a lipid felépülésnek régen ismert prekurzora és alkotó eleme. A LPA mint extracelluláris, biológiailag aktív lipid molekula szinte minden sejttipusban fontos szerepet játszik a sejtszaporodás, migráció és túlélés szabályozásában. Ismert továbbá az is, hogy a LPA stimulálja a különböző proteázok és neovaszkularizációs faktorok termelését, és így hozzájárul az áttétképződés kialakulásához. A szérum LPA szintje fiziológiás körülmények között alacsony (100-200 nM), ami arra utal hogy termelése és lebontása *in vivo* szigorúan szabályozott. A LPA extracelluláris termelésének fő enzime az autotaxin (autotaxin/lysophospholipase D) (ATX/lysoPLD) ami lizofoszfatidil kolinból egy kolin eltávolításával LPA-t képez. Az ATX/lysoPLD szint emelkedett különböző rákos megbetegedésben, ami arra utal, hogy valószínüleg szerepe van a malignus tumorok patofiziológiájában.

A LPA lebontását a lipid foszfát foszfatázok, (LPP, lipid phosphate phosphatases), másnéven foszfatidilsav foszfohidrolázok (PAP, phosphatidic acid phosphohydrolases) végzik. A LPP enzim család eddig ismert három tagja az LPP-1 (PAP2A), LPP-2 (PAP2C) és LPP-3 (PAP2B). Mindhárom sejtmembrán fehérje; hat transzmembrán domain-nel rendelkeznek és katalitikus domain-jük extracellulárisan helyezkedik el. A LPA szignál transzdukciós útvonalában a sejtfelszínen található LPA

receptorok is fontos szerepet vállalnak: a LPA1 (Edg 2), LPA2 (Edg 4) és LPA3 (Edg 7) receptorok az “endothelial differentiation gene” (Edg) receptor családhoz tartozó “G protein-coupled” receptorok.

Az ovárium tumoros betegek aszciteszében a LPA szint gyakran emelkedett (80 μM-ig). Ez egyértelműen arra utal, hogy az ovárium tumorsejtek LPA gazdag környezetben fejlődnek. Mivel a LPA fokozza néhány neovaszkularizációs factor - a “vascular endothelial growth factor”, valamint az IL-8 és IL-6 termelését - várható, hogy ezáltal a tumor idővel malignusabb fenotipusúva változik. Ismert továbbá az is, hogy az egészséges petefészek hámsejtek nem termelnek LPA-t, viszont az ovárium tumorsejtek jelentős mennyiségű LPA molekulát állitanak elő. Több szerző leírta, hogy ezzel párhuzamosan az ATX/lysoPLD mRNS és protein szintje szintén emelkedett rosszindulatú daganatos betegségekben. Más szerzők a LPA2 és LPA3 receptorok aberráns expresszióját találták ovárium tumorsejtek felszinén. Feltételezhető, hogy az aszciteszben megjelenő magas LPA szint a szérum LPA szint emelkedéséhez vezet, és így alkalmazhatóvá válik diagnosztikus célokra mint tumor marker. Már korábban közölték, hogy a korai stádiumban levő ovárium karcinómás betegek mintegy 90 %-ában emelkedett a szérum LPA szint.

Ebben a tanulmányban vizsgálni kívánjuk a LPP enzim expressziójának változását ovárium daganatban, továbbá szeretnénk választ kapni arra, hogy ezen enzimek mesterségesen előállított fokozott aktivitása hogyan befolyásolja a petefészek tumorok patomechanizmusát.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Az ovárium tumoros betegek aszciteszében emelkedett LPA szint valószínüleg, a tumorsejtek általi fokozott termelés és megváltozott metabolizmus eredménye. Vizsgálni szeretnénk a LPA-t lebontó enzimek szintjét ovárium tumorokban, összehasonlitva egészséges epitelium sejtekkel. Ezenkívül szeretnénk kimutatni, hogy a legfontossabb LPA lebontási útvonal a petefészek tumorsejtben a LPP-zal kapcsolatos.
2. Első lépésben az LPP-ok mRNS expressziójának vizsgálatát végezzük el, összehasonlítva az ovárium tumorban található expressziót normális sejtekkel és más tumor tipusokkal.
3. Amennyiben a LPP-ok szintje/aktivitása valóban csökkent, akkor a LPP-1 és LPP-2 enzimeket leíró géneket génsebészeti módszerekkel visszaültetjük a tumorsejtekbe.
4. Feltételezhető, hogy a LPA-t lebontó enzimek expressziójának és ennek következtében aktivitásának fokozódása a tumor sejtekben patofiziológiás változásokat okoz, azaz apoptózist vált ki; illetve csökkenti az attétképződést. Erre kifejlesztett laboratóriumi módszerekkel, LPP-1 és LPP-3 bevezetésevel, vizsgálni kivánjuk a fokozott LPP aktivitás hatását a tumor sejtekre.
5. Az LPP-3 LPA-re kiváltott hatását kivánjuk majd bizonyítani az enzimatikus szempontból inaktív LPP-3 és a LPP rezisztens, LPA-3 receptor agonista 1-Oleyl-Sn-2-O-Methyl-Rac-Glycero-3-Phosphothionate (OMPT) alkalmazásával. Ezek a vizsgálatok várhatóan igazolják majd, hogy a LPA funkciója és metabolizmusa potenciális lehetőséget kinál új terápiás módszerek kialakitására.
6. Amennyiben az *in vitro* kisérletek igazolják feltételezésinket, állatmodellben, *in vivo* is vizsgálni fogjuk a fokozott LPP aktivitás hatását az ovárium tumorokra.
7. A továbbiakban vizsgálni kívánjuk majd a LPA-t lebontó illetve termelő enzimek egymáshoz való viszonyát is.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Ovárium tumorok gén-expressziós profiljának analízise

RNS izolálást, hibridizálást és oligonukleotid microarray-t végeztek 27 ovárium tumor, más tumor és egészséges szövetmintákból. Ezek az Affymetrix U95 array hibridizációs adatok a kovetkező web oldalon érhetők el: http://www.gnf.org/cancer/epican. A kontroll minták 36 normál felnőtt hámszövetből lettek előállítva. A már előzetesen közölt adatokat saját microarray eredményeinkkel (26 további ovárium tumor - 17 serosus és 9 endometrioid hisztológiai tipusú) kapcsoltuk össze. Minden tumormintát mikoroszkóp alatt vizsgáltunk meg: a microarray-hez felhasznált tumorminta legalább 80 % tumor szövetet és elenyésző mennyiségű strómát tartalmazott. Hogy a két adatbázis eredményei összehasonlíthatóak legyenek, minden egyes gén mRNS expresszióját standardizáltuk, az egészséges epitélium expresszióját véve alapul (1.0). Így a két adatbázis eredményei összevonhatóva és összehasonlíthatóvá váltak.

Gén expresszió és analízis

Huszonhat friss fagyasztott ovárium tumor minta került feldolgozásra: 9, endometrioid a Duke University-ről; 9, stage I serosus a Mayo Clinic-ről; és 8, stage III serosus az MD Anderson Cancer Center-ből. Négy, összesen 13 beteg ováriumából összesített egészséges hámsejt minta a Northwestern University-ről érkezett. RNS kivonatot az RNeasy Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA) alkalmazásával nyertünk. Az "Affymetrix GeneChip® Human Genome U95 set"-et alkalmaztuk a gén expressziós adatok vizsgálatára. Ez a sorozat alkalmas több mint 60000 humán gén expressziójának vizsgálatára. A cRNS preparálás, hibridizáció és microarray a Mayo Clinic microarray laboratóriumában, az ott alkalmazott protokol szerint történt. A microarray adatokat a "dChip software" alkalmazásával elemeztük. (http://www.biostat.harvard. edu/complab/dchip/).

Sejt tenyészet, G418 szelekció, first-strand cDNS szintézis és semi-quantitative RT-PCR

OVCAR-3, SKOV3, SKOV3 IP_1, HEY és A 2780 (humán epitélium ovárium karcinóma) sejtvonalak RPMI-1640, 10 % fetális bovine szérummal (FBS) dúsitott médiumban lettek tenyésztve (Atlanta Biologicals, Norcross, GA). Az IOSE 80 és IOSE 29 (simian virus 40 T-antigen-semi-immortalized ovárium epithelium sejtvonal) sejtekhez 199/MCDB 105, 10 % FBS-el dúsított médiumot használtunk. Minden egyes sejtvonalat megvizsgáltunk G418/Neomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY) rezisztenciára. A sejtvonalak zöme 200 µg/ml es 1000 µg/ml között mutatott G418 rezisztenciát. Azt a legalacsonyabb G418 szintet használtuk a kisérletek folyamán, ami megölte a sejteket. A LPP-1 mRNS expresszióját semi-quantitative "reverse transcriptase polymerase chain reaction"-nel (RT-PCR) határoztuk meg. A következő oligonukleotid primereket használtuk: LPP-1 primerek: 5`-CGCGGATCCATGTTTGACAAGACGCG és 5`-TGGCTATGTAGTTATTCCTG (304 bp); kontrollnak a GAPDH primereket: 5`-CCCATGGCAAATTCCATGGCACCG és 5`-GTCATGGATGACCTTGGCCAGGGG (344 bp). A következő oligonukleotid primereket hasznaltuk LPP-3 RT-PCR-nál: 5`-CGCGGATCCATGCAAAACTACAAGTA és 5`-CGTGATGATCGCGAGGATGG (306 bp); illetve a GAPDH primereket: 5`-CCCATGGCAAATTCCATGGCACCG és 5`-GTCATGGATGACCTTGGCCAGGGG (344 bp). Az RNS mintákat DNAse enzimmel kezeltük a first-strand cDNS szintézise előtt (DNA-free, DNAse Treatment and Removal Kit) (Ambion, Austin, Texas, USA). Az egylépéses (one tube) módszert alkalmaztuk. A reakció oldat 1µg totál RNS, 0.4 µM sense és antisense primereket, 0.2 mM dNTP, 0.5 egység reverz transzkriptáz és Taq-DNS polimeráz enzimeket (in enzyme mix), 5 mM DTT-oldatot, 5 egység RNAse gátlot, 1.5 mM $MgCl_2$ tartalmazott 50 µl vég volumenben (Titan One Tube RT-PCR System, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

LPP-1 és LPP-3 enzim assay-k és immunoprecipitáció

A vizsgálati volumen 100 µl volt, amely 3.2 mM Triton X-100 es 100 µM ^{32}P-jelölt lipid szubsztrátot tartalmazott. A detergens-izolált membrán proteineket (0.1-5 µg protein) ehhez az oldathoz adtuk. A (^{32}P)PO_4^{2-} szintemelkedését folyadék "scintillation counter"-rel mértük. 12.5 % SDS-polyacrylamid gélt használtunk az elektroforézishez. A LPP-1 es LPP-3 enzim aktivitás vizsgálatához, mind az eredeti mind a SKOV3 traszfektált tumorsejteket 3 %-os FBS-sel dúsitott OPTI-MEM médiumba helyeztük, majd az oldathoz ^{32}P LPA adtunk 20 µM végkoncentrációban. A reakció elinditásához 1 ml preparált szubsztrátot adtunk 1 ml sejtoldathoz (4x10^5 sejt), majd ezt 37 C° inkubáltuk folyamatos keveréssel. Egyenlő időközönként, kis mennyiségű felülúszót eltávolítottunk LPP-3 aktivitás mérésére, ami [^{32}P]PO^{-2}_4 szintmeghatározással történt.

Citoplazma $[Ca^{2+}]_i$ assay

12-24 órás éheztetés után, a sejteket összegyűjtöttük és 1 µM Indo-1 AM-phosphate-buffered saline (PBS) oldatba helyeztük 30 percre 37 °C fokon. A citoplazma $[Ca^{2+}]_i$ szintjének meghatározását 331 nm es 410 nm hullámhosszakon, fluoreszcens spektrofotométerrel (F-4000, Hitachi) végeztük. Mintaként 3 × 10^6 sejtet használtunk a $[Ca^{2+}]_i$ meghatározáshoz . A kálcium szignál mérése gyors kinetikus fluorométerrel történt (FLEXStation, Molecular Devices, Inc.).

LPP-3-mal transzfektált sejtek ERK aktivitásának vizsgálata és Western Blot analízis

24 órás éheztetés után 1 µM LPA-t adtunk a 90 % benőtt LPP-3-mal stabilan transzfektált SKOV3 sejtpopulációhoz és jelzett időpontokban sejtloldatokat készítettünk. Anti-phospho-ERK1/2 (Cell Signaling Technology, Inc. Beverly, MA) és anti-ERK2 antitestek felhasználásával Western Blot analízist végeztünk (Santa Cruz Biotechnology,

Inc., Santa Cruz, CA). A különböző sávok relativ denzitásának meghatározása NIH Image 1.62.-val történt.

CMV és hTERT promoter által vezényelt LPP-1 és LPP-3 cDNS-t tartalmazó eukarióta vektorok

A teljes LPP-1 cDNS-ét a következő primerekkel amplifikáltuk: 5-CGCGGATCCATGTTTGACAAGACGCG -3 (sense) és 5-GCTCTAGAAGGCTGGTGATTGCTCG -3 (antisense). Ezt követően a cDNS-t restrikciós endonukleázokkal (Bam HI es Xba I) a pcDNA3.1-HisA epitope taggal jelölt vektor restrikciós helyére telepítettük (Invitrogen, Carlsbad Ca). A CMV promotert hTERT promoterrel cseréltük ki a pcDNA3.1-HisA vektoron belül Bgl II es Kpn I. restrikciós enzimek alkalmazásával. A PCR termékek érvényességét szekvenálással igazoltuk, míg a vektorok validitására restrikciós endonukleáz analízist használtunk. A LLP-3 teljes cDNS-ét PCR reakció alkalmazásával a következő primerekkel amplifikáltuk: 5-CGCGGATCCATGCAAAACTACAAGTA -3 (sense) és 5-GCTCTAGACATCATGTTGTGGTGAT-3 (antisense). Bam HI (-921) és Xba I (-983) restrikciós helyeket építettünk a primer párokba miáltal a cDNS-t a pcDNA3.1-HisA eukarióta vektorba ligáltuk. A CMV promotert kivágtuk és hTERT378 promotert ültettünk be a Bgl II (-13) és Kpn I (-913) restrikciós pozícióba a pcDNA3.1-HisA vektorban. A vektorok korrekt bázis sorrendjét szekvenálással és ismételt restrikciós endonukleáz emésztéssel ellenőriztük.

Tranziens és stabil transzfekció LPP-1-t és LPP-3-t expresszáló vektorokkal és Colony Formation Assay

A sejtek transzfekcióját FuGene 6 oldattal (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, USA) hajtottuk végre. A transzfeckió fokának számszerű meghatározását flow cytometry-vel, FACScan CELLQUEST 3.3 software csomag alkalmazásával (Becton-Dickinson, San Jose, California) végeztük. Green Fluorescein Protein (GFP, zöld fluoreszcens protein) azonositására Green Fluorescent hisztogramot használtunk. Az üres

vektorral transzfektált sejtek negatív kontrollként szerepeltek és ezekhez viszonyítottuk a transzfektált GFP pozitív sejtek arányát. A transzfekció eredményessége 4-21 % között mozgott. Stabilan transzfektált sejtvonalak létrehozását a következő módon végeztük: 48 órával a tranziens transzfekció után az összes sejtet megfelelő mennyisegű G418-t (selection medium) tartalmazó médiumba helyeztük és a médiumot minden harmadik napon, 6-8 hétig cseréltük.. A "colony formation assay" módszere: $3x10^4$ tranziensen transzfektált ovárium tumor sejtet vagy $2x10^3$ stabilan transzfektált SKOV3 sejtet 30 mm-es edényekbe ültettünk. Két héttel később a kifejlődött sejtkolóniákat 0.1 % Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad, Hercules, CA) (30 % methanollal és 10 % ecetsavval) megfestettük. Csak az 500 sejtnél nagyobb, azaz legalább 1 mm-es átmérőjű kolóniákat számoltuk. A számlálást két kutató végezte egymástól függetlenül, az eltérés 10 % alatt volt.

Zöld fluoreszcens protein (GFP - green fluorescent protein) célzott sejtciklus progressziós assay

A tumor sejteket vagy pcDNA3.1-LacZ-HisA, pc-hTERT-DNA3.1-HisA, pcDNA3.1-LPP-1/3-HisA, vagy pchTERT-DNA3.1-LPP-1/3-HisA vektorokkal transzfektáltuk. Minden egyes transzfekciónál a sejt populációt co-transzfektáltuk pGFP (green fluorescent protein-t expresszáló) vektorral. A sejt progresszió vizsgálatát FACScan flow cytometer-rel (Becton Dickinson, San Jose, CA) két színű citometriás analízissel, CELLQUEST 3.3 software alkalmazásával végeztük el. Minden GFP pozitív sejt DNS tartalmát analizáltuk.

LPP-1 és LPP-3 bystander hatásának vizsgálata

Két nappal a tranziens transzfekció után az OVCAR-3 és SKOV3 tumorsejteket tripszinizáltuk és megszámoltuk. A tranziensen transzfektált tumorsejteket ($3x10^4$ sejt) egyenlő mennyiségű, nem transzfektált tumorsejttel kevertük össze és 30 mm-es edényekbe ültettük őket. Ugyanezt a kísérletet stabilan transzfektált SKOV3 sejtekkel

($2x10^3$) is elvégeztük. Ezeket egyenlő mennyiségű, nem transzfektált sejttel kevertük össze és "colony formation assay"-t hajtottunk végre.

Sejt migraciós assay és tumor növekedés vizsgálata immunszuppresszált egerekben

Transwell chamber membrane kit-et (8µm pore size; Biocoat, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ), használtunk a migraciós teszthez. A sejteket először 24 órán keresztül éheztettük. Üres médiumot használtunk a felső edényben, míg 10µM LPA-t tartalmazó médiumot használtunk az alsó edényekben. Ezt követően $5x10^4$ sejtet adtunk a felső edénybe és 37 ºC fokon 24 órán át engedtük a sejteket migrálni. Ezután a sejteket fixáltuk és crystal violet-tel megfestettük.

Az állatkísérletekben, mind az eredeti, mind az LPP-3 stabilan transzfektált SKOV3 vagy SKOV3 IP_1 sejteket az immunszupresszált atímiás nősteny egerekbe (female nude mice) (Harlan Laboratories, LTD, Indianapolis, Indiana) fecskendeztük: $4x10^6$ sejtet bőr alá és $1x10^7$ tumor sejtet intraperitoneálisan. A daganat növekedését (mm^3) minden nap dokumentáltuk a következő képlet alapján: tumor volume = (long dimension) x (short dimension)^2/2.

Statisztika

A páratlan folyamatos adatokat "Wilcoxon rank sum test"-tel és "exact permutation test"-tel hasonlítottuk össze. A páros folyamatos adatokat "Wilcoxon sign-rank test"-tel elemeztük. A százalékos adatokat chi-négyzet próbával állapítottuk meg. A sorozat adatokat "repeated measures of analysis of variance"- szel vizsgáltuk. A szignifikancia megegyezés szerint $P<0.05$ valószínűségi szint volt.

EREDMÉNYEK

Csökkent LPP-1 mRNS expresszió ovárium tumormintákban

A LPA lebontásában (hidrolízisében) résztvevő számos enzim expresszióját vizsgáltuk az "Affymetrix array data set" felhasználásával különböző tumor mintákban. Egészséges epitélium sejtmintákat alapul véve a LPP-1 mRNS expresszió szintje mintegy ötödére csökkent az ovárium tumormintákban. A LPP-1 RNS szintje szintén alacsonyabb volt mint más tumorvonalakban. Például, az LPP-1 RNS szintje prosztata és vese tumorokban 10-szerese volt az ovárium tumorsejtekben mért szintnek. A három LPP tipus összesített RNS szintje az ovárium tumor mintákban úgyszintén alatta maradt más tumortipusoknál mérhető szintnek. Ez az adat megerősíti azt a feltevést, hogy ovárium tumorokban a LPP-1 csökkent szintje hozzájárul az LPA szint emelkedéséhez.

Humán ovárium tumor sejtvonalak és tumor minták semi-quantitative RT-PCR analízise

A microarray adatok elemzése után elhatároztuk, hogy tovább vizsgáljuk a LPP-1 mRNS expresszióját ovárium tumor sejtkultúrákban egészséges epitélium sejtekkel összehasonlítva. Megvizsgáltuk a LPP-1 mRNS expresszióját 20 ovárium daganat mintán (minden minta 80%-nál több tumorszövetet tartalmazott), 6 normál epitélium mintán, egy normál ovárium hámsejtvonalban (NOE) és 5 különböző ovárium karcinóma sejtvonalban (OVCAR-3, SKOV3, SKOV3-IP_1, HEY, és A 2780). Határértéknek a normál epitélium minták LPP-1 mRNS expresszióját használva, megállapítottuk, hogy 16/20 ovárium tumor mintában és 4/5 ovárium tumor sejtvonalban csökkent a LPP-1 mRNS szint. Néhány esetben a szintkülönbség nagymértékű volt. Ennek alapján feltételezhető, hogy a tumoros betegek aszciteszében emelkedett LPA szintnek, és a tumorsejtvonalak emelkedett LPA szintjének egyaránt az ovárium tumorokban felfedezett, csökkent LPP-1 szint az oka.

LPP-1 enzim aktivitása csökken ovárium tumor sejtvonalakban

Az összesített LPP aktivitást vizsgálva, alacsonyabb aktivitást találtunk HEY, OVCAR-3 és SKOV3 ovárium tumor sejtvonalakban mint a nem tumoros petefészek hámsejtvonalban (IOSE). Amikor a LPP-1-t immunoprecipitálással szeparáltuk, megállapítottuk, hogy a LPP-1 az IOSE-ben mért össz LPP aktivitás 10%-ért felelős. Ezzel szemben a HEY, OVCAR-3 és SKOV3 sejtvonalakban ennél jelentősen kisebb LPP-1 aktivitást találtunk. Az IOSE és malignus sejtvonalakban mérhető LPP-1 aktivitás közötti különbség nagyobb volt mint az összesített LPP aktivitások különbsége. Ez arra utal, hogy ovárium karcinóma sejtekben a LPP-1 aktivitás szelektíven csökkent. Az LPP-1 aktivitás mérhető csökkenése jól korrelált az mRNS expresszió már korábban megállapított csökkenésével. A legalacsonyabb aktivitást és expressziót mindkét teszttel az SKOV3 sejtvonalban találtuk.

Funkcionálisan aktiv LPP-3 expresszió SKOV-3 ovárium tumor sejtvonalban

Ahhoz, hogy jobban megvizsgálhassuk a fokozott LPP aktivitás ovárium tumorsejtekre kifejtett hatását megkíséreltünk stabilan transzfektált sejtvonalakat előállítani. Meglepő módon, csak az SKOV3 és az SKOV3 IP_1 sejtvonalakban sikerült stabilan transzfektált vonalakat kialakítani. Azt, hogy az LPP-1-t vagy LPP-3-t expresszáló vektorok transzfekciója eredményes volt, immunoprecipitációval, Western Blot-tal, immunofluoreszcens reakcióval és semi-quantitative RT-PCR-al igazoltuk. Az ellenőrző vizsgálatok azt mutatták, hogy a stabilan transzfektált SKOV3 sejtek szelektíven a nagyobb molekula súlyú LPP-3-t termelik, ami az enzim membránon lokalizált végformája. A LPA hidrolízis felgyorsulása arra utalt, hogy ugyanezek a sejtek, a nem transzfektált tumor sejtekkel ellentétben, gyorsabban bontották le a radioaktív LPA-t a médiumban (P=0.03).

LPP-3 - transzfektált és nem transzfektált tumorsejtek intracelluláris kálcium mobilizációjának és ERK aktivitásának összehasonlítása

Mivel az ERK kinázok LPA által indukált foszforilációja ismerten az LPA szignál érzékeny indikátora, megvizsgáltuk a fokozott LPP-3 aktivitás erre kifejtett hatását. Eredményként az ERK foszforiláció maximum szintjének csökkenését, majd további gyors esését észleltük. Két – három órával később az ERK foszforiláció mind a transzfektált mind az eredeti tumorsejtekben visszatért normális szintre. Ez egybeesik a korábbi megfigyeléssel, miszerint a LPA szint idővel elenyésző szintre csökken mindkét sejtkulturában. Az ERK aktiválása az LPA receptorhoz kötődésének következménye. Meg akartuk vizsgálni, hogy a LPP-3 fokozott aktivitásának van-e hatása a már kialakult LPA-receptor complexre. Amikor a LPA hozzákapcsolódik a receptorhoz, a LPA-receptor komplex inaktivvá válik, internalizálódik és perceken belül emeli a sejten belüli szabad kálcium szintjét. A LPP-3 stabilan transzfektált és az eredeti sejtvonalakat összehasonlítva nem találtunk különbséget a sejten belüli kálcium mobilizációban. Megállapíthatjuk tehát, hogy a LPA receptorhoz kötődését a sejtfelszínen jelen levő LPP-3 enzim nem befolyásolja, valós funkciója inkább a sejten kivüli, szabad LPA hidrolízisével kapcsolatos.

LPP-1 és LPP-3 fokozott aktivitása csökkenti a tumor sejtek kolónia képzését

A tumorsejt proliferáció vizsgálatának érzékeny módszere a “colony formation assay”. Megvizsgáltuk, hogyan változtatja meg a LPP-1 vagy az LPP-3 fokozott aktivitása a tumorsejtek proliferációs képességét és kolónia formáló tulajdonságát. Azt tapasztaltuk, hogy a LPP-1-el stabilan transzfektált SKOV3 ovárium tumorsejtek kolónia formáló aktivitása csaknem felére csökkent a nem transzfektált sejtekkel összehasonlítva (49 ± 8.4-rol 26 ± 4.3-re kolónia/edény $p=0.0002$). Minthogy nehéz magas LPP-1 expressziót elérni a stabilan transzfektált tumorsejtekben, tranziens transzfekcióval is megismételtük a kísérletet SKOV3 és OVCAR-3 sejtvonalakban. Tranziens transzfekciót követően, a LPP-1 expresszió jelentősen lecsökkentette az OVCAR-3 és SKOV3 sejtek növekedését és kolónia formáló képességét. A LPP-1 fokozott expressziójának gátló

hatása az OVCAR-3 és SKOV3 sejtek növekedésére 2.3-5.8 -szoros volt attól függően, hogy CMV vagy humán telomeráz (hTERT) promotert alkalmaztunk (P=0.0022, P=0.0022, P=0.0416, P=0.0022). A fenti eredmény egyértelműen arra utal, hogy a LPP-1 sejtfelszíni aktivitásának fokozásával jelentősen gátolni tudjuk az ovárium tumorsejtek proliferációját *in vitro*. A vizsgálatot végrehajtottuk LPP-3-t expresszáló CMV vagy hTERT promoter által vezérelt vektorokkal is, és ekkor a LPP-3 jelentősen csökkentette mind a SKOV3 sejtek (7.1-7.3 - szoros = 86% csökkenés) mind az OVCAR-3 sejtek (6.7-6.8 - szoros = 85% csökkenés) azon képességét, hogy kolóniát alkossanak. (P=0.002).

LPP-1 and LPP-3 jelentősen fokozza az apoptózist ovárium karcinóma sejtvonalakban

A LPP-k hatása az ovárium tumorsejtek kolónia formáló és proliferációs képességére valószínüleg a sejtciklus progresszió lassulásán vagy fokozott apoptózis rátán alapul. Ennek vizsgálatára sejtciklus progressziós teszteket végeztünk flow cytometry-vel. A sejtciklus különböző fázisaiba lépő sejtek aránya a LPP-1-el transzfektált SKOV3 vagy OVCAR-3 sejtek és a kontroll sejtek között meglepő módon hasonló volt. A sejtciklus analízise során különbséget találtunk viszont a hypodiploid csúcs magasságában, és ez az apoptózisba lepő, a sejtciklusból kiszelektálódott sejtek százalékos arányát reflektálja. Ennek alapján megállapíthatjuk, hogy a proliferációs és kolónia formáló képesség csökkenése az emelkedett apoptózis ráta következménye. Ehhez hasonlóan a hypodiploid csúcs szignifikáns emelkedését észleltük a LPP-3-t expresszáló vektorral történt transzfekció után (P<0.0001). Ezek szerint a LPP-3 inhibiciós hatása szintén az emelkedett apoptózis ráta eredménye. A kisérletet megismételtük egy mutáns, katalitikusan inaktív LPP-3-t kiválasztó vektorral is. Feltételezésünknek megfelelően, a mutáns, LPA-t nem lebontó LPP-3 expressziója nem befolyásolta a tumorsejtek proliferációját és nem változtatta az apoptotikus sejtek arányát sem.

LPP-3 a tumorsejtek növekedésének gátlását a sejten kívüli szabad LPA lebontásával éri el

Mint már korábban utaltunk rá, ahhoz hogy a LPP-3 kifejtse hatását, intakt katalitikus domain-re van szükség. Újabb vizsgálatokat terveztünk annak bizonyítására, hogy a LPP-3 tumorsejtekre kifejtett, növekedésgátló hatását valóban a sejten kívüli (extracelluláris) LPA lebontásával éri el. A LPP-3-mal stabilan transzfektált sejtekhez exogén LPA-t vagy egy, a LPP által le nem bontható LPA analógot, a már korábban említett OMPT-t adtuk. A LPP-3-mal stabilan transzfektált sejtek 4.4-szer gyorsabban bontották le a LPA-t mint az eredeti, érintetlen tumorsejtek. Az oldathoz adott exogén LPA ugyan nem, de az OMPT képes volt ellensúlyozni a LPP-3 gátló hatását a "colony formation assay"-ben és a sejt ciklus progressziós tesztben egyaránt. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a membrán-asszociált LPP-3 a tumorsejt növekedésére kifejtett gátló hatását valóban az extracelluláris szabad LPA lebontásával éri el.

LPP-1 és LPP-3 csökkenti a nem transzfektált bystander sejtek növekedését

Az előző kísérletben megállapítottuk, hogy a LPP-1 és LPP-3 gátló hatását a sejten kívüli szabad LPA lebontásával éri el. Ha ez valóban így van, akkor az LPP-1-el vagy LPP-3-mal transzfektált tumorsejtek a médiumban található LPA lebontása által csökkenteni fogják az ugyanott található, bystander, nem transzfektált sejtek növekedését is. Ennek igazolására "colony formation assay"-t végeztünk úgy, hogy a LPP-1-et vagy LPP-3-t fokozottan termelő stabilan vagy tranziensen transzfektált sejteket nem transzfektált, eredeti tumorsejtekkel kevertük össze. A kísérlet során egyenlő mennyiségű transzfektált és nem transzfektált sejtet kevertünk össze és kolónia formáló képességüket a tiszta, nem kevert sejtpopulációkkal hasonlítottuk össze. Mint várható volt, a kevert sejtpopulációkban a sejtnövekedés lelassult, ami azt bizonyítja hogy az LPP-1-t vagy LPP-3-t kiválasztó sejtek hatással vannak a nem transzfektált bystander sejtekre is, feltehetőleg egy extracelluláris mediátor (LPA) lebontása által. (P=0.01, P=0.01).

LPP-1 fokozott kiválasztása cöokkenti a tumorsejtek migrációját

A LPA migrációt fokozó hatását korábbi publikációkban már leírták. Ebben a kisérletben azt vizsgáltuk, hogy a LPP-1 fokozott kiválasztása és aktivitása vajon lecsökkenti-e az LPA által indukált sejtmigrációt? Korábbi kísérleteinkben a LPA 10μM koncentrációban stimulálta az üres pcDNA3.1 vektorral transzfektált SKOV3 sejtek migracióját. Ezzel ellentétben, amikor a sejteket LPP-1 expresszáló vektorral transzfektáltuk, a LPA nem volt képes stimulálni a tumorsejtek migrációját. Következésképpen a LPP-1 által végrehajtott extracelluláris LPA lebontás negatívan befolyásolta a tumorsejtek migrációs képességét. Ez az információ igen fontos lehet majd az ovárium tumorok áttétképzésének befolyásolásában.

LPP-3 csökkenti a tumorsejtek növekedését *in vivo*

Ezekben a kísérletekben az ovárium tumorsejteket atímias (csökkent celluláris immunitással rendelkező) egerek bőre alá fecskendeztük. Tíz SKOV3-mal injekciózott egérből 9-ben alakult ki tumor. A LPP-3-t expresszáló stabilan transzfektált sejtek befecskendezése után viszont a 10-ből csak 4 egérben fejlődött ki daganat. Amikor ezt a kisérletet SKOV3-IP_1 sejtekkel (a SKOV3 sejt klinikailag agresszívebb formája) végeztük el, mind a 10 eredeti sejtvonallal beinjekciózott egérben kialakult tumor, viszont a 10, LPP-3-mal transzfektált SKOV3 IP_1 sejtekkel injekciózott egér kozül mindössze 5-ben volt észlelhető a daganat kialakulása. A nem transzfektált sejtekkel szemben a transzfektált sejtekkel jóval kisebb tumor implantációs százalékot értünk el. Nemcsak az implantáció százalékos előfordulása, hanem a tumornövekedés mértéke is különbözött. A LPP-3-at expresszáló sejtekből kialakult tumorok jóval lassabban növekedtek mint az eredeti tumor sejtekből kifejlődő daganatok (SKOV3 és SKOV3-IP_1 re vonatkozó $P<0.0001$,). A kísérlet végén az eredeti SKOV3 sejtekből kialakult tumorok átlag súlya 0.48 ± 0.15 g volt ellentétben a LPP-3-at expresszáló SKOV3 sejtekből kialakult tumoroknál található 0.13 ± 0.04 g-mal. Az előzőekhez hasonlóan, az eredeti SKOV3 IP_1 sejtekbol kialakult tumorok 0.44 ± 0.11 g átlagsúllyal rendelkeztek, míg az LPP-3-mal transzfektált sejtekből kialakult tumorok súlya 0.12 ± 0.02 g volt. Tehát

mindkét sejtvonalnál az eredeti setvonalból kifejlődött tumorok átlag súlya négyszerese volt a LPP-3-mal transzfektált sejtekből kialakult daganatoknak.

Ezután a SKOV3 és SKOV3-IP_1 sejteket az egerek hasüregébe fecskendeztük, és a tumor implantációs ráta hasonlóképpen jelentősen csökkent (1/5 SKOV3 LPP-3 és 3/5 SKOV3 IP_1-LPP-3 sejtekkel injekciózott egereknél). A LPP-3 fokozott expressziója csökkentette a SKOV3 és SKOV3 IP_1 sejtek növekedését a hasüregben. Ezt a kisérleti állat súlyváltozásával ($P=0.005$, $P<0.0001$) és haskörfogatának mérésével állapítottuk meg ($P=0.042$, $P=0.001$).

Az előbbiek alapján, a LPP-3 jelentősen csökkentette a tumor implantációs rátát és a tumorszigetek növekedését is. Azonban a kezdeti lassú növekedés után egy gyorsabb tumor növekedési tendenciát figyeltünk meg. Lehetségesnek tartottuk, hogy a LPP-3-t expresszáló sejtek *in vivo* kiszelektálódnak. Ennek vizsgálatára, az állatok eutenáziáját követően, tumormintákat vettünk és semi-quantitative RT-PCR végeztünk rajtuk a LPP-3 mRNS szintjének meghatározása céljából. A vizsgálat igazolta feltételezésünket. A hasüregben növekedő tumorsejtekben mérhető LPP-3 expresszió és aktivitás 4 hét után jelentősen lecsökkent. Meglepő volt, hogy az eredeti, nem transzfektált sejtek LPP-3 expressziója is jelentősen csökkent. Ez arra utal, hogy *in vivo* erős negativ szelekció érvényesül a LPP-3-t fokozottan expresszáló tumorsejtek ellen és az LPP-3 “down regulation”-ja következik be a túlélő ovárium tumorsejtekben.

MEGBESZÉLÉS

Fiziológiás körülmények között a testfolyadékok, sejtmembránok és sejtek LPA szintje alacsony (szubmikromoláris). Ez valószínüleg a gyors kiválasztás és lebontás következménye. Az ovárium karcinómás betegek aszciteszében talált, emelkedett LPA koncentrációt feltehetően a LPA-t termelő sejtek (tumorsejtek) számának emelkedése, illetve a LPA megváltozott lebontása okozza. A LPA szint ilyen nemű változása és annak a tumorsejtekre kifejtett hatása érdekes kivizsgálási területnek igérkezett. A vizsgálathoz "public transcriptional profiling" adatbankot, CGAP SAGE adatbankot és az M.D. Anderson Cancer Center "transcriptional profiling" adatbankját használtuk. Megállapítottuk, hogy ovárium karcinómában egyértelműen csökken a LPP-k szintje és ezzel lelassul a LPA lebontása. Ezzel párhuzamosan a ATX/LysoPLD mRNS szintjének jelentős emelkedését tapasztaltuk az ovárium karcinómás betegekből nyert minták nagy százalékában. Ezen enzimek együttes hatásaként várhatóan emelkedni fog a LPA szintje a daganat környezetében. A három LPP mRNS összesített szintje ovárium karcinóma szövetmintában és sejtvonalakban alacsonyabb volt mint egészséges hámszövetben, illetve egészséges petefészekből nyert hámsejtekben. Ez ellentétben volt az ATX/lysoPLD aktivitással, és megfelelt annak a megállapításnak, hogy aszciteszben emelkedett a LPA szint. Az összesített LPP mRNS szintkülönbség az említett mintákban elsősorban a jelentősen különböző LPP-1 szintből eredt – a szint ovárium karcinóma sejtekben átlagosan 5-szor alacsonyabb volt mint normál hámsejtekben. Az adatok arra utalnak, hogy a petefészek karcinóma sejtjei, ellentétben az egészséges petefészek hámsejtekkel, fokozott mennyiségben képesek LPA-t képezni. A LPA metabolizmusában résztvevő enzimek termelése és müködése jelentősen megváltozik ovárium karcinómában, emiatt a LPA termelésében észlelt minimális változások is jelentős szintemelkedést okozhatnak. Mindezt összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az ovárium karcinóma LPA-ban gazdag környezete az LPA aberráns termeléséből és metabolizmusából ered. Ez a tény potenciálisan lehetőséget ad új, LPA termelésre és aktivitásra alapozott terápiás lehetőségek kialakítására *in vivo* és *in vitro*.

Petefészek karcinóma sejtvonalakat és kontroll normál hámsejteket tranziensen és stabilan transzfektáltunk LPP-1 és LPP-3 expresszáló vektorral és az enzim aktivitás

emelkedését semi-quantitative RT-PCR-ral és immunoprecipitációval igazoltuk. A LPP-1 és LPP-3 izoenzimek mesterségesen fokozott aktivitása csökkenti a tumorsejtek proliferációját és túlélését. A LPP-1 és LPP-3 enzimek ilyen hatása függ az intakt katalitikus domain-tól, azaz a mutáns, biológiailag inaktív LPP-3-nak nem volt hatása a tumorsejtekre. A LPP- 1 és LPP-3 aktivitás emelkedése jelentősen megnövelte az apoptózis arányát ovárium karcinóma sejtvonalakban és kevésbe befolyásolta a sejt ciklus progresszióját. Tehát a csökkent proliferáció és emelkedett sejthalálozás egyaránt felelős a csökkent növekedési rátáért. Ahhoz, hogy kivizsgáljuk, valóban az extracelluláris LPA hidrolízise felelős-e a LPP-3 ovárium karcinóma sejtekre kifejtett növekedés gátló hatásáért, egy, a LPP-3 által nem hidrolizálható LPA3 receptort szelektíven aktiváló agonistát, OMPT-t alkalmaztunk. Az exogén OMPT valóban jelentősen ellensúlyozta a LPP-3 által okozott növekedés gátló hatást csakúgy mint a fokozott apoptózist. Így megállapítható, hogy a LPP-3 hatását az ovárium karcinóma sejtek növekedésére valóban az extracelluláris LPA hidrolízisen keresztül fejti ki.

Igazolt tény, hogy a LPA jelentősen növeli a sejt migrációt és ezzel valószinüleg hozzájárul a daganat aggresszív viselkedéséhez illetve metasztázis képzéséhez. Vizsgálatainkkal választ kerestünk arra, hogy az ovárium tumorsejtek LPP-1 aktivitásának mesterséges növelése megvaltoztatja-e a LPA által indukált migrációt? “Transwell assay”-vel vizsgálva 10μM LPA serkentette a kontroll SKOV3 sejtek migrációját, de érdekes módon a LPP-1–el transzfektált SKOV3 sejtekben ez a hatás elmaradt. Ezek szerint a LPP-1 által okozott fokozott extracelluláris LPA hidrolízis a sejtmotilitás, proliferáció, kolónia formálás és túlélés változását eredményezi. A fenti adatok igazolják hipotézisünket, miszerint az ovárium karcinómában lecsökkent LPP-1 szint és aktivitás, a proliferáció, túlélés és metasztatikus kaszkád megnövelésével, befolyásolja a tumor patofiziológiáját. Ehhez kapcsolódik saját és más szerzők által is leírt megállapítás, miszerint a LPA megnövelte a tumor invazióban és metasztázisban résztvevő proteázok szintjét és aktivitását. A bystander hatás alapján, ha a LPP-1 es LPP-3 expressziója csökkenti az extracelluláris LPA szintet, akkor emelkedett LPP-1 aktivitasú ovárium karcinóma sejt populáció pozitívan befolyásolja a környezetében levő nem transzfektált tumorsejteket is. Ez az adat hasznosítható lehet gén terápiás megoldásoknál, hiszen a bevezetett LPP-1 és LPP-3 a nem transzfektált tumorsejtek

halálát is okozhatja. Ennek bizonyitására egyenlő mennyiségű eredeti és LPP-1-el vagy LPP-3-mal transzfektált sejtet kevertünk össze. Mindkét enzim csökkentette a nem transzfektált tumorsejtek proliferációjat. Ez tovább igazolja azt, hogy a LPP-1 és LPP-3 hatása egy extracelluláris mediátor – LPA – lebontásával hozható összefüggésbe.

A LPP izoenzimek sejtfunkciót befolyásoló hatásukat, úgy tűnik, a LPA lebontással és LPA szignál gátlással érik el. A médiumhoz adott LPA perceken belül változásokat okoz a sejtben. Ezzel ellentétben más kémiai folyamatok – pl. ERK kináz foszforilálás – később és hosszabb idő alatt játszódnak le. Amennyiben feltételezzük, hogy a LPP enzimek hatása a LPA lebontásán keresztül érvényesül, akkor az enzimek fokozott aktivitása várhatóan nem változtatja meg az intracelluláris kálcium szintet, hiszen ez a lépés a degradáció előtt történik a sejtben. Viszont a LPP aktivitás növekedése feltételezhetően csökkenti az ERK foszforilálást. Tanulmányunkban kimutattuk, hogy nem volt különbség a LPA által okozott intracelluláris kálcium mobilizációban az eredeti és a transzfektált sejtek között. Ellenben a tumorsejtek LPP-3 transzfekciója az ERK foszforiláció csúcsának csökkenéséhez és a szint további gyors eséséhez vezetett. Az ERK foszforiláció csökkenése arányban volt a LPP transzfektált és eredeti sejtek LPA lebontásának mértékével.

A LPP enzimek által okozott proliferáció és apoptózis csökkenés *in vitro* hasonlóan megnyilvánult a tumorsejtek megtapadásának és növekedésének jelentős csökkenésében *in vivo*. SKOV3 sejtek szubkután befecskendezése után a kísérleti egerek 90%-ában alakult ki daganat, míg LPP-3-mal dúsított SKOV3 sejtek befecskedezése után ez az arány 40%-ra csökkent. A megtapadt daganatok növekedési rátája ugyanilyen különbséget mutatott a LPP-3 transzfektált és eredeti sejtek között: a SKOV3 sejtekből eredő tumorok mérete 4-szerese volt a LPP-3-mal dúsított SKOV3 sejtekből kialakult daganatok méretének. A peritóneumba fecskendezett daganatok esetében a LPP-3-aktiv minta a kisérleti állatok mindössze 20%-ában tapadt meg, míg az eredeti sejtek minden esetben tumor kialakulásához vezettek. A haskörfogat mérésével megállapítottuk, hogy a tumor növekedését a LPP-3 ugyanilyen arányban befolyásolta a kísérlet korai fázisában. Később azonban a LPP-3-mal dúsított tumorsejtek növekedése újra felgyorsult. Feltételezhető, hogy a jelenséget a LPP-3 szintjének csökkenése okozta. Valóban, amikor ezekben a felgyorsult növekedésű tumorokban a LPP-3 jelenlétét vizsgáltuk, annak

szintjének jelentős csökkenését állapítottuk meg. A LPP-3 szint még az eredeti nem transzfektált sejtvonalban is csökkenést mutatott. Úgy tűnik tehát, hogy *in vivo* a SKOV3 sejtek a transzfektált LPP-3 expresszióját elveszítik. Valoszinű, hogy az ovárium karcinómákban *in vivo* rendkívül erős negatív szelekciós hatás érvényesül a LPP-3 expresszióval szemben.

A LPA metabolizmus rendszere ovárium karcinómákban még számtalan további területet kinál kivizsgálásra. Az ATX/LysoPLD is rendkívül értékes terápiás célpont lehet. Az RNSi hatása az ATX/LysoPLD-re negatív irányban befolyásolhatja a sejtproliferációt és túlélést. Ovárium karcinómára specifikus aktivitással (pl. telomeráz) rendelkező adenovírus vektorok sorozata van már kifejlesztve terápiás célokkal. Több szerző vizsgál LPA receptor szelektív agonista és antagonista molekulákat, de valóban effektív terápiát még senki nem fejlesztett ki.

Végezetül, ezek a vizsgálatok arra utalnak, hogy ennek az autokrin LPA rendszernek kritikus szerepe van az ovárium karcinóma sejtek proliferációjában, motilitásában és életképességében *in vivo*. Ugyanakkor ez az autokrin LPA rendszer potenciális célpont az ovárium és esetleg más karcinómak elleni terápia kifejlesztésében.

MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Az ovárium karcinóma sejtek LPP-1 expressziója jelentősen lecsökkent. Ez hozzájárul a LPA szint extracelluláris emelkedéséhez.
2. Jelentősen csökkent az LPP-1-el és LPP-3-mal transzfektált ovarium karcinóma sejtek kolónia formáló képessége és növekedése *in vitro* és *in vivo*.
3. A LPP-1-el és LPP-3-mal transzfektált ráksejtek csökkentett kolónia formáló képességét az apoptózis ráta jelentős fokozodása okozza a sejtciklus megvaltozása nélkül.
4. Ovárium karcinóma sejtvonalakban rendkívül nehéz stabil LPP-1 és LPP-3 transzfekciót létrehozni. Ennek oka a LPP-1-t és LPP-3-t expresszáló sejtek elleni szelekció.
5. A LPP-1 és LPP-3 hatását az extracelluláris LPA csökkentésével okkozza. Ezt bizonyítja, hogy az OMPT, egy nem hidrolizálható LPA analog, képes megfordítani a LPP-3 kolónia formálásra és apoptózisra kifejtett hatását.
6. A LPP-3 intakt katalitikus aktivitása szükséges a kolónia formálás csökkentéséhez és az apoptózishoz.
7. A LPP-3 transzfektált sejtekben az ERK kinázok foszforilálása jelentősen megváltozott.
8. Mind a LPP-1 és LPP-3 transzfektált sejtek erős bystander hatással rendelkeztek, ami bizonyítja, hogy hatásukat a sejten kívüli LPA lebontásásval érik el.
9. A LPP-1 aktivitásásnak és szintjének növelése az SKOV3 sejtekben jelentősen csökkenti a sejtmotilitást.
10. Ezen adatok alapján a LPA termelése, lebontása, sejtfelszíni receptorai és szignál transzdukciós útvonala kitűnő célpont lehet terápiás módszerek kidolgozására.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Tanyi J**, Tory K, Füzesi L. (1997) Számbeli kromoszóma aberrációk vizsgálata epithelialis petefészek tumorokban. Magyar Nőorvosok Lapja 60:481-487.
2. **Tanyi J**, Tory K, Amo-Takyi B, Fuzesi L. (1998) Frequent loss of chromosome 12 in human epithelial ovarian tumors: A chromosomal in situ hybridization study. Int J Gynecol Pathol, 17: 106-112. **IF: 1.509**
3. **Tanyi J**, Rigó J Jr., Kiscsitári I, Csapó Z. (1998) Juvenilis granulosa sejtes tumorral szövődött terhességek. Magyar Nőorvosok Lapja 61: 451-454.
4. **Tanyi J**, Takács G, Somos P. (1998) Az orális fogamzásgátló tabletták, mint a petefészekrák prevenciója vagy rizikofaktora. Magyar Nőorvosok Lapja 61: 325-329.
5. **Tanyi J**, Rigó J Jr., Csapo Z, Szentirmai Z. (1999) Trisomy 12 in juvenile granulosa cell tumor of ovary during pregnancy: a report of two cases. J Reprod Med, 44: 826-832. **IF: 0.824**
6. **Tanyi J**, Tory K, Rigó J Jr., Nagy B, Papp Z.(1999) Evaluation of the tyrosine kinase domain of the Met proto-oncogene in sporadic ovarian carcinomas. Pathol Oncol Res, 5: 187-191.
7. **Tanyi J**, Rigó J Jr., Kiscsitári I, Csapó Z. (1999) Inhibin és az ovárium granulosasejtes tumora. Magyar Nőorvosok Lapja 62: 227-228.
8. **Tanyi J**, Páy A, Rigó J Jr., Nagy B, Papp Z. (2000) A beta-catenin gén mutáció analízise epithelialis ovárium carcinomákban.Orv Hetil 141: 1115-1119.
9. **Tanyi J**, Rigó J Jr., Páy A, Bán Z. (2001) A gamma-catenin gén jelentõsége és mutáció analízise epithelialis ovárium carcinomákban. Magyar Nőorvosok Lapja 64: 241-245.
10. Mills GB, Eder A, Fang X, Hasegawa Y, Mao M, Lu Y, **Tanyi J**, Tabassam FH, Wiener J, Lapushin R, Yu S, Parrott JA, Compton T, Tribley W, Fishman D, Stack MS, Gaudette D, Jaffe R, Furui T, Aoki J, Erickson JR. (2002) Critical role of lysophospholipids in the pathophysiology, diagnosis, and management of ovarian cancer. Cancer Treat Res, 107: 259-283.

11. Fang X, Yu S, **Tanyi J**, Lu Y, Kazlauskas A, Woodgett JR, Mills GB. (2002) Convergence of multiple signaling cascades at glycogen synthase kinase 3: Edg receptor-mediated phosphorylation and inactivation by lysophosphatidic acid through a protein kinase C-dependent intracellular pathway. Mol Cell Biol, 7: 2099-2110. **IF: 8.840**

12. Fang X, Schummer M, Mao M, Yu S, Tabassam FH, Swaby R, Hasegawa Y, **Tanyi J**, LaPushin R, Eder A, Jaffe R, Erickson J, Mills GB. (2002) Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. Biochim Biophys Acta, 1582: 257-264. **IF: 3.883**

13. **Tanyi J**, LaPushin R, Eder A, Auersperg N, Tabassam FH, Roth JA, Gu J, Fang B, Mills GB, Wolf J. (2002) Identification of tissue and cancer selective promoters for the introduction of genes into human ovarian cancer cells. Gynecol Oncol, 85: 451-458. **IF: 2.115**

14. Cheng KW, **Tanyi J**, Mills GB. (2002) Genomic technologies in cancer research, drug discovery and development. CME J Gynecol Oncol, 7:16-24.

15. Mills GB, Fang X, Lu Y, Hasegawa Y, Eder A, **Tanyi J**, Tabassam FH, Mao M, Wang H, Cheng KW, Nakayama Y, Kuo W, Erickson J, Gershenson D, Kohn EC, Jaffe R, Bast RC, Gray J. (2003) Specific keynote: molecular therapeutics in ovarian cancer. Gynecol Oncol, 88: S: 88-92. **IF: 2.341**

16. **Tanyi JL,** Morris AJ, Wolf JK, Fang X, Hasegawa Y, LaPushin R, Auersperg N, Sigal YJ, Newman RA, Felix EA, Atkinson EN, Mills GB. (2003) The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: Validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer. Cancer Res, 63: 1073-1082. **IF: 8.649**

17. **Tanyi JL,** Hasegawa Y, Lapushin R, Morris AJ, Wolf JK, Berchuk A, Lu K, Smith DI, Kalli K, Hartmann LC, McCune K, Fishman D, Broaddus R, Cheng KW, Atkinson EN, Yamal JM, Bast RC Jr, Felix EA, Newman RA, Mills GB. (2003) Role of decreased levels of LPP-1 in accumulation of lysophosphatidic acid (LPA) in ovarian cancer. Clin Cancer Res, 9: 3534-3545. **IF: 6.511**

18. Umezo-Goto M, **Tanyi JL,** Lahad J, Liu S, Yu S, Lapushin R, Hasegawa Y, Lu Y, Trost R, Beyers T, Jonasch E, Aldape K,Liu J, James RD, Ferguson CG, Xu Y,

Prestwich GD, Mills GB. (2004) Lysophosphatidic acid production and action: Validated targets in cancer? J Cell Biochem, 92:1115-1140. **IF: 2.946**

19. **Tanyi JL,** Crotzer D, Wolf J, Hasegawa Y, Lahad J, Cheng KW, Umezu-Goto M, Prestwich G, Morris AJ, Newman RA, Felix EA, Lapis R, Mills GB. (2006) Functional Lipidomics: Lysophosphatidic acid as a target for molecular diagnosis and therapy of ovarian cancer. Functional Lipidomics.CRC Press/Taylor &Francis, New York:101-123.

Abstracts:

1. **Tanyi J**, Tory K, Amo-Takyi B. Fuzesi L. (1996) Sensitive detection of loss of chromosome 12 in epithelial ovarian tumors by chromosomal in situ hybridization. Pathol Res Practice 192: 138. **IF: 0.882**
2. Yutaka H, Erickson J.R, Lapushin R, Mao M, Eder A, **Tanyi J**, Aoki J, Bandoh K, Fang X, Mills G.B. (2001) A selective EDG7 receptor subtype agonist, 1-Oleoyl-Sn-2-O-Methyl-Rac-Glycero-3-Phosphothionate (OMPT) stimulates the human ovarian cancer cell line OVCAR3. Cancer Res 42: 188. **IF: 8.302**

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Konrád S., **Tanyi J**. (1996) Peripartal hysterectomiák. Orv Hetil, 137: 1127-1133.
2. **Tanyi J**, Rigó J Jr., Szabó I, Hariszi R, Szánthó A. (1997) Petefészekcystákkal szövődött terhességek. Orv Hetil, 138: 2927-2930.
3. Rigó J, Beke A, **Tanyi J**, Hidvégi J. (1997) Preeclampsiával szövődött terhességből császármetszés útján vilgárahozott koraszülöttek mortalitása. Magyar Nőorvosok Lapja 60: 465-470.
4. Bálega J, Szánthó A, **Tanyi J**. (1997) Nőgyógyaszati tumorok korai diagnózisa. Háziorvos Továbbképző Szemle 2: 325-327.
5. **Tanyi J**, Szánthó A, Bálega J. (1997) Nőgyógyászati onkológiai betegek utánkövetése és gondozása. Háziorvos Továbbképző szemle 2: 328-332.
6. Takács Gy, **Tanyi J**, Patkós P, Ádám Zs. (1998) A Müller-cső fejlõdési rendellenességek diagnosztizálása és kezelése. Magyar Nőorvosok Lapja 61: 381-388.
7. Rigó J jr, Nagy B, Tóth T, Beke A, **Tanyi J**, Karádi I. (1998) A leiden mutáció előfordulási gyakorisága preeclampsiával szövődött terhességekben. Magyar Nőorvosok Lapja 61: 197-200.
8. C. Molnár E. Szánthó A, **Tanyi J**. (1998) A nőgyógyászati onkopszichológia alapjai. Lege Art Med, 8: 504-507.
9. C. Molnár E, **Tanyi J**, Tóth-Pál E, Papp Cs. (1998) Dilemmas of genetic counseling during prenatal diagnosis of Fabry disease. Arch Women Mental Health 1: 147-149.
10. Szendei Gy, Inovay J, Somos P, Sziller I, Hidvégi J, **Tanyi J**, Börzsőnyi A, Papp Z. (1998) Place of laparoscopy in infertility - judgment of the pelvic organs anatomical and functional states. Med Sci Monit, 4: 945-950.
11. Rigó J jr, **Tanyi J**, Hupuczi P, Varga I. (1999) Thrombocytopéniával társult súlyos májelégtelenség atypusos lefolyása a harmadik trimesterben. Magyar Nőorvosok Lapja 62: 383-386.

12. **Tanyi J**, Tory K, Bánkfalvi A, Schröder W, Rath W, Füzesi L. (1999) Analysis of p53 mutation and cyclin D1 expression in breast tumors. Pathol Oncol Res 5: 90-94.

13. Rigó J Jr., Nagy B, Fintor L, **Tanyi J**, Beke A, Karádi I, Papp Z. (2000) Maternal and neonatal outcome of preeclamptic pregnancies: the potential roles of factor V Leiden mutation and 5,10 methylenetetrahydropholate reductase. Hyperten in pregnancy, 19: 163-172. **IF: 0.750**

14. Rigó J Jr., Csaba A, **Tanyi J**, Nagy B, Beke A, Varga I. (2000) Terhesség előtti testtömeg index és az intrauterin retardatio összefüggése súlyos praeeclampsiával szövődött terhességekben. Magy Nőorvosok Lapja 63: 273-277.

15. Pusztai L, **Tanyi J**, Hortobágyi GN. (2000) Current status of cytotoxic treatment of breast cancer. CME J Gynecol Oncol 5: 373-381.

16. Rigó J Jr., **Tanyi J**, Varga I, Görbe E. (2000) Atypical process of acute disturbance of liver function with severe thrombocytopenia in the third trimester. Zentralblat Gynacol, 122: 436-438.

17. Tanyi M, Fülöp B, Garami Z, Garai I, **Tanyi J**, Lukács G. (2001) A MIBI scintigráphia szerepe az emlőrák korai diagnosztikájában. Magyar Seb, 54: 118-122.

18. Pusztai L, **Tanyi JL**, Hortobágyi GN. (2005) Current status of cytotoxic treatment of breast cancer, Chapter 20 In: What gynecologic oncologists should know about chemotherapy, Principles and practice of anticancer drug treatment. (Eds) P Bosze, M Markman, EAGC,Budapest: 195-205.

19. **Tanyi JL**, Cheng KW, Lahad JP, Mills GB. (2005) Emerging genomic technology in cancer research: its application in discovering and developing new therapeutic agents. Chapter 6 in: What gynecologic oncologists should know about chemotherapy, Principles and practice of anti-cancer drug treatment. (Eds) P Bősze, M Markman, EAGC, Budapest: 57-69.

20. Coleman NM, Smith-Zagone MJ, **Tanyi JL**, Anderson ML, Coleman RL, Dyson SW, Reed JA. (2006) Primary neuroendocrine carcinoma of the vagina with Merkel cell carcinoma phenotype. Am J Surgical Pathol, 30: 405-410. **IF: 4.144**

21. Tanyi M, Olasz J, Lukács G, Csuka O, Toth L, Szentirmay Z, Ress Z, Barta Z, **Tanyi JL**, Damjanovich L. (2006) Pedigree and genetic analysis of a novel mutation carrier patient suffering from Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. World J Gastroenterology. 12: 1192-1197.

22. Tanyi M, Olasz J, Kámory E, Csuka O, **Tanyi JL**, Ress Z, Damjanovics L. (2008) Difficulty in recognizing families with hereditary non-polyposis colorectal carcinoma. Presentation of 4 families with proven mutations. Accepted, Europ J Surgical Oncol,. **IF: 1.873**

23. **Tanyi JL**, Coleman NM, Johnston ND, Ayensu-Coker L, Rajkovic A. (2008) Placenta percreta at 7th week of pregnancy in a woman with previous cesarean section: Case report. Accepted, J. Obstet Gyneacol, **IF: 0.779**

Összesített impakt factor:	45.164
Elsőszerzős közlemények impact faktora:	20.387
Társszerzős közlemények impact faktora:	24.777