

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**I-es típusú luteinizáló hormon-releasing hormon  
receptor alapú új terápiás lehetőségek és a tumor  
angiogenezisének vizsgálata magas mortalitású  
daganatok esetében**

Molnár-Fodor Klára

Témavezető: Prof. Dr. Halmos Gábor



**DEBRECENI EGYETEM**  
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

**I-es típusú luteinizáló hormon-releasing hormon receptor alapú új terápiás lehetőségek és a tumor angiogenezisének vizsgálata magas mortalitású daganatok esetében**

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

Írta: Molnár-Fodor Klára okleveles biotechnológus MSc

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

Témavezető: Prof. Dr. Halmos Gábor, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Zupkó István, MTA doktora

Dr. Csősz Éva, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem GYTK Biofarmácia Tanszék könyvtára  
2021. június 08. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Mező Gábor, MTA doktora

Dr. Fodor Mariann, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Mező Gábor, MTA doktora

Dr. Fodor Mariann, PhD

Prof. Dr. Zupkó István, MTA doktora

Dr. Csősz Éva, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem, Élettudományi Központ F008-009 tanterem.  
2021. június 08.13 óra

# Tartalomjegyzék

1. Bevezetés .....	3
2. Célkitűzés.....	5
3. Anyagok és módszerek .....	6
3.1 Sejtvonalak és tenyésztési körülményeik.....	6
3.2 Etikai engedélyek, humán szövetminták.....	6
3.3 Az uvealis melanoma daganatokat vizsgáló kísérleteinkhez alkalmazott metodikák mRNS és fehérje szintű vizsgálatokhoz.....	6
3.3.1 LHRH-R expressziójának vizsgálata RT (reverz transzkripció)-PCR-rel OCM3 sejteken és UM szövetmintákon.....	6
3.3.2 A citotoxikus LHRH analóggal és doxorubicinnel történt <i>in vitro</i> kezelések és sejt életképességi vizsgálatok .....	7
3.3.3 A citotoxikus kezeléseket követően indukált génexpressziós változások kvantifikálása RT- qPCR-rel OCM3 sejteken .....	7
3.3.4 Humán uvealis melanoma és normál uvea szövetek MASPIN expressziójának vizsgálata RT-PCR-rel.....	7
3.3.5 Daganat őssejtmarkerek expressziójának vizsgálata RT-PCR-rel uvealis melanoma és normál uvea szövetekből.....	8
3.3.6 LHRH receptor immuncitokémiai detektálása OCM3 sejteken .....	8
3.3.7 OCM3 sejtekből izolált fehérje minták vizsgálata citotoxikus kezelést követően poliakrilamid-gélelektroforézis (PAGE)-Western blottal .....	8
3.3.8 SDS-PAGE-Western blot analízis uvealis melanoma szövetminták vizsgálatára.....	9
3.3.9 Uvealis melanoma szövetminták Tissue microarray (TMA) immunhisztokémiai vizsgálata.....	9
3.4 A húgyhólyag daganatokat vizsgáló kísérleteinkhez alkalmazott metodikák.....	10
3.4.1 RNS izolálás és RT-PCR humán húgyhólyag szövetmintákból és sejtvonalakból az LHRH-R és az LHRH ligand detektálására .....	10
3.4.2 Húgyhólyag szövetminták immunhisztokémiai vizsgálata .....	10
3.4.3 Húgyhólyag szövetminták membránpreparálása és ligandkötési assay .....	10
3.4.4 Húgyhólyag daganat sejtvonalak LRHR-R expressziójának SDS-PAGE-Western blot analízise.....	11
3.5 Statisztikai analízis.....	12
4. Eredmények.....	13
4.1 Az uvealis melanoma és TCC típusú húgyhólyag daganatok LHRH-R és LHRH ligand expressziójának, a receptor ligandkötő képességének vizsgálata RNS és fehérje szinten .....	13
4.1.1 Az LHRH-R expressziójának vizsgálata humán uvealis melanoma szövetmintákon és OCM3 sejtvonalon .....	13
4.1.2 Az 5 µM-os AN-152 (AEZS-108) és az 5 µM-os doxorubicin <i>in vitro</i> kezelések citotoxicitásának vizsgálata OCM3 sejteken .....	13

4.1.3 Az LHRH-R és LHRH ligand mRNS szintű expressziójának vizsgálata húgyhólyag daganat szövetmintákon és sejtvonalakon.....	13
4.1.4 Húgyhólyag karcinóma szövetminták LHRH-R expressziójának immunhisztokémiai analízise és statisztikai kiértékelése .....	14
4.1.5 Húgyhólyag tumorminták LHRH ligandkötési assay vizsgálatának eredményei .....	14
4.1.6 Húgyhólyag karcinóma sejtvonalak LHRH receptor expressziójának vizsgálata fehérje szinten SDS-PAGE-Western blottal.....	14
4.2 Az AEZS-108 és DOX tartalmú in vitro kezelések hatása az angiogenezisben és a metasztázis képzésben részt vevő gének expressziójára uvealis melanoma sejtvonalon.....	15
4.2.1. Az 5 µM-os AEZS-108 (AN-152) kezelés és az 5 µM-os DOX kezelés hatása az angiogenezisben és a metasztázisban részt vevő gének expressziójára OCM3 sejteken.....	15
4.2.2. A MASPIN tumorszupresszor expressziójának és indukciójának vizsgálata uvealis melanoma sejtekben.....	15
4.2.3. A MASPIN és az angiogenezisben részt vevő gének fehérje szintű kifejeződésének változása 5 µM-os AEZS-108 és 5 µM-os doxorubicin kezeléseket követően OCM3 sejtekben .....	15
4.3. Uvealis melanomák daganat összejt tartalmának vizsgálata a tumorok vaszkularizációjának figyelembevételével .....	16
4.3.1. Uvealis melanoma és egészséges uvea szövetminták összejt tartalmára utaló marker gének expressziójának kimutatása mRNS szinten .....	16
4.3.2. Uvealis melanoma szövetminták FZD6, VEGFA és HIF-1A expressziójának vizsgálata, az eredmények statisztikai értelmezése a betegek túlélése és klinikopatológiai jellemzőinek figyelembevételével .....	16
4.3.3. Az uvealis melanoma tumorok sejt típusának összefüggése a túlélési esélyekkel.....	16
4.3.4. Az uvealis melanoma tumorok melanin pigment tartalma és a betegek túlélése közötti kapcsolat vizsgálata.....	17
4.3.5. Az FZD6 expressziója és az uvealis melanomás betegek túlélése közötti összefüggések vizsgálata .....	17
4.3.6. Az angiogén faktorok és az uvealis melanomás betegek túlélése közötti összefüggések vizsgálata.....	17
4.3.7. Az FZD6 és a VEGFA gének egyidejű expressziója közötti korreláció vizsgálata ....	18
4.3.8. Az FZD6, HIF-1A, VEGFA és a melanin pigment expressziója és egyéb patológiai markerek közötti összefüggések vizsgálata .....	18
5. Összefoglalás.....	19
6. Köszönetnyilvánítás .....	22
7. Függelék: Publikált absztraktok és előadások gyűjteménye .....	26

## 1. Bevezetés

A célzott daganatellenes kezelések megjelenése az utóbbi évtized gyógyszerkutatásainak nagy vívmánya. Alapja, hogy a tumorsejteken kifejeződő, olyan molekulát vesz célba, mely normál sejteken nincs jelen, vagy kevésbé kifejezett, így a gyógyszermolekula közvetlenül a hibásan működő daganatsejthez tud kapcsolódni vagy egy kulcsszerepű molekula felvételét tudja így blokkolni. A célzott daganatterápia egyik ígéretes eszköze a peptid hormon alapú gyógyszeres kezelés. Ez esetben maguk a peptid hormonok, mint hordozó gyógyszermolekulák a saját peptid hormon receptoraikon keresztül képesek citosztatikumot vagy radiofarmakont juttatni specifikusan a daganatsejtbe, megkímélve a receptort egyáltalán nem, vagy csak kis mértékben expresszáló egészséges sejteket.

Számos kutatócsoport publikált már eredményeket a luteinizáló hormon-releasing hormon receptorok (LHRH-R) hormonfüggő és nem hormonfüggő daganatokban megfigyelt fokozott expressziójáról, és az LHRH-R célzott daganatterápiás szerekkel való hatékony célbavételéről. *In vitro*, *in vivo* majd klinikai fázis vizsgálatok eredményei is igazolták, hogy az LHRH-R képes az LHRH liganddal konjugált citosztatikum molekulát internalizálni, a leváló citosztatikum pedig szelektíven csak a daganatsejt pusztulását okozni, megkímélve így a szervezet egészséges sejtjeit.

Vizsgálataink fókuszába két olyan nagy mortalitású, gyakori relapsussal járó humán daganat típus, az uvealis melanoma és a húgyhólyag karcinóma LHRH peptid hormon receptor alapú célzott terápiájának új lehetőségeit állítottuk, melyek eddig nem kellően felderített terápiás területek.

Munkánk első részében célul tűztük ki a human uvealis melanoma (UM) és a hólyag karcinóma daganatok LHRH ligand és LHRH-R expressziójának vizsgálatát humán szövetmintákon és sejtvonalakon RT-PCR, immunhisztokémia és immuncitokémia módszerekkel. A húgyhólyag tumoros betegek klinikopatológiai paramétereinek ismeretében elvégeztük az LHRH-R-ok tumor progressziójában betöltött szerepének tanulmányozását is. A receptorok ligandkötési képességét, valamint LHRH-R specifikus célzott daganatterápiás szerekkel való célbavételének lehetőségét radioligand kötési assay-vel, ligandkompetíciós assay-vel, illetve sejt életképességi vizsgálattal tanulmányoztuk a kiválasztott daganat típusokon.

Ezt követően vizsgálatainkat az LHRH-R specifikus citotoxikus kezelést követő jelátviteli folyamatok tanulmányozásával folytattuk, kiemelten az UM daganatok vérérképzésben és migrációban részt vevő génjeinek vizsgálatával. Mivel nem ismert, hogy az AEZS-108 OCM3 UM sejteken való használatakor a doxorubicin (DOX) indukálta ROS-on (reaktív oxigén gyökök) kívül milyen jelátviteli folyamatok indulnak el a receptor- ligand interakciónak köszönhetően, valamint, hogy milyen jelátviteli folyamatok segítik a daganatsejt pusztulását, így munkánk során célul tűztük ki ezen jelátviteli folyamatok feltérképezését. Mivel az uvealis melanoma daganatokra fokozott

vaszkularizáció és korai áttétképzés jellemző, így elsősorban ezekben a folyamatokban részt vevő gének expressziós változásait vizsgáltuk meg a citotoxikus LHRH liganddal való kezelést követően.

Az angiogenezis UM daganatok progressziójában betöltött kiemelt szerepét ismerve vizsgálatainkat további, új célzott terápiás célpontok, a daganat őssejtek vizsgálatának irányába folytattuk. A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A (VEGFA) és a hipoxia indukciós faktor 1 alfa alegység (HIF-1A) fokozott expresszióját számtalanszor bizonyították már UM szövetmintákban. Azonban, az UM daganatos betegekkel indított, VEGF inhibitorok hatását vizsgáló klinikai fázis vizsgálatok paradox eredményei miatt mégsem állítható biztosan, hogy a VEGFA lenne a kulcs szereplő a daganat angiogenezisében. Vizsgálataink alap felvetése volt, hogy a VEGFA gén expressziójának komplex jelátviteli útvonalaiba bekapcsolódhatnak-e a daganat őssejtek, segítve ezzel a daganatsejtet az aktuális terápiás kezeléshez vagy épp a hematogén áttétképzéshez való alkalmazkodásban?

## 2. Célkitűzés

Vizsgálataink fókuszába az LHRH-R pozitív humán uvealis melanómák és a hólyag karcinómák új célzott terápiás lehetőségeinek feltérképezését állítottuk, valamint az uvealis melanoma daganatok angiogenezisében részt vevő gének expressziójának vizsgálatát.

Munkánk első fázisában uvealis melanoma (UM) és a hólyag karcinóma daganatok LHRH ligand és LHRH-R expresszióját vizsgáltuk humán szövetmintákon és sejtvonalakon RT-PCR, immunhisztokémia és immuncitokémia módszerekkel. A húgyhólyag tumoros betegek klinikopatológiai paramétereinek ismeretében elvégeztük az LHRH-R-ok tumor progressziójában betöltött szerepének tanulmányozását is.

A receptorok ligandkötési képességét, valamint LHRH-R specifikus célzott daganatterápiás szerekkel való célbavételének lehetőségét radioligand kötési assay-vel, ligandkompetíciós assay-vel, illetve sejt életképességi vizsgálattal tanulmányoztuk a kiválasztott daganatokon. Ezt követően vizsgálatunkat az LHRH-R specifikus citotoxikus kezelést követő jelátviteli folyamatok tanulmányozásával folytattuk, kiemelten az UM daganatok véréreképésben és migrációban részt vevő génjeinek vizsgálatával. Megvizsgáltuk, hogy az AEZS-108 (AN-152) OCM3 UM sejteken való *in vitro* alkalmazásakor milyen jelátviteli folyamatok segítik a daganatsejt pusztulását. A tapasztalt változásokat összevetettük humán UM szövetminták génextpressziós profiljával is. Vizsgálatainkat RT-PCR-rel, RT-qPCR és SDS-PAGE-Western blot módszerekkel végeztük OCM3 sejteken és humán UM szövetmintákon.

Kutató munkánk folytatásában az uvealis melanómák daganat őssejt tartalma és a vaszkularizációjuk szabályozása közötti összefüggéseket vizsgáltuk a betegek túlélésének tükrében enukleált UM tumormintákon. Először UM és normal uvea szövetminták nestin, NGFR, SOX10, FZD6 és PROM1 őssejtmarkereinek expresszióját vizsgáltuk meg RT-PCR-rel. Az eredményeket összevetettük a műtét előtt Ruthénium-applikátor kezelésben részesült, és a nem részesült betegek között. Vizsgálatainkat a továbbiakban 52 paraffin blokkba ágyazott, enukleált UM szövetminta FZD6, HIF-1A és VEGFA expressziójának immunhisztokémiai (IHC) vizsgálatával folytattuk. Statisztikai módszerekkel korreláció analízist végeztünk a gének expressziója között, majd az eredményeket összevetettük a betegek túlélési idejével egyéb klinikopatológiai paramétereivel.

### **3. Anyagok és módszerek**

#### **3.1 Sejtvonalak és tenyésztési körülményeik**

Az OCM3 humán uvealis melanoma, valamint a RT-112, UMUC3 és TCCSUP humán hólyagkarcinóma sejtvonalakot egyaránt 10%-os FBS-t, 1% L-glutamint és 1% antibiotikumot tartalmazó RPMI 1640 tápfolyadékban, 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó, 37°C-os, 90% páratartalmú inkubátorban tenyésztettük.

#### **3.2 Etikai engedélyek, humán szövetminták**

A felhasznált humán uvealis melanoma és húgyhólyag karcinóma szövetminták gyűjtése az egyetemi Etikai Bizottság engedélyével történt a Debreceni Egyetem, Klinikai Központjának Szemklinikáján, illetve Debreceni Egyetem, Klinikai Központjának Urológiai Klinikáján. A kontrollként használt humán hipofízis, egészséges anyajegy, máj, placenta és vese minták a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Patológia Intézete által gyűjtött és felajánlott minták voltak. A sebészi eltávolítást követően a minták általunk felhasználásra kerülő része vagy paraffin blokkokba került beágyazásra, vagy -70 °C-on tároltuk azokat felhasználásig.

#### **3.3 Az uvealis melanoma daganatokat vizsgáló kísérleteinkhez alkalmazott metodikák mRNS és fehérje szintű vizsgálatokhoz**

##### **3.3.1 LHRH-R expressziójának vizsgálata RT (reverz transzkripció)-PCR-rel OCM3 sejteken és UM szövetmintákon**

Az OCM3 sejtekből és UM szövetmintákból RNS izolálást végeztünk az AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával a gyártói utasítások szerint. A reverz transzkripciót mintánként 500 ng RNS QuantiTect Reverse Transcription kittel (Qiagen, Németország) való átírásával végeztük. A PCR reakciót LHRH-R specifikus primerpárral (Sigma-Aldrich Corporation, USA) végeztük el. A PCR termékeket gélelektroforézissel 1,5%-os GelRed (Biotinum, USA) tartalmú agaróz gélen szeparáltuk, majd UV fény alatt detektáltuk.

### **3.3.2 A citotoxikus LHRH analóggal és doxorubicinnel történt *in vitro* kezelések és sejt életképességi vizsgálatok**

Az OCM3 sejtek *in vitro* kezeléséhez felhasznált [D-Lys<sup>6</sup>]LHRH analógot (Æterna Zentaris, Frankfurt am Main, Németország), a doxorubicinnel kapcsolt [D-Lys<sup>6</sup>]LHRH analóg AEZS-108-at (AN-152) (Æterna Zentaris, Frankfurt am Main, Németország) és a Doxorubicin HCl-ot (2 mg/ml, TEVA Gyógyszergyár Zrt.) 0,01 M oldott ecetsav tartalmú NaCl-ban (Salsol-A, TEVA Gyógyszergyár Zrt., Magyarország) 100 µM végkoncentrációjú oldatra hígítottuk. Korábbi toxicitási vizsgálatok eredményei alapján az *in vitro* sejt kezelés során a tápfolyadék 5 µM-os hígításban tartalmazta az említett vegyületeket. A kezeléseket követően totál mRNS és fehérje izolálást, vagy MTS assay-t végeztünk.

A kezelések citotoxicitásának meghatározására sejt életképességi vizsgálatot (MTS assay-t) végeztünk a CellTiter 96 AQueous One Solution Assay felhasználásával (Promega, Madison, WI). Az eredményeket 490 nm-en FLUOstar Optima Counter (BMG Labtech GmbH, Németország) készüléken mértük le.

### **3.3.3 A citotoxikus kezeléseket követően indukált génexpressziós változások kvantifikálása RT-qPCR-rel OCM3 sejteken**

A citotoxikus kezelések után az OCM3 sejtekből totál RNS-t izoláltunk TRIzol reagenssel (MRC, USA) a gyártói utasításoknak megfelelően. Ezt követően 500 ng RNS-t cDNS-sé írtunk át IScript Reverse Transcriptase Kit (Bio-Rad Laboratories, USA) felhasználásával. A kvantitatív PCR vizsgálatokat MyiQ2 real time PCR (BIO-RAD, USA) készüléken végeztük Human Angiogenesis 96 StellArray™ (Lonza Ltd., USA) plate-ek felhasználásával. Az array reakciókhoz, illetve a további MASPIN qPCR vizsgálatokhoz közegként SYBR Green Supermixet (Bio-Rad Laboratories, USA) használtunk a gyártó utasítása szerint. Az eredményeket az array esetében gyártói utasításoknak megfelelően Global Pattern Recognition algoritmussal (Bar Harbor Bio Technology Inc.'s, USA) normalizáltuk és  $2^{40-Ct}$  módszerrel kvantifikáltuk. A MASPIN vizsgálata esetében β-aktin és HPRT expresszióra normalizáltuk és szintén  $2^{40-Ct}$  módszerrel kvantifikáltuk.

### **3.3.4 Humán uvealis melanoma és normál uvea szövetek MASPIN expressziójának vizsgálata RT-PCR-rel**

RNS izolálást végeztünk a szövetekből az AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával a gyártói utasítások szerint. Ezt követően 500 ng RNS-t írtunk át cDNS-sé QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Németország) felhasználásával. A PCR

reakciót MASPIN specifikus primerpárral (Sigma- Aldrich Corporation, USA) végeztük el. A PCR termékeket gélelektroforézissel 1,5%-os GelRed (Biotinum, USA) tartalmú agaróz gélen szeparáltuk, majd UV fény alatt detektáltuk.

### **3.3.5 Daganat őssejtmarkerek expressziójának vizsgálata RT-PCR-rel uvealis melanoma és normál uvea szövetekből**

A 18 fagyasztott uvealis melanoma szövetmintából és 3 normál uvea szövetmintából totál RNS izolálást végeztünk az AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával a gyártói utasítások szerint. A reverz transzkripciót mintánként 250-500 ng RNS átírásával, QuantiTect Reverse Transcription kittel (Qiagen, Németország) végeztük. A PCR reakciót nestin, NGFR, SOX10, FZD6 és PROM1 őssejtmarkerekre specifikus primerpárokkal (Sigma-Aldrich Corporation, USA) végeztük el. A PCR termékeket gélelektroforézissel 1,5%-os GelRed (Biotinum, USA) tartalmú agaróz gélen szeparáltuk, majd UV fény alatt detektáltuk.

### **3.3.6 LHRH receptor immuncitokémiai detektálása OCM3 sejteken**

25 000db OCM3 sejtet szélesztettünk és inkubáltunk tápfolyadékban 24 órán keresztül, majd másnap a sejtek felszínét hideg PBS-sel átmostuk. Ezt követően 4 °C-os hideg metanollal fedőlemezre fixáltuk a sejteket. Az endogén peroxidázok blokkolására 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-val inkubáltuk a sejteket, majd 0,1% Triton X-100/PBS oldattal permeabilizáltuk a sejteket, és blokkoltuk az aspecifikus kötőhelyeket 1% FBS –0,1% Triton X-100/PBS oldattal való inkubációval. Az LHRH membrán receptor detektálására anti-humán LHRH-R (FL328, sc-13944 Santa Cruz, USA) antitestet alkalmaztunk 1:100 hígításban. A bekötődött primer antitesteket anti rabbit-HRP-vel (tormaperoxidáz) kapcsolt szekunder antitesttel jelöltük (EnVision FLEX /HRP, EnVision+ kit, DM822, Dako, Dánia). Az előhívás mikroszkópos ellenőrzés mellett DAB Substrate puffer + Chromogen (Agilent Technologies, USA) segítségével történt.

### **3.3.7 OCM3 sejtekből izolált fehérje minták vizsgálata citotoxikus kezelést követően poliakrilamid-gélelektroforézis (PAGE)-Western blottal**

A kezeléseket követően a sejtvonalakból izolált fehérjéket 12%-os SDS (nátrium-dodecilszulfát) tartalmú PAGE-gélen szeparáltuk, majd PVDF (polivinilidén fluorid) vagy nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránok blokkolását az elsődleges antitestettek való inkubáció követte. A HIF-1A antitestet (H-206, sc-10790, Santa Cruz, USA) 1:200 hígításban, a MASPIN antitestet (C-8, sc- 271694, Santa Cruz, USA) 1:100 hígításban, a VEGFA antitestet (A-20; sc-152,

Santa Cruz, USA) 1:100 hígításban, a VEGFB antitestet (MM0008-7B43; sc-101581, Santa Cruz, USA) 1:200 hígításban, a GAPDH (D16H11 XP(R)), Cell Signaling Technology, USA) és a  $\beta$ -aktin (I-19, sc-1616, Santa Cruz, USA) antitesteket 1:1000 hígításban alkalmaztuk 24 órás, 4°C-os inkubációval. Szekunder antitestként alkalikus foszfatázzal (AP) vagy HRP-vel kapcsolt antitesteket használtunk (Santa Cruz Biotechnology, USA), előhívó oldatként pedig AP Conjugate Substrate Kitet (Bio-Rad Laboratories, USA) vagy WesternBright™ ECL Substrate Kitet (Advantra Corporation, USA) használtunk. Az eredmények detektálására és kvantifikálására a Molecular Image Chemidoc XRS+ rendszert és Image Lab Software 5.2- t (Bio-Rad Laboratories, USA) használtuk.

### **3.3.8 SDS-PAGE-Western blot analízis uvealis melanoma szövetminták vizsgálatára**

A vizsgálat során az előző pontban ismertetett protokoll szerint szeparáltuk, majd blottoltuk és detektáltuk a fehérjéket. A primer antitestetek való inkubáció során az alábbi szerint antitesteket és hígításokat alkalmaztuk: HIF-1A antitestet (H-206, sc-10790, Santa Cruz, USA) 1:200 hígításban, a VEGFA antitestet (A-20; sc-152, Santa Cruz, USA) 1:100 hígításban, az FZD6 antitestet (E-19; sc-32148, Santa Cruz, USA) 1:100 hígításban, és a GAPDH (D16H11 XP(R)), Cell Signaling Technology, USA) antitestet 1:1000 hígításban. Szekunder antitestként alkalikus foszfatázzal kapcsolt antitesteket használtunk (Santa Cruz Biotechnology, USA), előhívó oldatként pedig AP Conjugate Substrate Kitet (Bio-Rad Laboratories, USA) használtunk.

### **3.3.9 Uvealis melanoma szövetminták Tissue microarray (TMA) immunhisztokémiai vizsgálata**

A formalin fixált, paraffin blokkokba öntött szövetmintákból TMA-blokkok (2db) készültek (TMA Master készülék, 3DHISTECH, Budapest, Magyarország). A blokkokból készült metszeteken deparaffinizálást, etanolos rehidrációt, endogén peroxidáz blokkolást, hőindukált epitóp feltárást és aspecifikus kötőhely blokkolást végeztünk, majd 24 órán keresztül 4°C-os nedves kamrában inkubáltuk a metszeteket a primer antitestekkel. A HIF-1A antitestet (Pab50130, Covalab, Villeurbanne, Franciaország) 1:3000 hígításban, VEGFA antitestet (A-20; sc-152, Santa Cruz, USA) 1:100 hígításban, az FZD6 antitestet (E-19; sc-32148, Santa Cruz, USA) 1:100 hígításban használtuk. Szekunder antitestként HRP-vel kapcsolt antitesteket használtunk. A minták melanin tartalmára tekintettel lilás színű jelet adó előhívót használtunk (VectorVIP DAB+ Chromogen Substrate Kit, SK-4600, Vector® Labs, UK), a háttér festésére pedig metilzöldet (H-3402, Vector® Labs, UK) alkalmaztuk. Az eredmények digitalizálása a Panoramic Scan készülékkel történt, a kiértékeléskor Panoramic Viewer szoftvert (3DHISTECH Ltd., Magyarország) használtunk.

### **3.4 A húgyhólyag daganatokat vizsgáló kísérleteinkhez alkalmazott metodikák**

#### **3.4.1 RNS izolálás és RT-PCR humán húgyhólyag szövetmintákból és sejtvonalakból az LHRH-R és az LHRH ligand detektálására**

A szövetmintákból és sejtvonalakból totál RNS izolálást végeztünk a Nucleospin Total RNA and Protein Isolation Kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) felhasználásával a gyártói utasítások szerint. A reverz transzkripciót mintánként 150- 200 ng RNS felhasználásával oligo (dT) 15 primer és MMLV reverz transzkriptáz tartalmú közegben végeztük. Háztartási génként a  $\beta$ -aktint használtuk. Az LHRH-R, az LHRH ligand és a  $\beta$ -aktin felszaporítására specifikus primerpárokat használtunk (Sigma-Aldrich Corporation, USA). A PCR termékeket gélelektroforézissel 1,5%-os GelRed (Biotinum, USA) tartalmú agaróz gélen szeparáltuk, majd UV fény alatt detektáltuk.

#### **3.4.2 Húgyhólyag szövetminták immunhisztokémiai vizsgálata**

A vizsgálat során formalin fixált, paraffin blokkokba öntött szövetminták 2-3  $\mu$ m-es metszeteivel dolgoztunk. A deparaffinizálást, az etanolos rehidrációt és a hőindukált epitóp feltárását és a blokkolást követően inkubáltuk a metszeteket az az LHRH-R specifikus primer antitesttel (mAB; NCL-GnRHR A9E4; Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, Egyesült Királyság), melyet 1: 20 hígításban alkalmaztunk. A specifikus kötődések vizualizálására DAB (diamino-benzidin)-festést alkalmaztunk. A metszetek háttérfestésére Mayer's hematoxin oldatot alkalmaztunk. Az eredményeket 12 Mpixel digitális kamerával felszerelt Leica-DM2500 mikroszkóppal rögzítettük (Leica-Microsystems, Newcastle, Egyesült Királyság).

#### **3.4.3 Húgyhólyag szövetminták membránpreparálása és ligandkötési assay**

A hólyagkarcinóma szövetből preparált membránokon (150  $\mu$ l végtérfogatban, 60-150  $\mu$ g fehérje/minta) expresszálandó LHRH-R-ok ligandkötési vizsgálataihoz a radioaktívan jódzott LHRH analógot ( $[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$  LHRH) használtuk, melyet chloramine-T módszerrel állítottunk elő és reverz fázisú HPLC-vel tisztítottunk. A vizsgálat során direkt leszorítási ún. ligand kompetíciós assayt végeztünk a  $[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$  LHRH-val és a jelöletlen LHRH liganddal, ily módon mértük a membránfrakciókban lévő aktív LHRH-R-ok ligandkötési tulajdonságait. Továbbá, elvégeztük a leszorítási ligand kompetíciós assay-t a nem radioaktív LHRH ligandot helyettesítve más nem radioaktív LHRH analógokkal is, mint az LHRH agonista analóg  $[\text{D-Lys}^6]$ LHRH- val, ennek citotoxikus DOX- kapcsolt formájával az AN-152-vel ( $[\text{D-Lys}^6]$ LHRH- DOX), az LHRH antagonistá

analóg Cetrorelix-szel ([Ac-D-Nal(2)<sup>1</sup>,DPhe(4Cl)<sup>2</sup>,D-Pal(3)<sup>3</sup>,D-Cit<sup>6</sup>,D-Ala<sup>10</sup>]LHRH), valamint nem LHRH-R specifikus jelöletlen peptidekkel (szomatosztatin, human hGH, GHRH, VIP, epidermális növekedési faktor). A mintákat duplikákban inkubáltuk 70-90,000 cpm (counts per minute (percenkénti beütésszám)) [<sup>125</sup>I][D-Trp<sup>6</sup>] LHRH liganddal, ezt követően 10<sup>-12</sup>–10<sup>-6</sup> M koncentrációban alkalmazott jelöletlen LHRH ligandokkal szorítottuk le az LHRH-R-okról. Az inkubációt követően 125 µl-t pipettáztunk a szuszpenzióból 1 ml jéghideg, 1,5%-os BSA tartalmú kötő-puffer felszínére szilikonnal bevont polipropilén csőbe, majd centrifugálás után a cső levágott alsó részét a pellettel együtt gamma-számláló készüléken lemértünk. A mért radioaktivitásból a minták receptor kötési affinitását és koncentrációját az IC<sub>50</sub> érték, a disszociációs konstans (K<sub>d</sub>) és a receptor maximális kötő kapacitása (B<sub>max</sub>) értékek felhasználásával, a LIGAND-PC (Munson and Rodbard) program használatával határoztuk meg.

#### **3.4.4 Húgyhólyag daganat sejtvonalak LRHR-R expressziójának SDS-PAGE-Western blot analízise**

A RT-112, UMUC3 és TCCSUP húgyhólyagkarcinóma sejtvonalak sejt lizátumát proteáz inhibitor hozzáadása mellett 4x-es Laemmli-pufferben oldottunk be. A fehérjéket 12%-os SDS-PAGE-sel szeparáltuk, majd PVDF membránra transzferáltuk. A membránok blokkolását az elsődleges antitestekkel való inkubáció követte, melyhez anti-LHRH-R (sc-13944 rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) antitestet használtunk 1:200 hígításban, valamint anti-GAPDH (D16H11 rabbit monoclonal; Cell Signaling Technology, USA) 1:1000 hígításban. Másodlagos antitestként HRP-kapcsolt anti-mouse IgG másodlagos antitestet (Thermo Fisher Scientific, USA) használtunk 1:1000 hígításban. Előhívó oldatként WesternBright™ ECL Substrate Kitet (Advantra Corporation, USA) használtunk. Az eredmények detektálására és kvantifikálására a Molecular Image Chemidoc XRS+ rendszert és Image Lab Software 5.2- t (Bio-Rad Laboratories, USA) használtuk.

### 3.5 Statisztikai analízis

Az MTS assay-k, az RT-qPCR analízisek és a Western blot eredmények statisztikai kiértékelését Prism 5 szoftverrel (GraphPad Software, Inc., USA) és IBM SPSS Statistics programmal (IBM Corp. Released 2014. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.) végeztük Student t-próba és egy-utas ANOVA tesztek alkalmazásával. Az RT-qPCR array eredményeit a Global Pattern Recognition algoritmussal (Bar Harbor Bio Technology Inc.'s, USA) normalizáltuk és  $2^{40-Ct}$  módszerrel kvantifikáltuk. Az immunhisztokémiai festések eredményeit a betegek túlélési adataival és egyéb klinikopatológiai jellemzőivel IBM SPSS Statistics programmal vizsgáltuk, Spearman-féle korreláció és Kaplan-Meier túlélés analízis alkalmazásával. A húgyhólyagminták LRHR-R expressziója és a tumorstátusz/grádus közötti korreláció analízist Excel táblázatkezelő programban elvégzett Pearson analízissel készítettük.

## **4. Eredmények**

### **4.1 Az uvealis melanoma és TCC típusú húgyhólyag daganatok LHRH-R és LHRH ligand expressziójának, a receptor ligandkötő képességének vizsgálata RNS és fehérje szinten**

#### **4.1.1 Az LHRH-R expressziójának vizsgálata humán uvealis melanoma szövetmintákon és OCM3 sejtvonalon**

Munkánk során 6 darab enukleációval eltávolított, fagyasztott uvealis melanoma szövetminta, illetve az *in vitro* tenyésztett OCM3 sejtek LHRH-R expresszióját vizsgáltuk. RT-PCR reakcióval sikerült igazolnunk a receptor expresszióját 4 szövetmintában és az OCM3 sejtekben is. A receptor fehérje szintű kifejeződését immuncitokémiával igazoltuk az OCM3 sejteken, a DAB-immunoperoxidáz festés egyértelműen jelezte az LHRH-R membrán, citoszolikus és részleges sejtmagi lokalizációját. A szövetminták IHC módszerrel vizsgált receptor expressziójáról korábbi publikációnkban számoltunk be.

#### **4.1.2 Az 5 $\mu$ M-os AN-152 (AEZS-108) és az 5 $\mu$ M-os doxorubicin *in vitro* kezelések citotoxicitásának vizsgálata OCM3 sejteken**

A kezelések után elvégzett MTS assay eredményei szerint a 24 órás kezelés során az AN-152 36,3%-al, míg a doxorubicin 62,9%-al csökkentette az élő sejtek számát. A 48 órás kezelést követően már nem tapasztaltunk ilyen számottevő különbséget, így az AN-152 84,7%-al, míg a doxorubicin 89,7%-al csökkentette az élő sejtek számát, ekkorra a két szer toxicitása közötti különbségek mérséklődnek.

#### **4.1.3 Az LHRH-R és LHRH ligand mRNS szintű expressziójának vizsgálata húgyhólyag daganat szövetmintákon és sejtvonalakon**

Az RT-PCR vizsgálatok során az LHRH-R expresszióját a minták 83%-ánál (20/24 minta), valamint mindhárom sejtvonal esetében igazoltuk. Az LHRH ligand expresszióját a szövetminták 79%-ában (19/24 minta) és mindhárom sejtvonal esetében sikerült kimutatnunk.

#### **4.1.4 Húgyhólyag karcinóma szövetminták LHRH-R expressziójának immunhisztokémiai analízise és statisztikai kiértékelése**

Mind a 12 szövetminta esetében sikerült a receptor fehérje szintű jelenlétét igazolni, azonban különböző intenzitást tapasztaltunk a receptorok festődésekor. Az eredmények vizuális kiértékelésekor arra a következtetésre jutottunk, hogy az LHRH-R expressziója a tumor grádusának növekedésével csökken, tehát jóval magasabb expressziót mutattak az alacsonyabb grádusba sorolt tumorminták, mint az előrehaladottabb állapotú (3-4. grádus) tumorok. A megfigyelésünket Pearson analízissel is alátámasztottuk, mely szerint az LHRH-R expressziója negatív korrelációban állt a vizsgált szövetminták patológiai grádusával ( $r=-0,91$ ,  $n=12$ ). A betegek kora nem állt semmilyen összefüggésben a receptor státusszal. A megvizsgált 3 egészséges húgyhólyag szövetminta negatívnak bizonyult LHRH-R expresszió tekintetében.

#### **4.1.5 Húgyhólyag tumorminták LHRH ligandkötési assay vizsgálatának eredményei**

Vizsgálatainkban 12 szövetminta LHRH membrán receptorának ligand kötési értékeit vizsgáltuk radioaktív [ $^{125}\text{I}$ ][D-Trp<sup>6</sup>] LHRH felhasználásával. 10 betegmintából izolált LHRH-R volt képes *in vitro* környezetben a nagy affinitással kötődő radioligand megkötésére. A mérések alapján a 10 szövetminta átlagos disszociációs konstansa (Kd) 4,98 nM (3,61- 6,85 nM tartományban) volt, a maximális kötési kapacitásuk (Bmax) 473,09 fmol/mg membrán protein (255,0 -721,4 fmol/mg protein tartományban) értéket mutatott. A leszorításos ligand kompetíciós assay eredményeiből elmondható, hogy mindegyik nem- radioaktív LHRH vegyület képes volt az LHRH-R- hoz kötődni nanomolos koncentrációban. A jövőbeli potenciálisan alkalmazható új terápiák szempontjából biztató eredmény, hogy az AN-152 affinitása csak kis mértékben tért el a szabad „carrier- ligandjának”, a [D-Lys<sup>6</sup>]LHRH kötődési affinitásától.

#### **4.1.6 Húgyhólyag karcinóma sejtvonalak LHRH receptor expressziójának vizsgálata fehérje szinten SDS-PAGE-Western blottal**

Vizsgálataink során sikerült igazolnunk az RT-112, UMUC3 és a TCCSUP sejtvonalakban az LHRH-R fehérje szintű megjelenését is. A fehérje szintű expresszió összhangban áll a korábban igazolt mRNS szintű receptor expresszióval.

## **4.2 Az AEZS-108 és DOX tartalmú *in vitro* kezelések hatása az angiogenezisben és a metasztázis képzésben részt vevő gének expressziójára uvealis melanoma sejtvonalon**

### **4.2.1. Az 5 $\mu$ M-os AEZS-108 (AN-152) kezelés és az 5 $\mu$ M-os DOX kezelés hatása az angiogenezisben és a metasztázisban részt vevő gének expressziójára OCM3 sejteken**

Kísérleteinkben 94, az angiogenezisben részt vevő gén kifejeződését vizsgáltuk a kezeletlen és az 5  $\mu$ M AEZS-108-al kezelt OCM3 sejteken RT-qPCR-array-vel. A kvantitatív RT-PCR array eredményei szerint a kontroll OCM3 mintákhoz képest az AEZS-108-al kezelt mintákban 5 gén expressziójában szignifikáns emelkedést, 7 gén expressziójában pedig szignifikáns csökkenést tapasztaltunk ( $p < 0,05$ ). A legjelentősebb változást az upregulált gének közül a SERPINB5/MASPIN tumorszupresszor esetében (203,19-szeres expresszió növekedés), míg a downregulált gének közül a daganat progressziójában központi szerepű HIF-1A gén esetében (8,67-szeres expresszió csökkenés) tapasztaltuk.

### **4.2.2. A MASPIN tumorszupresszor expressziójának és indukciójának vizsgálata uvealis melanoma sejtekben**

18 fagyasztott uvealis melanoma és 3 normál uvea szövetmintán vizsgáltuk a MASPIN gén alap expresszióját RT PCR-rel, mely eredmények alapján a szövetminták nem mutattak detektálható mennyiségben MASPIN expressziót. Ezt követően megvizsgáltunk, hogy a tumorszupresszor 5  $\mu$ M-os AEZS-108 (AN-152) kezelés hatására tapasztalt jelentős mértékű indukcióját, hogy az LHRH receptor-ligand kölcsönhatás is fokozta-e, vagy az upreguláció csupán a doxorubicin működésének köszönhető. Az 5  $\mu$ M-os AEZS-108, [D-Lys<sup>6</sup>]LHRH analóg és doxorubicin 24 órás *in vitro* kezeléseket követő RT-qPCR méréseink igazolták, hogy önmagában az LHRH ligand bekötődése a receptorhoz nem indukálja a MASPIN tumorszupresszort (\*\* $p < 0,005$ ). A gén upregulációja kizárólag a doxorubicinhez köthető, azonban az AEZS-108 kezelés szignifikánsan magasabb expressziót váltott ki, mint a megegyező dózisú doxorubicin kezelés (\* $p < 0,05$ ).

### **4.2.3. A MASPIN és az angiogenezisben részt vevő gének fehérje szintű kifejeződésének változása 5 $\mu$ M-os AEZS-108 és 5 $\mu$ M-os doxorubicin kezeléseket követően OCM3 sejtekben**

A fehérje analízis során kimutattuk, hogy az mRNS szintű változások összhangban vannak a gének fehérje szintű megjelenésével. Az AEZS-108 erőteljesebb upregulációját okozta a MASPIN tumorszupresszornak, mint a vele megegyező dózisban alkalmazott doxorubicin. Ezenkívül, fehérje

szinten is igazoltuk, hogy mind az AEZS-108, mind a doxorubicin szignifikánsan képes a HIF-1A, VEGFA és a VEGFB gének kifejeződésének csökkentésére.

### **4.3. Uvealis melanomák daganat őssejt tartalmának vizsgálata a tumorok vaszkularizációjának figyelembevételével**

#### **4.3.1. Uvealis melanoma és egészséges uvea szövetminták őssejt tartalmára utaló marker gének expressziójának kimutatása mRNS szinten**

Vizsgálataink során 18 fagyasztott human uvealis melanoma és 3 egészséges uvea szövetmintában vizsgáltuk a nestin, NGFR, SOX10, FZD6 és PROM1 őssejtmarkerek expresszióit RT-PCR-rel, majd az eredményeket denzitometriás analízissel vetettük össze. A normál uvea szövetek kisebb mértékben ugyan, de mindegyik őssejtmarkerre pozitivitást mutattak. A daganatos szövetekben erőteljesebb expresszióját tapasztaltuk ezeknek a markereknek. A nestin és a SOX 10 markerek esetében szignifikáns különbséget (nestin:  $p=0,007$ ; SOX10  $p=0,004$ ) tapasztaltunk a normál uvea és az uvealis melanoma minták őssejtmarker expresszióját összevetve. A vizsgált 18 tumoros szövetből a minták 100%-a volt pozitív a nestin, SOX10 és FZD6 őssejtmarkerekre, míg a PROM1-et a minták 82%-a, az NGFR-t pedig a minták 94%-a expresszálta. A műtétét megelőző Ruthénium-applikátor kezelés nem volt hatással a szövetek daganat őssejtmarker expressziójára.

#### **4.3.2. Uvealis melanoma szövetminták FZD6, VEGFA és HIF-1A expressziójának vizsgálata, az eredmények statisztikai értelmezése a betegek túlélése és klinikopatológiai jellemzőinek figyelembevételével**

Az immunfestések a TMA blokkba foglalt tumorminták közül FZD6 esetében 52 mintánál, HIF-1A esetében 50 mintánál, VEGFA esetében 48 mintánál voltak kiértékelhetőek.

#### **4.3.3. Az uvealis melanoma tumorok sejttípusának összefüggése a túlélési esélyekkel**

A szövetminták tumor sejttípus besorolását és a betegek túlélési idejét összevető Kaplan-Meier túlélési analízis szerint az epiteloid sejttípus rosszabb prognózisra hajlamosító tényező (Mantel Cox test,  $n=49$ ,  $p=0,02$ ), mint az orsósejtes vagy a kevert sejttípus.

#### **4.3.4. Az uveális melanoma tumorok melanin pigment tartalma és a betegek túlélése közötti kapcsolat vizsgálata**

52 uveális melanoma minta melanin tartalmát vizsgáltuk meg a minták metilzöld festése mellett, mely eredmények alapján 10 esetben (20,4%) 3+ intenzitást, 13 esetben (26,53%) 2+ intenzitást, 20 esetben (40,81%) 1+ intenzitást tapasztaltunk, illetve 6 esetben (12,24%) nem tudtunk detektálható mennyiségű melanint kimutatni. A minták melanin tartalma és a betegek túlélési adatai alapján készített Kaplan-Meier túlélési analízis alapján az 1+ melanin expressziójú betegeknek a legkedvezőbb a túlélési esélyük, ellentétben a zéró expresszióval vagy a magasabb melanin expresszióval rendelkező betegektől.

#### **4.3.5. Az FZD6 expressziója és az uveális melanomás betegek túlélése közötti összefüggések vizsgálata**

52 uveális melanoma minta immunhisztokémiai festését vizsgáltuk meg az FZD6 génre. Az eredmények alapján 7 esetet találtunk (13,7%) 2+ intenzitásúnak, 28 esetet (58,8%) 1+ intenzitásúnak, 17 esetben (29%) pedig nem találtunk detektálható mértékű expressziót. A normál anyajegy minták negatívnak bizonyultak FZD6 expresszióra. Az FZD6 expresszió és a betegek túlélési esélyei közötti kapcsolat vizsgálata között nem mutatott szignifikáns korrelációt (Kaplan-Meier analízis, Mantel Cox teszt,  $n=51$ ,  $p=0,867$ ).

Amennyiben az uveális melanoma mintákat sejttípusuk alapján külön kategorizálva ábrázoltuk azok FZD6 expressziója és a betegek túlélésének figyelembe vételével, egy nem szignifikáns, de egyértelműen az epiteloid sejttípusú betegekhez társuló rosszabb prognózist tudtunk igazolni (Mantel-Cox teszt,  $n=16$ ,  $p=0,541$ , epiteloid sejttípus).

#### **4.3.6. Az angiogén faktorok és az uveális melanomás betegek túlélése közötti összefüggések vizsgálata**

48 uveális melanoma minta immunhisztokémiai festését vizsgáltuk meg a VEGFA génre, mely eredményei alapján 5 esetben (10,4%) 4+ pozitivitást, 12 esetben (25%) 3+ pozitivitást, 12 esetben (25%) 2+ pozitivitást, 12 esetben (25%) 1+ pozitivitást tapasztaltunk, illetve 7 esetben (14,6%) nem mutattunk ki detektálható expressziót. A normál anyajegy minták nem mutattak detektálható VEGFA expresziót.

A túlélési analízis nem mutatott egyértelmű és szignifikáns összefüggést a betegek VEGFA szintje és a túlélésük között (Mantel-Cox teszt,  $n=47$ ,  $p=0,757$ ).

50 uveális melanoma minta immunhisztokémiai festését vizsgáltuk meg a HIF-1A génre, mely eredményei alapján 10 esetben (20%) 4+ pozitivitást, 26 esetben (52%) 3+ pozitivitást, 10 esetben (20%) 2+ pozitivitást, 2 esetben (4%) 1+ pozitivitást tapasztaltunk, illetve 2 esetben (4%) nem mutattunk ki detektálható expressziót. A normál anyajegy minták mindegyike 3+ pozitivitást mutatott. A túlélési analízis nem mutatott egyértelmű és szignifikáns összefüggést a betegek HIF-1A szintje és a túlélésük között (Mantel-Cox teszt,  $n=49$ ,  $p=0,336$ ).

#### **4.3.7. Az FZD6 és a VEGFA gének egyidejű expressziója közötti korreláció vizsgálata**

Az FZD6 és a VEGFA gének expressziójának tumor progresszióban betöltött szerepének feltárása céljából Spearman analízist végeztünk a két gén expressziója közti korreláció vizsgálatára. Eredményünk alapján statisztikailag szignifikáns, erős korreláció áll fenn az FZD6 és VEGFA expressziója között uveális melanomás betegekben (Spearman  $r=0,411$ ,  $n=48$ ,  $p=0,004$ ). Ezzel ellentétben, az FZD6 és a HIF-1A között nem mutattunk ki szignifikáns korrelációt (Spearman  $r=0,061$ ,  $n=50$ ,  $p=0,672$ ).

#### **4.3.8. Az FZD6, HIF-1A, VEGFA és a melanin pigment expressziója és egyéb patológiai markerek közötti összefüggések vizsgálata**

A vizsgálat kizárólag a HIF-1A és a sclera infiltrációja között mutatott szignifikáns összefüggést ( $p=0,042$ ,  $n=41$ ), a többi vizsgált parameter között nem találtunk korrelációt.

## 5. Összefoglalás

A célzott daganatterápia egyik ígéretes eszköze a peptid hormon alapú gyógyszeres kezelés. Az LHRH-R overexpresszióját már számos hormonérzékeny és nem hormon érzékeny daganat esetében igazolták. Ilyen, LHRH-R pozitív daganatok az uvealis melanomák (UM) és a hólyag karcinómák is. Vizsgálataink fókuszába így két olyan nagy mortalitású, gyakori relapszussal járó humán daganat típus LHRH peptid hormon receptor alapú célzott terápiájának új lehetőségeit állítottuk, melyek eddig nem kellően felderített terápiás területek.

Munkánk első részében célul tűztük ki a uvealis melanoma és a hólyag karcinóma daganatok LHRH ligand és LHRH-R expressziójának vizsgálatát humán szövetmintákon és sejtvonalakon. A receptorok ligandkötési képességét, valamint LHRH-R specifikus célzott daganatterápiás szerekkel való célbavételének lehetőségét radioligand kötési assay-vel, ligandkompetíciós assay-vel, illetve sejt életképességi vizsgálattal tanulmányoztuk a kiválasztott daganat típusokon. Ezt követően vizsgálatunkat az LHRH-R specifikus citotoxikus kezelést követő jelátviteli folyamatok tanulmányozásával folytattuk, kiemelten az UM daganatok vérérékzésben és migrációban részt vevő génjeinek vizsgálatát. Az angiogenezis UM daganatok progressziójában betöltött kiemelt szerepét ismerve vizsgálatainkat további, új célzott terápiás célpontok, a daganat őssejtek vizsgálatának irányába folytattuk.

A nemi eloszlástól függetlenül, előfordulásukat tekintve a hólyagdaganatok a 10. leggyakoribb daganatos elváltozások a világon. Az első vonalbeli terápiás eljárások nem kielégítő probléma megoldását mutatja, hogy a legfőbb probléma a hámeredetű átmeneti-sejtes karcinóma (transitional cell carcinoma (TCC)) daganattal, hogy az esetek mintegy 50-70%-a esetében kiújul a kezelést követően, illetve infiltrál a hólyag körüli simaizom szövetekbe. Vizsgálataink során az LHRH-R-ok tumor progresszióban betöltött szerepének tanulmányozását, illetve LHRH liganddal kapcsolt citotoxikus célzott terápiájának lehetőségét húgyhólyag tumor sejtvonalakon és TCC típusú betegmintákon is elvégeztük. Először 24 műtétieltávolított, fagyasztott TCC húgyhólyag daganat szövetmintán, illetve az *in vitro* tenyésztett RT-112, UMUC3, TCCSUP sejtvonalakon vizsgáltuk az LHRH-R és az LHRH ligand expresszióját. Az LHRH-R-t a minták 83%-ában, míg az LHRH ligandot a minták 79%-ában sikerült mRNS szinten kimutatnunk RT-PCR-rel. Mindhárom sejtvonal pozitívnak bizonyult mRNS szinten mind a receptorra, mind a ligand expresszióra. A sejtvonalakban fehérje szinten is megerősítettük az LHRH-R expresszióját SDS-PAGE-Western blottal. Ezt követően, a korábban vizsgált 24 betegből kiválasztott 12 beteg parafinba ágyazott TCC tumormintáján IHC festést végeztünk az LHRH-R kimutatására. A minták mindegyikében sikerült a receptor expresszióját igazolni. Eredményeink alapján elmondható, hogy az LHRH-R expressziója a tumor grádusának

növekedésével csökken. A megfigyelésünket Pearson analízissel is alátámasztottuk, mely szerint az LHRH-R expressziója negatív korrelációban állt a vizsgált szövetminták patológiai grádjával ( $r = -0,91$ ,  $n = 12$ ). Vizsgálatainkat a korábban LHRH-R és LHRH ligand expresszióra mRNS szinten vizsgált 12 hólyagtumor betegminta radioligand kötési assay vizsgálatával folytattuk. Elsőként a szövetekből készült membránpreparátumok radioaktív [ $^{125}\text{I}$ ][D-Trp<sup>6</sup>] LHRH kötő affinitását vizsgáltuk meg. A ligandkötési assay eredménye alapján 10 betegmintából izolált LHRH-R-t kifejező membránpreparátum volt képes *in vitro* környezetben a nagy affinitással kötődő radioligand megkötésére. Méréseink során elvégeztük a leszorításos ligand kompetíciós assay-t, a nem radioaktív LHRH ligandot helyettesítve más nem radioaktív LHRH analógokkal is, mint az LHRH agonista analóg [D-Lys<sup>6</sup>]LHRH-val, ennek citotoxinnal kapcsolt formájával az AN-152-vel, az LHRH antagonistá analóg Cetorelix-szel, valamint nem LHRH-R specifikus jelöletlen peptidekkel. Eredményeinkből elmondható, hogy mindegyik nem radioaktív LHRH ligand képes volt az LHRH-R-hoz kötődni nanomolos koncentrációban.

Kutatócsoportunk több korábbi publikációjában számolt már be az LHRH-R uvealis melanoma daganatok és az OCM1 és OCM3 sejtvonalak esetében tapasztalt fokozott expressziójáról, valamint a receptor szerepéről, mint potenciális daganatterápiás célpontról.

Az uvealis melanoma a szem egyik leggyakoribb intraokuláris daganata. A statisztikák szerint a betegek közel 50%-a már a diagnózis idejében távoli áttéttel rendelkezik, mely 93%-ban a májat is érinti. Ez a rendkívül magas áttétképzési hajlam arra enged következtetni, hogy az uvealis melanoma daganat rendkívül hatékony hematogén áttétképzése által még jóval a diagnózis felállítása előtt mikrometasztázisok formájában biztosítja a daganat túlélését. A betegség terápiájának nehézsége, hogy tapasztalatok szerint meglehetősen gyakran kemorezisztens és a kútnál melanoma genetikai profiljától eltérő tulajdonságú ez a daganattípus.

Mivel nem ismert, hogy az AEZS-108 OCM3 sejteken való alkalmazásakor a DOX indukálta ROS-on kívül milyen jelátviteli folyamatok indulnak el az LHRH receptor-ligand interakciónak köszönhetően és hogy milyen jelátviteli folyamatok segítik a daganatsejt pusztulását, így munkánk során először célul tűztük ki ezen jelátviteli folyamatok feltérképezését. Először az *in vitro* kezelések során felhasználandó OCM3 sejteken immuncitokémiával igazoltuk az LHRH-R membrán- és citoplazmatikus kifejeződését, majd igazoltuk a receptorok alkalmasságát célzott terápiás molekula felvételére. A sejtpusztulás hátterében álló génexpressziós változások nyomonkövetésére 94, az angiogenezisben részt vevő gén kifejeződését vizsgáltuk a kezeletlen és az 5  $\mu\text{M}$  AEZS-108-al 24 órán át kezelt OCM3 sejteken RT-qPCR-array-vel. A legjelentősebb változást az upregulált gének közül a SERPINB5/MASPIN tumor szupresszor esetében, míg a downregulált gének közül a daganat progressziójában központi szerepű HIF-1A gén esetében tapasztaltuk. Az mRNS szinten tapasztalt

változásokat a MASPIN, HIF-1A, VEGFA és VEGFB gének esetében fehérje szinten is megerősítettük.

Az angiogenezis UM daganatok progressziójában betöltött kiemelt szerepét ismerve vizsgálatainkat további, új célzott terápiás célpontok, a daganat őssejtek vizsgálatának irányába folytattuk. A VEGFA és a HIF-1A fokozott expresszióját számtalanszor bizonyították már UM szövetmintákban. Vizsgálataink alap felvetése volt, hogy a VEGFA gén expressziójának komplex jelátviteli útvonalaiiba bekapcsolódhatnak-e a daganat őssejtek, segítve ezzel a daganatsejtet az aktuális terápiás kezeléshez vagy épp a hematogén áttétképzéshez való alkalmazkodásban? Kutató munkánk folytatásában így az uvealis melanomák daganat őssejt tartalma és a vaszkularizációjuk szabályozása közötti összefüggéseket vizsgáltuk a betegek túlélésének tükrében enukleált UM tumormintákon.

Vizsgálatainkat összesen 70 enukleált uvealis melanoma minta felhasználásával végeztük. Először 18 fagyasztott uvealis melanoma és 3 normál uvea szövetmintában vizsgáltuk az őssejtek jelenlétére utaló markerek, mint nestin, NGFR, SOX10, FZD6 és PROM1 gének expresszióját RT-PCR-rel. A daganatos szövetekben erőteljesebb expresszióját tapasztaltuk ezeknek a markereknek, melyeket a malignus elváltozású szövetekben daganat őssejtek markereinként értelmezhetünk a szakirodalom alapján. A vizsgált 18 tumoros szövetből a minták 100%-a volt pozitív a nestin, SOX10 és FZD6 őssejtmarkerekre, míg a PROM1-et a minták 82%-a, az NGFR-t pedig a minták 94%-a expresszálta. A megelőzően Ruthénium-applikátor kezelésben részesült betegek őssejtmarker expressziója nem mutatott különbséget a kezelésben nem részesült betegekkel összevetve. Csak a minták csekély része pozitív fehérje szinten is FZD6-ra (11,11%), míg HIF-1A-ra és VEGFA-ra a minták 38,88% és 33,33%- a mutatott pozitivitást. Vizsgálatainkat a továbbiakban 52 paraffin blokkba ágyazott, enukleált uvealis melanoma minta FZD6, HIF-1A és VEGFA expressziójának immunhisztokémiai vizsgálatával folytattuk. Az átalunk elvégzett Kaplan-Meier analízisek szerint sem a HIF-1A ( $p=0,336$ ), sem a VEGFA ( $p=0,757$ ) nem állt szignifikáns összefüggésben a betegek túlélésével. Az FZD6 expresszió és a betegek túlélése közötti kapcsolat vizsgálata céljából végzett Kaplan-Meier analízis nem mutatott szignifikáns összefüggést ( $p=0,867$ ), ellenben a Spearman analízissel, mely szerint erős korreláció áll fenn az FZD6 és a VEGFA gének expressziója között uvealis melanomás betegekben ( $p=0,004$ ). Ezzel ellentétben, az FZD6 és a HIF-1A között nem mutattunk ki szignifikáns korrelációt (Spearman analízis,  $p=0,672$ ) amely a gének szinkronizált expressziójára utalna. Elvégeztük a betegek klinikopatológiai paraméterei és a vizsgált három gén expressziója közötti korreláció analízist is, mely kizárólag a HIF-1A és a sclera infiltrációja között mutatott szignifikáns összefüggést ( $p=0,042$ ,  $n=41$ ), a többi vizsgált paraméter között nem találtunk korrelációt.

## 6. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Halmos Gábornak (DE GYTK Biofarmácia Tanszék) hogy doktori munkámat mindvégig támogatta, motivált, minden feltételt biztosított számomra a kísérletek elvégzéséhez, publikálásához és a disszertációm elkészítéséhez. Köszönettel tartozom Dr. Treszl Andreának, aki elindított a kutatói pályán, de sajnos doktoranduszi éveim elején súlyos betegség következtében elhunyt. Kettőjük emberi és szakmai támogatása nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg.

További köszönettel tartozom a Biofarmácia Tanszék minden dolgozójának, kiemelve Dr. Szabó Zsuzsannát, hogy támogattak a mindennapi munkában, szakmai támogatásuk mellett barátságukat is adták számomra.

Köszönetet mondanék minden társszerzőnknek, külön kiemelve a DE KK Szemklinika országos területi ellátási kötelezettségű Tumor szakrendelését és munkatársait, mint Dr. Damjanovich Juditot, Dr. Surányi Évát, továbbá Dr. Steiber Zitát. Külön köszönettel tartozom a DE KK Urológiai Klinikáról Dr. Flaskó Tibornak és Dr. Szegedi Krisztiánnak, hogy segítségünkre voltak a humán daganatos szövetminták és klinikopatológiai adataik gyűjtésében.

Megtiszteltetés volt a Nobel-díjas Prof. Andrew V. Schally-vel, mint kollaborációs partnerrel együttműködni, külön köszönet számára a munkánk támogatásáért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak. Kisfiam, férjem és szüleink türelme, bátorítása és odaadó támogatása mindig erőt adott számomra a folytatáshoz.

**Köszönettel tartozunk pályázati támogatóinknak a munka anyagi támogatásáért:**

- (OTKA) K 81596 (H.G.), „Rosszindulatú daganatokban expresszálódó luteinizáló hormon-releasing hormon receptorok, mint új molekuláris célpontok a pozitron emissziós tomográfia számára”
- TAMOP 4.2.2.A- 11/1/KONV-2012-0025 (H.G.), Molekuláris Onkológia
- TAMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 (H.G.) Kutató Egyetemi Projekt
- GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (H.G.), Szív és érutatási kiválóságközpont (IRONHEART)
- TÁMOP-4.2.4.A/2-11-1-2012-0001” Nemzeti Kiválóság Program” (M-F.K.),
- Richter Gedeon Talentum Alapítvány (M-F.K.),
- EFOP-3.6.1-16-2016-00022 (H.G.)
- NKFIH-1150-6/219 (H.G.) Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program, Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja
- TKP2020-IKA-04 (H.G.), Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program, Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja

A projektek az Európai Unió támogatásával, a Magyar Állam és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.



Nyilvántartási szám: DEENK/75/2021.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Molnár-Fodor Klára

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10044184

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szabó, Z., Dezső, B., **Molnár-Fodor, K.**, Szegedi, K., Flaskó, T., Szabó, E., Oláh, G., Sipos, É., Dobos, N., Gardi, J., Schally, A. V., Halmos, G.: Expression of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) and Type-I LHRH Receptor in Transitional Cell Carcinoma Type of Human Bladder Cancer.  
*Molecules*. 26 (5), 1-14, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26051253>  
IF: 3.267 (2019)
2. **Molnár-Fodor, K.**, Sipos, É., Dobos, N., Nagy, J., Steiber, Z., Méhes, G., Dull, K., Székvölgyi, L., Schally, A. V., Halmos, G.: Correlation between the Expression of Angiogenic Factors and Stem Cell Markers in Human Uveal Melanoma.  
*Life (Basel)*. 10 (12), 1-15, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life10120310>  
IF: 2.991 (2019)
3. **Molnár-Fodor, K.**, Dobos, N., Schally, A. V., Steiber, Z., Oláh, G., Sipos, É., Székvölgyi, L., Halmos, G.: The targeted LHRH analog AEZS-108 alters expression of genes related to angiogenesis and development of metastasis in uveal melanoma.  
*Oncotarget*. 11 (2), 175-187, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.27431>

### További közlemények

4. Sipos, É., Dobos, N., Rózsa, D., **Molnár-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: <http://dx.doi.org/10.2147/OTT.S148174>  
IF: 3.046





5. Oláh, G., Dobos, N., Vámosi, G., Szabó, Z., Sipos, É., **Molnár-Fodor, K.**, Harda, K. M., Schally, A. V., Halmos, G.: Experimental therapy of doxorubicin resistant human uveal melanoma with targeted cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analog (AN-152).  
*Eur. J. Pharm. Sci.* 123, 371-376, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.002>  
IF: 3.532
6. Harda, K. M., Szabó, Z., Szabó, E. K., Oláh, G., **Molnár-Fodor, K.**, Szász, C. S., Méhes, G., Schally, A. V., Halmos, G.: Somatostatin Receptors as Molecular Targets in Human Uveal Melanoma.  
*Molecules.* 23 (7), 1-13, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23071535>  
IF: 3.06
7. Sipos, É., Dull, K., Treszl, A., Steiber, Z., Méhes, G., Dobos, N., **Molnár-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: 2.976
8. **Molnár-Fodor, K.**: Az AN-152 (AEZS-108) célzott daganatterápiás készítmény hatásmechanizmusának vizsgálata.  
In: "A mi tendenciáink..." Szakkollégiumi Tanulmányok, 2. : Hatvani István Szakkollégium Debreceni Egyetem Tudományegyetemi Karok. Szerk.: Dorogi Zoltán, Uri Dénes Mihály, Debreceni Egyetem Tudományegyetemi Karok Hatvani István Szakkollégiuma, Debrecen, 161-168, 2013, 2063-6059
9. Treszl, A., Steiber, Z., Schally, A. V., Block, N. L., Dezső, B., Oláh, G., Rózsa, B., **Molnár-Fodor, K.**, Buglyó, A., Gardi, J., Berta, A., Halmos, G.: Substantial expression of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptor type I in human uveal melanoma.  
*Oncotarget.* 4 (10), 1721-1728, 2013.  
IF: 6.627

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 25,499**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,258**

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, 2021.03.01.



## 7. Függelék: Publikált absztraktok és előadások gyűjteménye

### publikált absztraktok:

**Klára Fodor**, Nikoletta Dobos, János Nagy, Gábor Méhes, Gábor Halmos: Correlations between the expression of angiogenic factors and stem cell markers in human uveal melanoma. 4th National Conference of Young Biotechnologists (FIBOK, Medical Biotechnology Section, 12 November 12. Függelék: Publikált absztraktok és előadások gyűjteménye

2020, online conference, Poszter díj: 1. helyezés

**Klára Fodor**, Éva Sipos, Nikoletta Dobos, János Nagy, Zita Steiber<sup>3</sup>, Andrea Okos, Andrea Treszl †, Gábor Méhes, Gábor Halmos: The investigation of cancer stem cells in human uveal melanoma. BBBB Gyógyszerésztudományi Nemzetközi Konferencia 2017. október 05., Acta Pharmaceutica 7th BBBB Edition

**Klára Fodor**, Éva Sipos, Nikoletta Dobos, János Nagy, Zita Steiber<sup>3</sup>, Andrea Okos, Andrea Treszl †, Gábor Méhes, Gábor Halmos: The investigation of cancer stem cells in human uveal melanoma.: Magyar Onkológusok XXXII. Konferenciája 2017. Nov. 16-18. Magyar Onkológia 61, évf, 1. Szuppl.

**Fodor Klára**, Treszl Andrea, Steiber Zita, Halmos Gábor: A doxorubicin és a célzott daganatterápiára fejlesztés alatt álló, doxorubicinnel konjugált LHRH-analóg AN-152 (AEZS-108) hatásmechanizmusának összehasonlítása humán uvealis melanoma sejtekben., 2015. november, Magyar Onkológia, 59. évf., 1. Szupplementum, 16. oldal

Fodor K, Steiber Z, Halmos G, Treszl A: Van-e jelentősége a sorrendiségnek a célzott terápiás angiogenezis gátló készítmények és a citosztatikumok együttes alkalmazása esetén?, 2014. november, Klinikai Onkológia, 1. évfolyam, 1. különszám, 43. oldal

**Fodor K**, Treszl A, Steiber Z, Schally AV, Halmos G: The mechanism of action of targeted cytotoxic LHRH analog AN-152 (AEZS-108) in human uveal melanoma cells, The 18th world congress on advances in oncology and 16th International symposium on molecular medicine, Görögország, 2013. Október 10-12., International Journal of Molecular Medicine, Volume 32, Supplement 1, 2013, page S43. ISSN 1107-3756, eISSN 1791-244X. Poszter prezentáció

Treszl Andrea, **Fodor Klára**, Steiber Zita, Szántó János, Halmos Gábor: „A célzott daganatterápiára kifejlesztett citotoxikus LHRH analóg AN-152 (AEZS-108) hatásmechanizmusának vizsgálata uvealis melanoma sejteken” poszter absztrakt. Orvostovábbképző szemle, 2012. novemberi különszám, 67. oldal, P139.

Brunyánszki A, Szántó M, **Fodor K**, Sandt C, P Dumas, Bai P: Investigation of protein acetylation and poly(ADP-ribosyl)ation by synchrotron FTIR microspectroscopy., August 2011., Biokémia, XXXV. évf. 3. 22. 28-31

**konferencia előadások:**

**Fodor Klára**, Dobos Nikoletta, Nagy János, Dull Kata, Méhes Gábor, Schally V. Andrew, Halmos Gábor: A daganat őssejtek és a vaszkularizációs faktorok expressziója közötti összefüggések vizsgálata humán uvealis melanoma szövetmintákon. Magyar Klinikai Farmakológusok XVIII. Továbbképző napok, 2020. december 03-05., online konferencia

**Klára Fodor**, Nikoletta Dobos, Andrew V. Schally, Zita Steiber, Gábor Halmos: The targeted LHRH analog AEZS-108 alters expression of genes related to angiogenesis and development of metastasis in uveal melanoma. 4th National Conference of Young Biotechnologists (FIBOK, Medical Biotechnology Section, 12 November 2020, online conference

**Fodor Klára**, Dobos Nikoletta, Steiber Zita, Andrew V. Schally, Halmos Gábor: Célzott daganatterápiás készítmények hatása az angiogenezisben részt vevő gének expressziójára humán uvealis melanoma sejtvonalon. Magyar Klinikai Farmakológusok XVII. Továbbképző napok, 2019. december 05-07.

**Fodor Klára**, Dobos Nikoletta, Steiber Zita, Andrew V. Schally, Halmos Gábor: Célzott daganatterápiás készítmények hatása az angiogenezisben részt vevő gének expressziójára humán uvealis melanoma sejtvonalon. GINOP-2.3.2-15-2016-00043 Szív- és Érkutatási Kiválóságközpont (IRONHEART) Tudományos ülése, Debrecen, 2019.november 07.

**Fodor Klára**, Dobos Nikoletta, Hegyi Katalin, Steiber Zita, Sipos Éva, Tóth Anita, Okos Andrea, Treszl Andrea, Halmos Gábor: A daganat őssejtek és a vaszkularizációs faktorok expressziója közötti összefüggések vizsgálata humán uvealis melanoma szövetmintákon. Magyar Klinikai Farmakológusok XVIII. Továbbképző napok, Debrecen, 2016.december 8-10.

**Fodor Klára**, Treszl Andrea, Steiber Zita, Halmos Gábor: A célzott daganatterápiára kifejlesztett citotoxikus LHRH analóg AN-152 (AEZS-108) hatásmechanizmusának vizsgálata humán uvealis melanoma sejteken. VII. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2015. szeptember 3-5..  
Poszter bemutató, 1. helyezett poszterdíj.

**egyetemi jegyzetek:**

Dr. Halmos Gábor: Válogatott fejezetek a gyógyszerészi bioanalitikából, V. fejezet: PCR. Egyetemi jegyzet magyar nyelven. 2015. 01. 31.

Dr. Halmos Gábor: Selected chapters of pharmaceutical bioanalytical methods, V. chapter: PCR. Egyetemi jegyzet angol nyelven. 2015. 01. 31.