

Prediktív és prognosztikus biomarkerek, valamint rezisztenciamechanizmusok vizsgálata fej-nyaki tumorokban

Tézisfüzet

Gurbi Bianka

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Csala Miklós, DSc., tanszékvezető egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Krencz Ildikó, Ph.D., klinikai szakorvos

Dr. Bencsik Norbert, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság

elnöke: Dr. Szökő Éva, DSc., egyetemi tanár

tagjai: Dr. Törőcsik Beáta, Ph.D., igazgatóhelyettes

Dr. Tóvári József, Ph.D., osztályvezető

Budapest

2025

1. Bevezetés

Daganatos elváltozások gyakorlatilag bármely sejtből kialakulhatnak, és ezek molekuláris háttere még azonos szöveti eredet esetén is jelentősen eltérhet. Napjainkban a daganatkutatások a daganatellenes molekuláris célpontok keresésére, olyan célzott terápiák kidolgozására koncentrálnak, amelyek a hagyományos kemoterápiával szemben nem a szerkezetet, hanem a zavart okozó molekuláris hibákat támadják. A célzott terápia azért is jelentős, mert megalapozza a személyre szabott gyógyítást, vagyis a páciens tumortípusának, molekuláris hátterének megfelelő kezelés kidolgozását.

Az utóbbi években változást figyelhetünk meg a klinikai vizsgálatok tervezésében. A szövettani besoroláson alapuló kutatások mellett egyre elterjedtebbek a molekuláris marker alapú, genotípushoz illesztett klinikai vizsgálatok. A lokalizáción, szövettanon alapuló besorolás továbbra is a klinikai vizsgálatok fontos részét képezi, ugyanakkor a prognosztikus (azaz a betegség előrehaladását mutató és a diagnózis szempontjából hasznos) és prediktív (vagyis az adott kezelés hatékonyságát előre jelző) markerek meghatározásához biomarker alapú kutatásra van szükség.

A fej-nyaki tumorok a kulcscsont és a koponyaalap között elhelyezkedő területről kiinduló daganatok, amelyek 90%-a laphámrák (squamous cell carcinoma, SCC). A fej-nyaki laphámrák (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) gyűjtőfogalom, amely magába foglalja a szájüreg, a garat, a gége, az orr- és orrmelléküregek, valamint a nyálmirigyek ilyen típusú megbetegedéseit. A fej-nyaki tumorok említésekor általánosan a laphám típusú daganatokra gondolunk. Bár az elmúlt években világszinten csökkent e tumorok incidenciája, és mortalitás tekintetében is kiszorultak a tíz leggyakoribb tumortípusból, Magyarországon a férfiak körében továbbra

is a hatodik leggyakoribb daganatos betegségcsoport, amely negyedik helyen szerepel a halálozást tekintve.

Sokáig úgy vélték, hogy a fej-nyaki tumorok kialakulásában a fő kockázatot az alkoholfogyasztás és a dohányzás jelenti. Mára beigazolódott, hogy e két kiváltó tényező mellett a humán papillomavírus (HPV) is jelentős kockázati tényező, amely a méhnyakrák mellett a fej-nyaki tumorok közel felében járul hozzá a daganatos elváltozáshoz. A HPV-pozitív daganatok viselkedése jelentősen eltér a HPV-negatív daganatokétól, ezért megkülönböztetésük minden esetben lényeges. A HPV-negatív tumorok esetén az elváltozás kialakulását a jelátviteli útvonalakban fontos fehérjék valamelyikét kódoló gén mutációja vagy amplifikációja okozhatja. A fej-nyaki tumorokban legtöbbször előforduló ilyen elváltozások a p16^{INK4A}, a ciklin D1, a PIK3CA (foszfatidil-inozitol-3-kináz katalitikus alegysége), a c-Met (hepatocita növekedési faktor receptor) és a p53 génjeiben jelentkeznak. Azonban nem minden elváltozásnak van patológiai vagy klinikai jelentősége. A genom elváltozásai mellett, és gyakran attól függetlenül, okoznak problémát a transzkriptomban és a proteomban jelentkező eltérések is.

A HPV, a c-Met, a PIK3CA és a p53 amellelt, hogy szerepet játszanak a fej-nyaki tumorok kialakulásában, prognosztikai markerek is egyben. További két fontos prognosztikai marker az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és a connexin 43 (Cx43). Az EGFR család a tirozin-kináz receptorok csoportjába tartozik. A PI3K/Akt, a MEK/ERK, a PLC γ és a STAT jelátviteli útvonalak aktiválásán keresztül szerepe van a sejtek proliferációjában, túlélésében, migrációjában és differenciációjában. Az EGFR-t a fej-nyaki tumorok kb. 90%-a termeli túl. Számos korábbi vizsgálat igazolta, hogy az EGFR magas szintje szignifikánsan rosszabb túlélést eredményez

HNSCC-kben, míg más kutatások során ezt az összefüggést nem sikerült igazolni. A Cx43 a connexinek családjába tartozó fehérje, amely sejtkapcsoló struktúrák (gap junction) kialakításában vesz részt. Ezeknek a sejtkapcsoló struktúráknak a szomszédos sejtek közötti mechanikai kapcsolat és kommunikáció kialakításában van szerepük. A Cx43 továbbá részt vesz a proliferáció, az apoptózis és a differenciáció szabályozásában is. A Cx43 fehérje expressziója szignifikáns összefüggést mutat a fej-nyaki tumoros betegek túlélésével, azaz a fehérje magasabb expressziója jobb prognózissal társul. A Cx43 mennyiségének csökkenése a tumorsejtekben összefüggésbe hozható a fokozott invázióval és metasztázisképzéssel.

A fej-nyaki tumorok kezelése összetett feladat, több fontos változó figyelembevételét igényli. Az egyik fontos tényező a daganat stádiuma, amely alapján megkülönböztetünk lokoregionális és metasztatikus tumorokat, melyeknek hagyományos terápiája eltérő. Lokoregionális daganatok esetében operáció, sugárkezelés vagy kemoterápia (cisplatin) lehetséges, míg metasztatikus tumorok esetén kemoterápiát (cisplatin, carboplatin, docetaxel, paclitaxel, methotrexate és/vagy 5-fluorouracil) szoktak alkalmazni. Abban az esetben, ha társbetegségek akadályozzák a citotoxikus kemoterápia használatát, EGFR-ellenes célzott terápiával (cetuximab) kombinált radioterápiát alkalmazhatnak. Mindezek mellett az FDA (Food and Drug Administration) az immunellenőrzési pont fehérjének kölcsönhatását befolyásoló és így a T-sejtes immunválasz kialakulását elősegítő immunterápiás lehetőségeket is jóváhagyott: visszatérő és metasztatikus HNSCC-k esetén a pembrolizumabot és a nivolumabot, nem reszekálható HNSCC-k esetén pedig a pembrolizumabot mint elsődleges terápiát.

A kemoterápia sikerességének előrejelzésére igen kevés molekuláris markerrel rendelkezünk. Boguszewicz egy átfogó tanulmányban összegyűjtötte azokat a géneket és fehérjéket, amelyek fej-nyaki tumorokban potenciális prediktív markerek lehetnek indukciós kemoterápia esetén. A teljesség igénye nélkül ilyen gének lehetnek az EGFR, a HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2), a VEGFR (vascular endothelial growth factor), a Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), az ERCC1 (excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit) és a p53 fehérjéket kódoló gének. Az indukciós kemoterápia sikerességét előre jelző fehérje pedig lehet többek között a p16^{INK4A} és a p53. Ezeken kívül a Cx43 paclitaxel alkalmazása során merül fel mint lehetséges prediktív marker. Korábbi kutatás során glioblasztomákat vizsgálva kimutatták, hogy magasabb Cx43-expresszió érzékenyíti a tumorsejtvonalakat paclitaxellel szemben. Ezt a jelenséget azzal magyarázták, hogy a magasabb Cx43-expresszióval együtt alacsony Bcl-2-expresszió figyelhető meg. A Bcl-2 antiapoptotikus fehérje, amelynek hiányában könnyebben következik be sejthalál.

Napjainkban több célzott daganatterápiás szer (antitest vagy tirozin-kináz-inhibitor) rendelkezik FDA vagy EMA (European Medicines Agency) engedéllyel és van forgalomban valamilyen daganattípus esetében. Bár a gátolt fehérje a legtöbb esetben pontosan meghatározott és specifikus célpont, csak néhány esetben ismerünk olyan molekuláris markereket, amelyekkel megjósolhatnánk és kiválaszthatnánk azt a betegpopulációt, ahol a gyógyszer hatásfoka a legjobb lenne. Fej-nyaki tumorok kezelésénél számos lehetőség közül a cetuximab az egyetlen engedélyezett célzott terápiás szer, amihez nagyban hozzájárul az ismert molekuláris markerek hiánya.

Ahhoz, hogy felvehessük a harcot a rákos megbetegedésekkel, ismernünk kell azok működését, molekuláris hátterét. Ezeket felhasználva pontosabb képet kaphatunk a daganatokról, és megfelelő terápiás módszereket dolgozhatunk ki a betegek számára.

2. Célkitűzések

Kutatásunk során egyrészt tumorprogressziós markerek expressziójának meghatározásával és a fej-nyaki daganatok viselkedésével, taxánapú kezelésre adott válaszával való összefüggésének vizsgálatával foglalkoztunk. Másrészt potenciális terápiás célpontok azonosítására és gátlásuk vizsgálatára fordítottuk figyelmünket fej-nyaki tumorokban.

A bemutatásra kerülő munka konkrét célkitűzései a következők voltak:

- Fej-nyaki tumorsejtvonalak paclitaxelérzékenységének meghatározása.
- A Cx43 és a Bcl-2 fehérjék mint tumorprogressziós markerek expressziójának megállapítása fej-nyaki tumor eredetű sejtvonalakban és szövetmintákban.
- A Cx43 mennyiségének a Bcl-2 expressziójára és a sejtek paclitaxelérzékenységére gyakorolt hatásának kifejtése.
- A Cx43- és a Bcl-2-szintek klinikopatológiai paraméterekre és a taxánapú terápiára adott válaszára gyakorolt hatásának megadása.
- Fej-nyaki tumorsejtvonalak EGFR- és MEK-gátlókkal, valamint ezek kombinációjával szembeni érzékenységének meghatározása.
- Az EGFR, valamint jelpályáiban (MEK/ERK és PI3K/Akt jelátviteli utak) résztvevő fehérjék expressziójának és aktivitásának mérése.
- Összefüggés keresése a sejtvonalak gátlószerérzékenysége és a fehérjék expressziós és aktivitási adatai között.
- Az EGFR és a pY1068-EGFR mennyiségének meghatározása fej-nyaki tumoros szövetmintákban, összefüggés keresése a klinikopatológiai paraméterekkel.

3. Módszerek

In vitro módszerek

Alkalmazott sejtvonalak

In vitro vizsgálatainkhoz három HPV-negatív fej-nyaki laphámsejtes daganat eredetű sejtvonalat használtunk: a Detroit 562-t, a FaDu-t és az SCC25-öt. Mindhárom sejtvonal az ATCC (American Type Culture Collection) sejtbankjából származott. A sejtek fenntartása, tenyésztése és a kísérletek inkubációja egyaránt 37 °C-on és 5% CO₂-tartalmú párásított inkubátorban történt. Az alkalmazott médiumokat az ATCC által meghatározott módon állítottuk össze.

Alkalmazott kezelőszerek

Munkánk során az FDA által már engedélyezett, klinikai használatban lévő gátlószereket használtunk: afatinibet (EGFR-gátló), erlotinibet (EGFR-gátló), selumetinibet (MEK-gátló), trametinibet (MEK-gátló) és paclitaxelt (sejtosztódás-gátló). Valamennyi kezelőszert a Selleckchemtől szereztük be.

Géncsendesítés (siRNS-transzfekció)

A Cx43 fehérjét kódoló gén, a *GJAI* (gap junction protein alpha-1) expresszióját a rá specifikus siRNS molekula transzfectálásával csendesítettük mindhárom vizsgált sejtvonalban. Célpontként a *GJAI* siRNS-t, míg negatív kontrollként nem targetáló (*NT*) siRNS-t alkalmaztunk, amely semmilyen ismert mRNS-szekvenciával nem mutat homológiát. A méréshez a sejteket 6 lyukú steril sejtenyésző lemezre raktuk ki, majd a sejtek letapadását követően (24 óra) a transzfectiót Lipofectamine RNAiMAX és OPTI-MEM médium jelenlétében végeztük el a gyártói protokollokban szereplő eljárás szerint. A transzfectált sejteket egyéb

mérésekhez (tripánkékkizárásos sejtszámolás, Western blot és fluoreszcens áramlási citometria) használtuk fel.

Fehérjetútermeltetés (plazmidtranszfekció)

A Cx43 fehérje tútermeltetéséhez plazmidtranszfekciót alkalmaztunk valamennyi vizsgált fej-nyaki tumorsejtvonal esetén. A vektor a pIRES2-Cx43 plazmid volt, amely a vad típusú Cx43-at kódolta. Kontroll vektorként a GFP-t (green fluorescent protein) termelő pEGFP-C1 plazmidot használtuk. A méréshez a sejteket 12 lyukú steril sejtenyésző lemezre raktuk ki, majd a sejtek letapadását követően (24 óra) a transzfekciót Lipofectamine®LTX & PLUS™ Reagent jelenlétében végeztük el a gyártói protokollokban megadott eljárás szerint. A transzfektált sejteket egyéb mérésekhez (tripánkékkizárásos sejtszámolás, Western blot és fluoreszcens áramlási citometria) használtuk fel.

A sejtek életképességének vizsgálata MTT méréssel

A sejtek paclitaxel-, afatinib-, erlotinib-, selumetinib- és trametinib-érzékenységét MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid) módszer segítségével vizsgáltuk. A méréshez a sejteket 96 lyukú steril sejtenyésző lemezre raktuk ki, majd a sejtek letapadását követően (24 óra) több párhuzamos kísérletet végeztünk, amelyek során 5 µM-ról induló harmadoló hígítási sorral kezeltük a sejteket afatinibbel, erlotinibbel, selumetinibbel, trametinibbel és afatinib+trametinib 1:1 arányú kombinációjával. 100 nM-ról induló harmadoló hígítási sort alkalmaztunk a paclitaxel kezelés esetén. A szereket 72 órán keresztül hagytuk hatni, majd a sejtek életképességét MTT méréssel állapítottuk meg. A gátlószerek IC₅₀ értékét a GraphPad Prism® 8 program segítségével határoztuk meg. A statisztikai tesztek a Statistica 13 programmal végeztük.

Gyógyszerszinergizmus vizsgálata Compusyn segítségével

A lehetséges gyógyszerszinergizmusokat és az 50%-os effektív dózisonál definiált kombinációs indexeket (CI) a Compusyn programmal állapítottuk meg. A program által generált értékek $CI < 0,75$ esetén szinergizmust, $0,75 < CI < 1,25$ additív hatást, míg $CI > 1,25$ antagonizmust jelölnek.

A sejtek életképességének vizsgálata tripánkékkizárással

A Cx43-expresszió csökkentésének és növelésének következményét az életképességre tripánkékkizárással módszerrel vizsgáltuk. A nem targetáló és a *GJAI* siRNS-sel géncsendesített Detroit 562, FaDu és SCC25, valamint a kontroll és a Cx43 plazmiddal transzfektált FaDu sejteket három független kísérletben, több koncentrációban (100 nM-ról induló ötpontharmadoló hígítás) kezeltük paclitaxellel 48 órán keresztül. A kezelést követően tripánkékkizárással módszerrel meghatároztuk az élősejtszámot. Az IC_{50} értékeket a GraphPad Prism® 8 program segítségével határoztuk meg. A statisztikai teszteket a Statistica 13 programmal végeztük.

Apoptózis vizsgálata fluoreszcens áramlási citometriával

A paclitaxel által okozott sejthalál mechanizmusának feltárására, valamint a Cx43-expresszió csökkentésének és növelésének az apoptózisra gyakorolt hatásának megállapítására áramlási citometriás (FACS) kísérleteket végeztünk. A méréshez a sejteket 96 lyukú steril sejtenyésző lemezre raktuk ki, majd a sejtek letapadását követően (24 óra) 100 nM-ról induló harmadoló hígítási sorral kezeltük a sejteket paclitaxellel, amit 48 órán keresztül hagytunk hatni mindhárom sejtvonal esetén. A nem targetáló és a *GJAI* siRNS-sel géncsendesített Detroit 562, FaDu és SCC25, valamint a kontroll és a Cx43 plazmiddal transzfektált FaDu sejteket három független kísérletben, több koncentrációban (100 nM-ról induló ötpontharmadoló

hígítás) kezeltük paclitaxellel 48 órán keresztül. A kezelést követően a sejteket Annexin V-FLUOS és propídium-jodid kettős festéssel FACS segítségével vizsgáltuk. Az adatokat a CellQuest Pro és a Microsoft® Excel szoftverrel értékeltük. A statisztikai tesztek a Statistica 13 programmal végeztük. Az Annexin- (Ann) és a propídium-jodid- (PI) pozitivitás alapján négy populációt különítettünk el: élő (Ann^-/PI^-), apoptotikus (Ann^+/PI^-), nekrotikus (Ann^-/PI^+) és halott sejtek (Ann^+/PI^+).

Fehérjeexpresszió és -foszforiláció vizsgálata Western blottal

A Cx43, a Bcl-2, az EGFR, az Akt és az ERK1/2 fehérjék expressziós szintjének és az EGFR, az Akt és az ERK1/2 aktivitásának meghatározásához kezeletlen sejtizátumokat használtunk mindhárom fejnyaki tumorsejtvonal esetén. A MEK-gátlás fehérjeexpresszióra és foszforilációra gyakorolt hatásának vizsgálatához a Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejteket 1 μM trametinibbel és DMSO-val kezeltük 4 órán keresztül. A tripánkékkizárással sejtszámolás és fluoreszcens áramlási citometria mérés után megmaradt *GJAI* siRNS + paclitaxellel és a nem targetáló siRNS + paclitaxellel kezelt Detroit 562, FaDu és SCC25 sejteket, valamint a Cx43 plazmid + paclitaxellel és kontroll plazmid + paclitaxellel kezelt FaDu sejteket is lizáltuk azért, hogy igazolhassuk a transzfekció sikerességét és vizsgálhassuk a fehérjeexpresszióra gyakorolt hatást. Az össz-fehérjekoncentrációt Bradford módszerrel határoztuk meg. Az SDS-PAGE-re 10 μg fehérjét vittünk fel, amiket PVDF membránra juttattunk át elektrotranszfer módszerrel. A vizsgált fehérjék a következők voltak: Bcl-2, Cx43, GFP, Akt, pS473-Akt, EGFR, pY1068-EGFR, ERK1/2, pT202/Y204-ERK1/2, α -tubulin. Az eredményt Enhanced Chemiluminescence (ECL)

módszerrel dekektáltuk és az ImageJ szoftverrel kvantifikáltuk. A statisztikai teszteket a Statistica 13 programmal végeztük.

Szövetteni mintákon alkalmazott módszerek

Felhasznált minták

A vizsgálatokhoz 97 fej-nyaki laphámrákkal diagnosztizált beteg biopszia-vagy műtét révén eltávolított tumormintáját használtuk fel. A páciensek a Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikáján 2012 és 2014 között részesültek kezelésben. A vizsgálatban részt vevő valamennyi páciens tájékozott beleegyezését adta. Az eljárást a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottság hagyta jóvá (etikai engedély száma: 105/2014).

Fehérjeexpresszió értékelése immunhisztokémiával

A szövetminták paraffinba ágyazva, szöveti blokkok formájában álltak rendelkezésünkre a Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézetében. A blokkokból 70 db szövethenger került szúrással egy TMA blokkba (Tissue Microarray). A TMA blokkokból több, 4 µm vastagságú TMA metszet készült, amelyek szilanizált tárgylemezre lettek rögzítve az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz. Az immunhisztokémiai festés során a Cx43, a Bcl-2, az EGFR és a pY1068-EGFR fehérjéket jelöltük meg. A felhasznált elsődleges ellenanyagok ugyanazok voltak, mint a Western blot során alkalmazottak. Az EGFR és a pY1068-EGFR mennyiségének meghatározásához alternatív három fokozatú pontozási rendszert használtunk. A festődött sejtek százalékos arányát megszoroztuk a festődés intenzitásával. A festődés intenzitásának jellemzésére négy fokozatot használtunk: 1: negatív, 2: gyenge, 3: mérsékelt, 4: intenzív. Így egy 0-400 közötti skálát kaptunk, amelyben a 0 érték jelentette a negatív (0), 1-200-ig

az alacsony (1), 201-300-ig a közepes (2), míg 301-400-ig a magas (3) fehérjeexpressziót. A statisztikai elemzéshez ezeket a pontszámokat különböző küszöbértékek mentén dichotomizáltuk. Az EGFR esetében ennek megfelelően az 1-es kategóriát tekintettük alacsony/negatív fehérjeexpressziónak, míg a 2-es és 3-as csoportokat magas/pozitív kifejeződésnek. A pY1068-EGFR esetén a 0-ás, 1-es és 2-es kategória adódott az alacsony/negatív megjelenésnek, míg a 3-as a magas/pozitív foszforilációnak. A Bcl-2 és a Cx43 mennyiségének meghatározásához a diagnosztikában és a korábbi kutatásaink során kialakított pontozási rendszert használtuk. A Bcl-2-re vonatkozó kategóriák a következők voltak: 1: <10% pozitív tumorsejt, 2: 11-30% pozitív tumorsejt, 3: 31-60% pozitív tumorsejt, 4: >60% pozitív tumorsejt. A Cx43-ra vonatkozóan az alábbi kategóriákat különítettük el: 1: <5% pozitív tumorsejt, 2: 6-20% pozitív tumorsejt, 3: 21-60% pozitív tumorsejt, 4: >60% pozitív tumorsejt. A statisztikai elemzéshez ezeket a pontszámokat adott küszöbérték mentén dichotomizáltuk. A Bcl-2 és a Cx43 esetében is az 1-es és 2-es kategóriákat tekintettük alacsony/negatív fehérjeexpressziónak, míg a 3-as és 4-es csoportokat a magas/pozitív kifejeződésnek. A statisztikai tesztek a Statistica 13 programmal végeztük.

4. Eredmények

Tumorprogressziós markerek vizsgálata fej-nyaki tumorokban

Paclitaxel hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére

A paclitaxel mindhárom fej-nyaki tumorsejtvonal esetében jelentősen csökkentette a sejtek életképességét, az IC_{50} érték minden esetben 10 nM-nál kisebbnek bizonyult. Bár a paclitaxel mindegyik sejtvonalra kiemelkedő hatást gyakorolt, mégis mutatkoznak számottevő különbségek. Az SCC25 esetén szignifikánsan alacsonyabb IC_{50} érték figyelhető meg, mint a másik két sejtvonalnál (Detroit 562: $p=0,002$, FaDu: $p=5 \times 10^{-4}$). Vagyis az SCC25 paclitaxelre érzékeny, míg a Detroit 562 és a FaDu kevésbé érzékeny sejtvonalnak tekinthető. Kicsi, de szignifikáns különbség van a Detroit 562 és a FaDu IC_{50} értékei között is ($p=0,02$).

Paclitaxel által indukált apoptózis fej-nyaki tumorsejtvonalakban

A Detroit 562 sejtvonal esetében az apoptózis arányának csak kismértékű emelkedése figyelhető meg növekvő paclitaxelkoncentráció hatására. Ez a növekedés a legmagasabb koncentrációnál sem szignifikáns ($p>0,05$). Az apoptózis arányának csekély mértékű növekedését figyeltük meg a FaDu sejtvonal esetén is. Az apoptotikus sejtek aránya a paclitaxelkoncentráció emelésével növekedett, ami 33 nM ($p=0,045$) és 100 nM ($p=0,022$) paclitaxelkoncentrációnál szignifikánsnak bizonyult a kontroll frakcióhoz képest. Az SCC25 sejtvonal esetében az apoptózis arányának jelentős növekedése látható. Az apoptotikus sejtek aránya a paclitaxelkoncentráció emelkedésével együtt nőtt. Szignifikáns különbségeket lehetett észlelni a kontroll és a paclitaxellel kezelt minták között már 10 nM-os koncentrációnál is (10 nM: $p=0,033$, 33 nM: $p=0,025$, 100 nM: $p=0,027$). Ez

alapján az SCC25 érzékenyebb a paclitaxellel szemben, mint a másik két sejtvonal.

Cx43- és Bcl-2-expresszió fej-nyaki tumorsejtvonalakban

Az elvégzett kísérleteink eredménye alapján a Detroit 562-ben közepes mennyiségű Cx43 van jelen a másik két vizsgált sejtvonalhoz képest. A FaDu-ban megközelítőleg feleannyi, míg az SCC25-ben közel kétszerannyi Cx43 expresszálódik, mint a Detroit 562-ben. A kvantitatív elemzés alapján az SCC25-ben kifejeződő fehérje mennyisége szignifikánsan eltér a másik két sejtvonalban tapasztalttól (Detroit 562: $p=0,02$, FaDu: $p=0,005$). Ez alapján a Detroit 562 és a FaDu alacsony, míg az SCC25 magas Cx43-expresszióval rendelkezik. A Bcl-2 fehérje a Detroit 562 sejtvonalban található meg a legnagyobb mennyiségben, és ehhez hasonlóan magas szint tapasztalható a FaDu-ban is. Legkisebb mennyiségben az SCC25 termeli a Bcl-2-t, tizedannyit, mint a Detroit 562. Az észlelhető különbségek az SCC25 esetében szignifikánsak a másik két sejtvonalhoz viszonyítva (Detroit 562: $p=0,05$, FaDu: $p=0,004$). Ez alapján a Detroit 562 és a FaDu magas, míg az SCC25 alacsony Bcl-2-expressziót mutat. A sejtvonalak fehérjeexpressziójának tanulmányozása alapján tehát a Detroit 562 és a FaDu sejtvonalak alacsony Cx43- és magas Bcl-2-expresszióval bírnak, míg az SCC25 magas Cx43- és alacsony Bcl-2-expresszióval rendelkezik.

A Cx43-szint csökkentésének és növelésének hatása a fehérjeexpresszióra fej-nyaki tumorsejtvonalakban

A *GJA1* siRNS hatására mindhárom sejtvonalban szignifikánsan csökkent a Cx43 fehérje mennyisége (Detroit 562: $p=0,01$, FaDu: $p=3 \cdot 10^{-7}$, SCC25: $p=10^{-11}$), vagyis a géncsendesítés minden esetben sikeres volt. A Cx43 mennyiségének csökkenése nem okozott változást a Bcl-2-expresszióban a

Detroit 562 és a FaDu sejtekben, azonban az SCC25 sejtekben jelentősen megemelkedett, közel duplájára nőtt a Bcl-2 mennyisége ($p=6\cdot 10^{-4}$). A transzfekció hatására a Detroit 562 és az SCC25 sejtekben nem történt szignifikáns változás. A Detroit 562 sejtek a kontroll plazmidot is csak kis mértékben vették fel, míg az SCC25 sejtekben az eleve magas Cx43-szint nem emelkedett meg jelentős mértékben a Cx43 plazmid hatására. Ezzel szemben a FaDu mind a kontroll, mind a Cx43 plazmidot felvette, előbbiről nagy mennyiségű GFP-t, utóbbiról pedig a kontrollhoz képest tizenötször több Cx43-at expresszált ($p=0,047$). Ez alapján a transzfekció egyedül a FaDu esetén volt eredményes. A FaDu sejtekben a megemelkedett Cx43-expresszió felére csökkentette a Bcl-2 mennyiségét, amely változás szignifikánsnak mutatkozott ($p=8\cdot 10^{-6}$).

A Cx43-expresszió csökkentésének hatása a paclitaxelérzékenységre fejnyaki tumorsejtvonalakban

A tripánkékkizárási sejtszámolás alapján a *GJAI* siRNS alkalmazása nem változtatta meg szignifikánsan a paclitaxel életképességre gyakorolt hatását egyik sejtvonal esetében sem. A Detroit 562 esetén nem tapasztaltunk különbséget a nem targetáló és a *GJAI* siRNS-sel kezelt sejtek között, a FaDu és az SCC25 esetén azonban az IC_{50} koncentráció enyhe növekedése figyelhető meg. Vagyis a *GJAI* géncsendesítés hatására kissé romlik a paclitaxel hatása. A Detroit 562 sejtvonal esetében az apoptózis mértéke *GJAI* siRNS-kezelés hatására nem mutatott eltérést a nem targetáló siRNS-sel végzett kezeléshez képest. A FaDu sejtvonal esetén a *GJAI* siRNS-kezelés hatására a nem targetáló siRNS-hez képest csökken az apoptotizáló sejtek aránya magasabb paclitaxelkoncentráció esetén, azonban ez a változás egyik esetben sem szignifikáns. Az SCC25 sejtvonal esetében a *GJAI*

siRNS-sel kezelt mintákban az apoptotikus sejtek aránya számottevően csökkent a nem targetáló siRNS-sel kezelt mintákhoz képest valamennyi paclitaxelkoncentráció esetén. Ez a csökkenés szignifikáns volt a legmagasabb koncentrációban kezelt mintáknál ($p=0,02$). Vagyis a *GJAI* géncsendesítés csökkentette a paclitaxel apoptózisra gyakorolt hatását az SCC25 sejtvonalban. Ezzel együtt a Cx43 expressziója a *GJAI* siRNS hatására minden esetben csökkent, ami a Bcl-2-expresszió növekedését eredményezte.

A Cx43-expresszió növelésének hatása a paclitaxelérzékenységre FaDu sejtvonalban

A tripánkékkizárási sejtszámolás alapján a Cx43 plazmiddal végzett transzfekció érzékenyebbé tette a FaDu sejteket paclitaxellel szemben. Vagyis a kontroll plazmidhoz képest a Cx43 plazmid esetén kisebb volt az élő sejtszám valamennyi paclitaxelkoncentráció mellett. Ugyanez figyelhető meg az IC_{50} értékek esetén is, a Cx43 plazmid alkalmazásakor csökkent az IC_{50} érték. Az áramlási citometriás mérések alapján a Cx43 plazmiddal végzett transzfekció nem változtatta meg szignifikánsan a paclitaxel apoptózisra gyakorolt hatását a FaDu sejtvonalban.

Cx43- és Bcl-2-expresszió fej-nyaki tumoros betegekből származó szövettani mintákon

A Cx43 és a Bcl-2 fehérjék immunhisztokémiai vizsgálata 97 páciens szövettani mintája közül 58 esetében volt értékelhető. 44 (75,9%) esetben láttuk a Cx43 fehérje magas expresszióját (Cx43^M). A Cx43 státusz összefüggést mutatott a betegség-specifikus túléléssel (DSS, $p=0,024$), az alacsony Cx43-expresszió (Cx43^A) rosszabb túléléssel társult. Nem mutattunk ki összefüggést a Cx43-expresszió és a tumor lokalizációja

($p=0,779$), a tumor mérete ($p=0,824$), a stádium ($p=0,638$), a nyirokcsomóáttét ($p=0,351$) és a neoadjuváns kemoterápiára adott válasz ($p>0,05$) között. A szövettani minták közül 9 (15,5%) esetben tapasztaltunk magas Bcl-2-expressziót (Bcl-2^M). Nem mutattunk ki összefüggést a Bcl-2-expresszió és a betegségspecifikus túlélés (DSS, $p=0,21$), a tumor lokalizációja ($p=0,531$), a tumor mérete ($p=0,136$), a stádium ($p=0,748$), a nyirokcsomóáttét ($p=0,111$) és a neoadjuváns kemoterápiára adott válasz ($p=0,544$) között. Megfigyeltük, hogy az alacsony Bcl-2-expresszió (Bcl-2^A) rosszabb túléléssel társul szájüregi lokalizáció esetén, azonban ez az összefüggés nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,056$). További érdekes észrevétel, hogy nyirokcsomóáttét gyakrabban fordult elő magas Bcl-2-expresszió esetén (9 Bcl-2^M esetből 7 betegnél volt nyirokcsomóáttét). A Cx43- és Bcl-2-expresszió együttes jelenlétét is megvizsgáltuk. Cx43^A + Bcl-2^A 8 (13,8%), Cx43^M + Bcl-2^A 41 (70,7%), Cx43^A + Bcl-2^M 6 (10,3%), míg Cx43^M + Bcl-2^M 3 (5,2%) fordult elő. A Cx43 és a Bcl-2 expressziója között szignifikáns összefüggést mutattunk ki: az alacsony Cx43-expresszió magas Bcl-2-expresszióval járt együtt ($p=0,013$). Ez a megállapítás arra utal, hogy a Cx43-negatív tumorok gyakrabban túltermelik a Bcl-2 fehérjét, mint a Cx43-pozitív daganatok. Nem mutattunk ki összefüggést a Cx43 és a Bcl-2 együttes expressziója és a betegségspecifikus túlélés (DSS, $p>0,05$), a tumor lokalizációja ($p=0,904$), a tumor mérete ($p=0,687$), a stádium ($p=0,924$), a nyirokcsomóáttét ($p=0,43$) és a neoadjuváns kemoterápiára adott válasz ($p>0,05$) között.

Potenciális terápiás célpontok azonosítása fej-nyaki tumorokban

EGFR-gátlók hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére

Eredményeink alapján mindkét EGFR-gátló dózisfüggő módon csökkentette a sejtek életképességét, azonban az afatinib erősebb gátló hatást fejtett ki, mint az erlotinib. Az afatinib már a legkisebb alkalmazott koncentrációban (0,25 nM) csökkentette a viabilitást, míg az erlotinib esetében ez 62 nM-nál történt meg mindhárom sejtvonalnál. Sem az erlotinib, sem az afatinib nem okozott teljes sejtpusztulást a legmagasabb koncentrációban sem a Detroit 562 és az SCC25 sejtvonalak esetében, azonban az afatinib 5 µM-os koncentrációban szinte teljesen elpusztította a FaDu sejteket. Szignifikáns különbséget figyeltünk meg a két EGFR-gátló hatása között valamennyi sejtvonalnál. A FaDu és az SCC25 sejtek mindkét EGFR-gátlóra érzékenyebbek voltak, mint a Detroit 562 sejtek, ami arra utal, hogy a Detroit 562 sejtek kevésbé függenek az EGFR-jelátviteltől.

MEK-gátlók hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére

A selumetinib- vagy trametinibkezelés csak kis mértékben csökkentette a Detroit 562 és a FaDu sejtek életképességét. Ezzel szemben az SCC25 sejtek mindkét MEK-gátlóra meglehetősen érzékenyek voltak. A trametinib szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult SCC25 sejteken, mint a selumetinib, utóbbi csak magasabb koncentrációnál fejtett ki jelentős életképességgátló hatást. Bár az SCC25 sejtek érzékenyek bizonyultak MEK-gátlással szemben, egyik kezelőszer sem pusztította el az összes tumorsejtet a legmagasabb koncentrációban sem.

EGFR- és MEK-gátlók kombinációjának hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére

A kombinációs kísérleteinkhez a hatásosabb EGFR- és MEK-gátlót, az afatinibet és a trametinibet választottuk ki. Erős szinergista hatást figyeltünk meg a kombinációs kezelés használatakor mindhárom sejtvonal esetén. A Detroit 562 sejtekre az afatinib + trametinib kombináció erősebb gátló hatást gyakorolt, mint a trametinib önmagában. Az afatinibbel összehasonlítva ugyanez a különbség csak szűk koncentrációtartományban érvényesült. A Detroit 562 sejtek rezisztensek voltak afatinibbel szemben, az IC_{50} értéket a trametinibbel való kombinálás sem csökkentette elegendő mértékben. Ezzel szemben a FaDu sejtekre az inhibitorok együttes alkalmazása mind az afatinibhez, mind a trametinibhez viszonyítva erősebb életképességgátló hatást fejtett ki. Az afatinib és a trametinib közötti szinergizmus a FaDu sejtek esetében alacsony koncentrációtartományban is megfigyelhető, ami arra utal, hogy a kombinációs terápiával jelentős dózisredukció érhető el. Az SCC25 sejtekre az afatinib + trametinib kombinációs kezelés magasabb koncentrációknál ($0,19 \mu M$ fölött) fejtett ki az afatinibnél és a trametinibnél erősebb gátló hatást. Ez alapján az SCC25 sejtek nagyon érzékenyek monoterápiára, így kombinációs kezelés alkalmazása szükségtelen, és az csak a toxicitást növelné.

Fehérjeexpresszió és -foszforiláció fej-nyaki tumorsejtvonalakban

A kiválasztott fej-nyaki tumorsejtvonalakban vizsgáltuk az EGFR, valamint két, az EGFR által aktivált fontos kináz, az Akt és az ERK1/2 expresziós és foszforilációs szintjét. A lehetséges foszforilálható oldalláncok közül az EGFR esetében az Y1068-as autofoszforilációs helyet választottuk, mivel a leggyakrabban ez felel a MEK/ERK útvonal aktiválásáért. Az ERK1/2

esetében a T202/Y204, az Akt fehérjénél pedig az S472 foszforilációs helyet választottuk, mert többnyire ezek vesznek részt az említett jelátviteli utak aktiválásában. Nem találtunk szignifikáns eltérést a három sejtvonal EGFR-, Akt- és ERK1/2-expressziójában ($p>0,05$). Jelentős eltéréseket tapasztaltunk azonban a foszforilációs szintek vizsgálatakor. A pY1068-EGFR szintje szignifikánsan kisebb volt a FaDu sejtekben, mint a másik két sejtvonalban (Detroit 562: $p=0,002$ és SCC25: $p=0,011$). A pS473-Akt mennyisége a Detroit 562 sejtekben szignifikánsan nagyobbak bizonyult, mint a FaDu sejtekben ($p=0,013$). A pT202/Y204-ERK1/2 szintje pedig az SCC25 sejtekben szignifikánsan magasabb volt, mint a Detroit 562 sejtekben ($p=0,028$). Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a Detroit 562 sejtekben a PI3K/Akt útvonal aktívabb, míg az SCC25 sejtekben a MEK/ERK út az erősebb. Az eredmények azt is valószínűsítik, hogy a FaDu sejtekben ez a két jelátviteli út hasonló intenzitással működik.

MEK-gátlás hatása a fehérjefoszforilációra fej-nyaki tumorsejtvonalakban

A sejtvonalak expressziós és foszforilációs profiljának meghatározása után megvizsgáltuk a trametinib hatását a fehérjék mennyiségére, valamint az EGFR, az Akt és az ERK1/2 releváns foszforilációs szintjére. Trametinib hatására mindhárom sejtvonal esetén az ERK1/2-foszforiláció szignifikáns csökkenését figyeltük meg (Detroit 562: $p=9 \cdot 10^{-9}$, FaDu: $p=5 \cdot 10^{-8}$, SCC25: $p=9 \cdot 10^{-9}$). Érdekes módon a FaDu sejtekben az ERK1/2 aktivitásának csökkenésével a pY1068-EGFR ($p=0,03$) és a pS473-Akt ($p=0,003$) szintje jelentősen emelkedett, ami egy korábban vastagbél- és hasnyálmirigy-tumor sejtekben leírt visszacsatolási mechanizmus jelenlétére utal. Ezt a jelenséget a Detroit 562 és az SCC25 sejtekben nem észleltük.

Az EGFR expressziója és a pY1068-EGFR mennyisége fej-nyaki tumoros betegekből származó szövettani mintákon

97 páciens szövettani mintája közül az EGFR immunhisztokémiai vizsgálata 84, a pY1068-EGFR-é pedig 63 esetében volt értékelhető. A minták közül 78 (92,3%) esetben tapasztaltunk magas EGFR-expressziót. Az EGFR státusz összefüggést mutatott a hisztológiai differenciáltsági fokkal ($p=0,031$): magas EGFR-expresszió magasabb grade-del társult. Nem mutattunk ki összefüggést az EGFR-expresszió és a betegségspecifikus túlélés (DSS, $p=0,551$), a tumor lokalizációja ($p=0,369$), a tumor mérete ($p=0,690$), a nyirokcsomóáttét ($p=0,525$), a távoli áttét ($p=0,522$), a stádium ($p=0,182$), a dohányzás ($p=0,866$) és az alkoholfogyasztás ($p=0,707$) között. A szövettani minták közül 6 (9,5%) esetben találtunk magas pY1068-EGFR-mennyiséget. A pY1068-EGFR státusz összefüggést mutatott a betegségspecifikus túléléssel (DSS, $p=0,036$): a magasabb pY1068-EGFR-szint rosszabb túléléssel társult. Nem mutattunk ki összefüggést a pY1068-EGFR mennyisége és a tumor lokalizációja ($p=0,748$), a tumor mérete ($p=0,303$), a távoli áttét ($p=0,406$), a stádium ($p=0,273$), a grade ($p=0,745$), a dohányzás ($p=0,182$) és az alkoholfogyasztás ($p=0,951$) között. A nyirokcsomóáttét esetén statisztikailag szignifikáns összefüggést találtunk ($p=0,024$), azonban ezen kapcsolat biológiai relevanciáját nem tudtuk igazolni.

5. Következtetések

Az értekezésben bemutatott kutatómunkám eredményeiből az alábbi pontokban felsorolt következtetések vonhatók le:

1. Fordított korrelációt találtunk a fej-nyaki tumorok *in vitro* modelljeként vizsgált sejtvonalak és a tumoros betegekből származó szövetminták Cx43- és Bcl-2-expressziója között.
2. A magas Cx43- és az ezzel együtt járó alacsony Bcl-2-expresszió alkalmasnak bizonyult a paclitaxelkezelésre várható kedvezőbb válaszreakció előjelzésére. A legmagasabb Cx43- és a legalacsonyabb Bcl-2-szinttel rendelkező sejtvonal volt a leginkább érzékeny paclitaxelre. Ugyanakkor az alacsony Cx43- és a magasabb Bcl-2-szinttel bíró sejtvonalak alacsonyabb paclitaxelérzékenységet mutattak.
3. Eredményeink arra utalnak, hogy a Cx43 fehérje szerepet játszhat a Bcl-2 fehérje szintjének szabályozásában. Géncsendesítés alkalmazásával megállapítottuk, hogy a Cx43-expresszió csökkentése szignifikánsan emeli a Bcl-2 szintjét, amely csökkent paclitaxelérzékenységet és alacsonyabb apoptózisráta-t eredményez. Amikor pedig plazmidtranszfekcióval emeltük a Cx43 mennyiségét, az szignifikánsan csökkentette a Bcl-2-expressziót és érzékenyítette a sejteket paclitaxelkezeléssel szemben.
4. A Cx43 prediktív marker lehet fej-nyaki tumorokban taxánapu terápia esetén.
5. A pY1068-EGFR-szint emelkedése prognosztikus jelentőséggel bír fej-nyaki daganatokban. A pY1068-EGFR nagyobb mennyisége szignifikánsan kedvezőtlenebb betegségspecifikus túléléssel társul e daganattípus esetében.

6. A fej-nyaki daganatok *in vitro* modelljében a MEK/ERK és a PI3K/Akt jelátviteli utak tagjait érintő mutációk és fehérjefoszforilációk ismerete felhasználható az EGFR- és a MEK-gátlókkal, valamint ezek kombinációjával szembeni érzékenység predikciójára.
7. Olyan fej-nyaki tumorokban, amelyekben nincs jelen a MEK/ERK és a PI3K/Akt útvonalakat érintő mutáció és nem működik az ERK/EGFR visszacsatolási hurok, a MEK ígéretes terápiás támadáspont lehet.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

1. **Gurbi Bianka**, Brauswetter Diána, Péntes Kinga, Varga Attila, Krenács Tibor, Dános Kornél, Birtalan Ede, Tamás László, Csala Miklós: MEK Is a Potential Indirect Target in Subtypes of Head and Neck Cancers INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES. 24, 2782 (2023) doi:10.3390/ijms24032782

IF: 4,900

2. **Gurbi Bianka**, Brauswetter Diána, Varga Attila, Gyulavári Pál, Péntes Kinga, Murányi József, Zámbo Veronika, Birtalan Ede, Krenács Tibor, Becker David Laurence, Csala Miklós, Vályi-Nagy István, Peták István, Dános Kornél: The potential impact of connexin 43 expression on Bcl-2 protein level and taxane sensitivity in head and neck cancers – in vitro studies CANCERS 11: 12 Paper: 1848, 19 p. (2019) doi: 10.3390/cancers11121848

IF: 6,126

A disszertációtól független saját közlemények:

1. Czuczi Tamás, Murányi József, Móra István, **Gurbi Bianka**, Varga Attila, Papp Dávid, Schlosser Gitta, Csala Miklós, Csámpai Antal: Development of Novel Imipridones with Alkyne- and Triazole-Linked Warheads on the Tricyclic Skeleton, Showing Superior Ability to Eradicate PANC-1 and Fadu Cells Compared to ONC201. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 25: 23 Paper: 13176 (2024) doi: 10.3390/ijms252313176

IF: 4,900 (2023)

2. **Gurbi Bianka**, Dános Kornél, Birtalan Ede, Krenács Tibor, Kovács Borbála, Tamás László, Csala Miklós, Varga Attila: Potential Prognostic Role of Protein Kinase D Isoforms in Head and Neck Cancers. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 25: 19 Paper: 10274 (2024) doi: 10.3390/ijms251910274 **IF: 4,900 (2023)**
3. Murányi József, Duró Cintia, **Gurbi Bianka**, Móra István, Varga Attila, Németh Krisztina, Simon József, Csala Miklós, Csámpai Antal: Novel Erlotinib–Chalcone Hybrids Diminish Resistance in Head and Neck Cancer by Inducing Multiple Cell Death Mechanisms. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 24: 4 Paper: 3456, 18 p. (2023) doi: 10.3390/ijms24043456 **IF: 4,900**
4. Varga Attila, Nguyen Minh Tu, Péntzes Kinga, Bátaí Bence, Gyulavári Pál, **Gurbi Bianka**, Murányi József, Csérmely Péter, Csala Miklós, Vántus Tibor, Söti Csaba: Protein Kinase D3 (PKD3) Requires Hsp90 for Stability and Promotion of Prostate Cancer Cell Migration. CELLS 12: 2 Paper: 212, 15 p. (2023) doi: 10.3390/cells12020212 **IF: 5,100**
5. Pethő Lilla, Murányi József, Péntzes Kinga, **Gurbi Bianka**, Brauswetter Diána, Halmos Gábor, Csík Gabriella, Mező Gábor: Suitability of GnRH Receptors for Targeted Photodynamic Therapy in Head and Neck Cancers INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 20: 20 Paper: 5027, 17 p. (2019) doi: 10.3390/ijms20205027 **IF: 4,556**

6. Birtalan Ede, Dános Kornél, **Gurbi Bianka**, Brauswetter Diána, Halász Judit, Kalocsáné Piurko Violetta, Ács Balázs, Antal Bíborka, Mihályi Réka, Pató Anna, Fent Zoltán, Polony Gábor, Tímár József, Tamás László: Expression of PD-L1 on Immune Cells Shows Better Prognosis in Laryngeal, Oropharyngeal, and Hypopharyngeal Cancer. *APPLIED IMMUNOHISTOCHEMISTRY & MOLECULAR MORPHOLOGY* 26: 7 pp. e79-e85 (2018). doi: 10.1097/PAI.0000000000000590 **IF: 1,863**

7. Brauswetter Diána, **Gurbi Bianka**, Varga Attila, Várkondi Edit, Schwab Richárd, Bánhegyi Gábor, Fábíán Orsolya, Kéri György, Vályi-Nagy István, Peták István: Molecular subtype specific efficacy of MEK inhibitors in pancreatic cancers. *PLOS ONE* 12: 9 Paper: e0185687, 13 p. (2017) doi: 10.1371/journal.pone.0185687 **IF: 2,766**

8. Murányi József, Varga Attila, **Gurbi Bianka**, Gyulavári Pál, Mező Gábor, Vántus Tibor: In Vitro Imaging and Quantification of the Drug Targeting Efficiency of Fluorescently Labeled GnRH Analogues. *JOVE-JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS* 2017: 121 Paper: e55529, 9 p. (2017) doi: 10.3791/55529 **IF: 1,184**

9. Brauswetter Diána, Dános Kornél, **Gurbi Bianka**, Félegyházi Fruzsina Éva, Birtalan Ede, Meggyesházi Nóra, Krenács Tibor, Tamás László, Peták István: Copy number gain of PIK3CA and MET is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *VIRCHOWS ARCHIV* 468: 5 pp. 579-587., 9 p. (2016) doi: 10.1007/s00428-016-1905-1 **IF: 2,848**