DOI:10.14753/SE.2015.1722

Az EGF-receptor és a claudinok expressziós mintázatának vizsgálata a fej-nyak régió laphámrákjaiban

Doktori értekezés

Dr. Szabó Balázs

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Tóvári József osztályvezető, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Balázs Margit egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Gálffy Gabriella egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina egyetemi tanár, Ph.D.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pápay Judit egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Tamás László egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2014

DOI:10.14753/SE.2015.1722

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke 3

1. Bevezetés 5
1.1. A fej-nyaki laphámrákok prediszponáló tényezői 5
1.2. Molekuláris osztályozás 7
1.3. A kezelésről általában 7
1.4. Az epidermális növekedési faktor receptor 8
1.4.1. Az epidermális növekedési faktor receptor biológiája 8
1.4.2. Az EGF receptor daganatokban 10
1.5. A célzott kezelés szerepe a terápiában 13
1.5.1. Monoklonális antitestek 14
1.5.2. Kis molekulasúlyú tirozik-kináz inhibitorok 15
1.6. Sejtkapcsoló struktúrák, claudinok 19

2. Célkitűzések 24

3. Anyagok és módszerek 25
3.1.Betegek 25
3.2.Tissue microarray (TMA) blokk készítése 25
3.3 Az EGFR és a claudinok fehérjeszintű expressziójának vizsgálata 26
3.3.1. Primer antitestek 26
3.3.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok 27
3.4. Az EGFR génszintű vizsgálata fluoreszcens in situ hibridizációval 30
3.5. Molekuláris biológiai vizsgálatok 31
3.5.1. Tirozin-kináz domén mutáció vizsgálata 31
3.5.2. HPV infekció kimutatása PCR technikával 32
3.5.3. KRAS mutáció kimutatása 33
3.6. Statisztika 34

4. Eredmények 35
4.1. A beteganyag jellemzése, hisztopatológiai paraméterek összefüggése a prognózissal 35
4.2. EGFR génamplifikáció és emelkedett kópiaszám meghatározása 39
4.3. EGFR proteinexpresszió 42
4.4. EGFRvIII expresszió 45
4.5. TK domén mutáció 46
4.6. KRAS mutáció 47
4.7. HPV infekció 48
4.8. Az EGFR hibái, a hisztológiai jellemzők és a HPV infekció együttes statisztikai kiértékelése 49
4.9. Claudinok 51
4.9.1. A claudinok kifejeződése a fej-nyak régió normál hámjában 51
4.9.2. A claudinok kifejeződése a fej-nyak régió laphámrákjában 54

DOI:10.14753/SE.2015.1722

4.9.3. Összefüggés a claudin expresszió és a különböző klinikopatológiai paraméterek között 58
4.9.4. A claudinok prognosztikai szerepe a fej-nyaki laphámrákokban 61

5. Megbeszélés 64
5.1. Az EGFR-jelpálya humán fej-nyaki laphámrákokban 64
5.2. A claudinexpresszió humán fej-nyaki laphámrákokban 67

6. Következtetések 72

7. Összefoglalás 74

8. Irodalomjegyzék 76

9. Saját puplikációk jegyzéke 88

10. Köszönetnyilvánítás 89

DOI:10.14753/SE.2015.1722

Rövidítések jegyzéke

ADCC: antitestfüggő celluláris citotoxicitás (Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity)
Akt: protein kináz B (PKB)
ANOVA: varianciaanalízis (ANalysis Of Variance)
ATP: adenozin-trifoszfát
bp: bázispár
c-Met: hepatocyta növekedési faktor receptor
CIN: Cervicalis Intraepithelialis Neoplasia
CLDN: Claudin
CPE: Clostridium Perfringens Enterotoxin
DNS: dezoxiribonukleinsav
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav
EGF: epidermális növekedési faktor (Epidermal Growth Factor)
EGFR: epidermális növekedési faktor receptor (Epidermal Growth Factor Receptor)
EGFRvIII: epidermális növekedési faktor receptor III-as variáns (Epidermal Growth Factor Receptor variant III)
FDA: Egyesült Államok Élelmiszer és Gyógyszerfelügyelete (Food and Drug Administration)
FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció
GH20: Glycoside Hydrolase Family 20
GP5+: General Primer 5+
GP6+: General Primer 6+
HCC: hepatocelluláris carcinoma
HER: Human Epidermal Receptor
HNSCC: a fej-nyak régió laphámrákja (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma)
HPV: Humán papillomavírus
JAM: junkcionális adhéziós molekulák
kDa: kilodalton
KSH: Központi Statisztikai Hivatal
MAPK: mitogén aktivált protein kináz
mCRC: metasztatikus colorectális rák
NSCLC: nem-kissejtes tüdőrák (Non-Small-Cell Lung Carcinoma)
NK-sejtek: természetes ölősejtek (Natural Killer cells)
p: valószínűség (probability)
PCR: polimeráz láncreakció
PDZ: PSD95 (Posztszinaptikus denzitás fehérje-95), Disc-large (Dlg), ZO-1 (Zona occludens-1)
PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz
PLC: foszfolipáz C
R: rangkorrelációs együttható
RAF: rat fibrosarcoma
RAS: rat sarcoma
RFLP: restrikciós fragmenshossz polimorfizmus (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RR: relatív kockázat (Relative Risk)
RTOG: Radiation Therapy Oncology Group
SH2: Src homológ 2
STAT: transzkripció jeltovábbító és aktivátor (Signal Transducer and Activator of Transcription)
TGF-α: transzformáló növekedési faktor alfa (Transforming Growth Factor-α)
TK: tirozin-kináz
TKI: tirozin-kináz inhibitor
TJ: Tight Junction
TMA: szöveti microarray technológia (Tissue Micro Array)
TNM: tumor-nyirokcsomó-metasztázis (Tumor-Node-Metastasis)
ZO: Zonula Occludens

DOI:10.14753/SE.2015.1722

1. Bevezetés

A rosszindulatú fej-nyaki daganatok legnagyobb részét (mintegy 90%-át) a laphámrákok (HNSCC) teszik ki. A tápcsatorna felső szakaszából és a felső légutak hámjából kiinduló laphámrákok döntő többsége szájüregi, garat és/vagy gége eredetű, egységes a szövettani szerkezetük és hasonló etiológiával rendelkeznek. A fej-nyaki laphámsejtes tumor világszerte 600 000 új eset megjelenésével 2012-ben a hatodik leggyakoribb daganatféleség, mortalitása 320 000. A KSH adatai szerint Magyarországon 2011-ben közel 4400 új beteget regisztráltak, ami incidencia és mortalitás tekintetében a tüdő- és a colorectalis daganatok után a férfiak körében a 3. helyet jelenti. A férfi-nő arány 5-6 az 1-hez; a legveszélyeztetettebb életkor 45-65 év közöttre tehető.[1,2] Prognózisuk igen rossz, a legtöbb esetben a betegek késői stádiumban fordulnak orvoshoz a malignus elváltozással. Az elmúlt évtizedekben a sebészi terápia, valamint a kombinált kemo- és radioterápia sokat fejlődött, azonban a lokoregionálisan előrehaladott és/vagy távoli áttéteket is adó fej-nyaki tumorokban szenvedők túlélése ezzel párhuzamosan nem növekedett szignifikánsan. Nagy változást hozott, illetve hozhat a betegség kimenetelében és a minőségi túlélés tekintetében a jelenleg legkorszerűbb daganatellenes kezelés, a targetspecifikus terápia. A kezelés ezen újabb módja kiegészítheti vagy akár helyettesítheti is a citosztatikus szerek alkalmazását, és az életminőséget kevésbé rontó mellékhatás profillal rendelkezik.

1.1 A fej-nyaki laphámrákok prediszponáló tényezői

A két közismert rizikófaktor, a leggyakoribb kémiai karcinogének, az alkoholfogyasztás és dohányzás mellett egyre több adat utal a virális etiológia lehetséges szerepére a fej-nyaki laphámrákok kialakulásában. A megjelent tanulmányok szerint integrált HPV-t a HNSCC-k 19-35 százalékában lehet kimutatni.[3,4] Egy 2005-ben publikált metaanalízisben a HPV infekció prevalenciáját fej-nyaki daganatokban 25,9 százalékra teszik világszerte.[5] Hasonlóan a méhnyakrákokhoz, a leggyakoribb onkogén törzsek a HPV 16 és -18, mely valószínűsíti a karcinogenezis hasonlóságát a két daganattípusban. A szájüreg felől a gégéig a HPV+ HNSCC gyakorisága csökken.[5,6,7]

Genetikailag a HPV-pozitív tumorokat kevés génhiba jellemzi. Onkogén vagy szuppresszorgén mutációkat, illetve egyéb fehérje szintű elváltozásokat szinte alig lehet bennük kimutatni.[9] Igaz ez az epidermális növekedési faktor receptorára (EGFR, epidermal growth factor receptor) is, amely általában normál kópiaszámban fordul elő, és a HPV indukált daganatokban a vad típusa van jelen.[7] Az EGFR-ről számos tanulmányban kimutatták, hogy fokozott expressziója rosszabb prognózissal társul, így expressziós profilja a fej-nyaki daganatok egyik legfontosabb molekuláris jellemzője.[16]
Szövettanilag a HPV-pozitív csoport általában magasabban differenciált, gyakran verrukózus jellegű, és számos tanulmány szerint szignifikánsan jobb túléléssel társul, ami a daganatok fokozottabb sugár- és kemoterápiás érzékenységében nyilvánul meg.[5,8]
Ennél jóval heterogénebb a kémiai karcinogenezis útján keletkező HPV-negatív csoport, melyben az EGFR számos hibája, amplifikációja és poliszómiája, valamint a p53 tumorszupresszorgén mutációja is gyakran megtalálható.[4,9] Hazai beteganyagunkon az anamnesztikus adatok alapján a HPV-pozitív esetekre jellemzőbb a kémiai és virális karcinogenezis együttes jelenléte; az igazoltan virális etiológiai eredet ritka.
További rizikótényezőt jelenthetnek a táplálkozási hiányállapotok, az elhanyagolt szájhigiénia, és természetesen minden károsanyag, amellyel a gége, a garat és szájüreg kapcsolatba kerülhet (étel, toxikus gázok, gőzök).
Ismert, hogy az anatómiai lokalizációtól függően a daganatok rendkívül eltérő génmintázatot hordoznak, amely azonos külső és belső hatásokra eltérő biológiai viselkedésű, progressziós képességű és terápiás érzékenységű rákok kialakulásához vezet; így pl. a hypopharynx daganatai lényegesen malignusabban viselkednek, mint például a gége- vagy a tonsillatumorok.[10]

DOI:10.14753/SE.2015.1722

1.2 Molekuláris osztályozás

Korábban számtalan vizsgálat elemezte a HNSCC-ben előforduló genetikai eltéréseket: ezekből gyakorlatilag 4 olyan jelentős molekuláris csoport állítható fel, melyek patológiai és klinikai jelentőséggel rendelkeznek (**1. táblázat**).[11]

GENETIKAI MARKER	HNSCC1	HNSCC2	HNSCC3	HNSCC4
HPV	+	-	-	-
P53 mutáció	-	+	-	-
P16 inaktiváció	-	+	+	-
EGFR	(+)	+++	++	++

1. táblázat: ***Fej-nyaki rákok molekuláris klasszifikációja***[11]

1.3 A kezelésről általában

A HNSSC-k kezeléséről általánosságban elmondható, hogy a korai, I. és II. stádiumú tumorok esetében műtét vagy sugárkezelés választható monoterápiaként a beteg általános állapota és funkcionális szempontok alapján. Az esetek nagyobb részében a betegség a felfedezés pillanatában már előrehaladott stádiumú (III-IV) a primer tumor kiterjedése és/vagy regionális nyaki nyirokcsomóáttét, ritkábban távoli áttét jelenléte miatt. Ezekben az esetekben indukciós kemoterápia, kombinált radiokemoterápia és sebészi beavatkozás jön szóba, illetve a legtöbb esetben ezek kombinációja.[5,12,13]

A III-IV. stádiumú tumorban szenvedő betegek 5 éves túlélése a fenti kezelések ellenére a legtöbb tanulmányban 20-40% között mozog.[12,14] Újabb előrelépést hozhat azonban a HNSCC molekuláris sajátosságaira alapozott célzott kezelés.

Miután a HNSCC-k egyik fő jellemzője az EGFR-overexpresszió, ezért az EGF-receptort célzó gyógyszerek a fej-nyaki tumorok esetében is kipróbálásra, illetve bevezetésre kerültek.

DOI:10.14753/SE.2015.1722

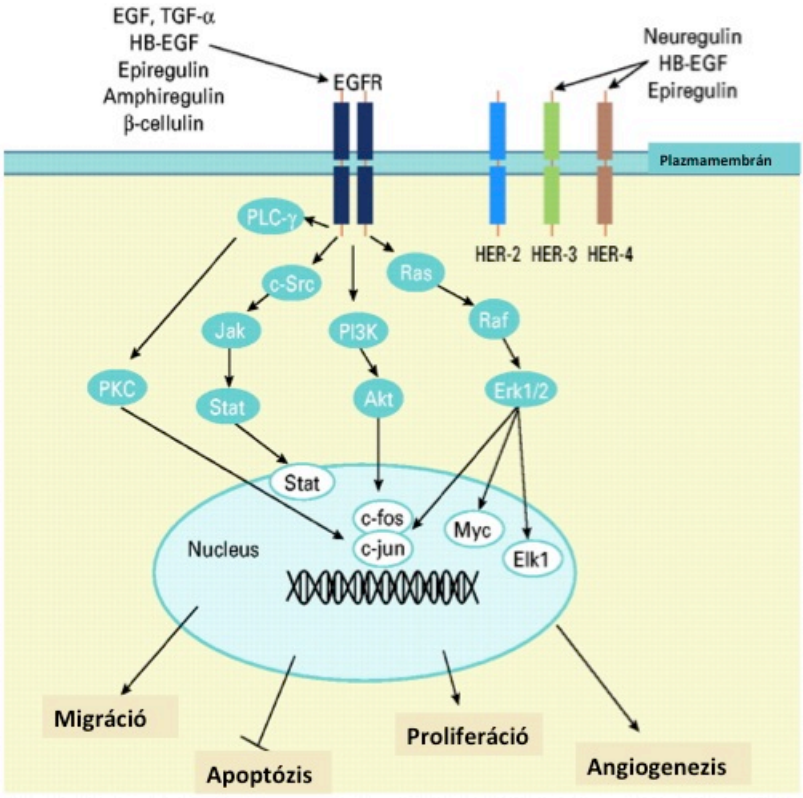
1.4 Az epidermális növekedési faktor receptor

1.4.1 Az epidermális növekedési faktor receptor biológiája

A c-erbB receptorcsaládba négy, szerkezetében és működésében hasonló, tirozin-kináz aktivitással rendelkező receptor tartozik, melynek elsőként leírt tagja a c-erbB-1 vagy HER-1 néven is ismert epidermális növekedési faktor receptor (EGFR). Az EGFR egy 170 kDa tömegű glikoprotein, mely egy extracelluláris ligandkötő régióból, egy hidrofób transzmembrán régióból és egy tirozin-kináz aktivitással rendelkező intracelluláris doménből áll.[15]

Számos ligand aktiválhatja a receptort, melyek közül a legjelentősebbek az epidermális növekedési faktor (EGF) és a transzformáló növekedési faktor-α (TGF-α). Ezeken kívül kötődhet még az epiregulin, amfiregulin, a heparin-kötő EGF és a bétacellulin. A ligandkötést követően a receptor homo- ill. heterodimerizálódik a sejtfelszínen, a receptor-ligand komplex internalizálódik, majd az intracitoplazmatikus tirozin-kináz domén autofoszforilálódik. A foszforilált tirozin oldalláncokat különböző SH2-domént tartalmazó molekulák ismerik fel, melyek számos intracelluláris jelátviteli kaszkádot indítanak be. Az EGF-receptor esetében a legfontosabb útvonal a RAS-Raf-MAP-kináz és a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) - Akt-kináz útvonal. Jelátviteli útként szerepelhet továbbá a foszfolipáz-C-γ (PLCγ), valamint a STAT1 és STAT3 is (**1. ábra**).[16]

DOI:10.14753/SE.2015.1722



1. ábra: ***Az EGF receptor fő jelátviteli útjai és a sejtszintű válaszok*** (Andrew és munkatársai alapján)[17]

Normál sejtekben ezen útvonalak a proliferáció és a differenciáció serkentésével a szöveti homeosztázis fenntartásáért felelősek. Tumorsejtekben azonban aktivációjuk fokozza az angiogenezist, gátolja az apoptózist, valamint sejtadhéziót, inváziót és metasztázisképzést eredményez.[16,18]

1.4.2 Az EGF receptor daganatokban

Normál hámsejtekben sejtenként mintegy 40 000 - 100 000 EGFR expresszálódik. A fej-nyaki laphámrákoknál gyakran kimutatható a c-erbB család receptorainak, különösen az EGFR-nek és a HER-2-nek az overexpressziója. A normál sejteknél sokszorosan több EGFR molekulát hordozó tumorsejtekben az EGFR jelátviteli útjainak nagymértékű stimulációja nagyban hozzájárul a malignitás kifejlődéséhez. Ezenkívül a gyorsan proliferáló sejteknek megnövekedett kapacitásuk lehet arra, hogy a DNS-ben keletkezett hibákat kijavítsák, így képesek ellenállni a kemo- és sugárterápia toxikus hatásainak.[16] Az EGFR fokozott expresszióját a legtöbb epiteliális eredetű daganatban kimutatták: nem-kissejtes tüdőtumorokban (NSCLC, non-small cell lung cancer), colorectalis, ovárium, emlő, prosztata és vesedaganatokban, gliomákban, valamint fej-nyaki laphámsejtes tumorokban.[14] Nicholson és munkatársai metaanalízis segítségével húgyhólyag-, méhnyak-, nyelőcsőrák, a fej- és nyaki régió daganatai, valamint ováriumrák esetén kimutatták, hogy az emelkedett EGFR-aktivitás erősen összefügg a rossz prognózissal. Az EGFR-státusz mérsékelt összefüggést mutatott a túléléssel emlő-, gyomor-, vastagbél- és endometriumrák esetén.[19]

Több tanulmány szerint fej-nyaki daganatok esetében az EGFR fehérje overexpressziója 70-90 százalék közé tehető.[14,18,20] Mivel az EGFR génamplifikáció több kutatás szerint is mindössze 17-31 százalékban fordul elő, ezért feltehetően a fehérje-overexpresszió hátterében inkább a fokozott transzkripció áll.[21,22] Többen kimutatták, hogy a membrán emelkedett EGFR száma fej-nyaki tumorok esetében a karcinogenezis korai jele, mivel már az egészségesnek látszó mucosában is kimutatható.[14,23] Az EGFR overexpresszió és amplifikáció fej-nyaki tumoros betegeknél is kedvezőtlenebb túléléssel társul.[18,22]

Az EGF receptornak több hibája ismert epiteliális eredetű tumorokban, melyek az anti-EGFR terápia hatásosságát befolyásolják. Egy speciális eset az EGFRvIII kialakulása, melyet az extracelluláris ligandkötő domén 2-7 exonjának delációja hoz létre. Ennek következménye egy konstitutívan, ligandtól független módon aktív receptor, amely esetében a receptor endocitózisa sem megy végbe, ezáltal a sejt nem képes az aktivitást gátló szabályozására.[24] Az EGFRvIII génszintű amplifikációja gyakori glioblastomás betegekben és ritkábban (10%) előfordul nem-kissejtes tüdőrák, emlő- és ováriumrák

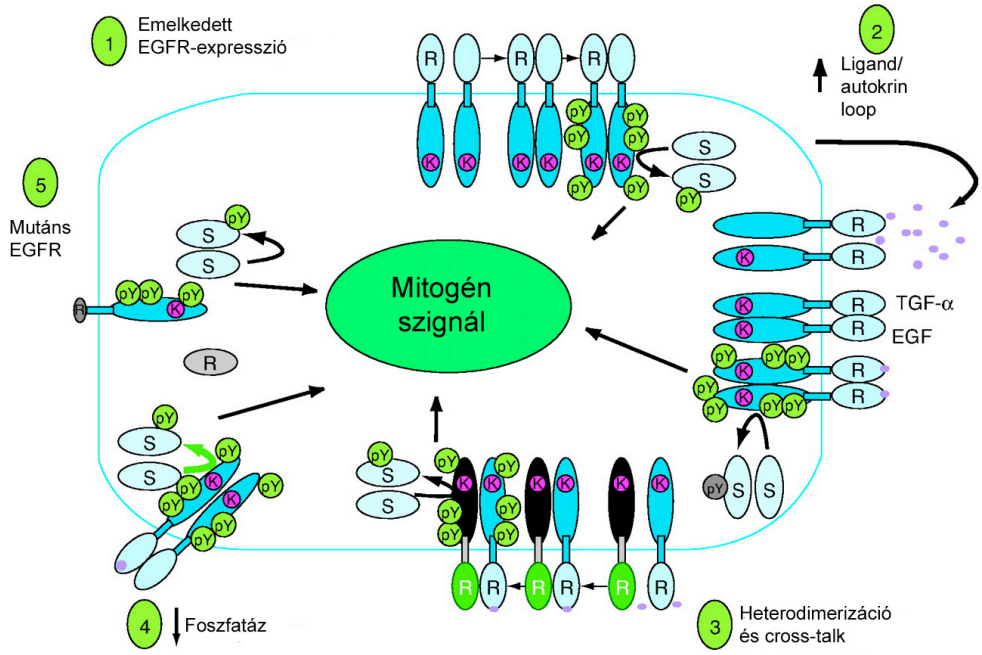
esetén is.[25,26] Fej-nyaki tumorok esetében kevés adat van a vIII variáns előfordulásáról; egy 2006-ban megjelent tanulmányban a vizsgált tumorok 42 százaléka expresszálta a receptor mutáns formáját.[27]

A tirozin-kináz domén 18, 19 és 21-es exonjában létrejövő mutáció szintén igen gyakori egyes tumorokban (pl.: NSCLC), előfordulása azonban fej-nyaki daganatos betegekben több vizsgálat szerint is extrém ritka. Az európai populációban igen alacsony előfordulású, egy ázsiai vizsgálatban a mutáció gyakoriságát a vizsgált betegek körében 7,3 százalékosnak találták. NSCLC-ben a 19. és 21. exon aktiváló EGFR mutációi szoros korrelációt mutattak az EGFR gátlókra adott kedvező klinikai válasszal. Az a tény, mely szerint HNSCC-ben ritkák vagy nem mutathatók ki ezek a mutációk, alátámaszthatja a közelmúltban fej-nyaki daganatokon végzett klinikai vizsgálatokban kapott relatív alacsony szintű klinikai válaszokat.[28,29,30]

A RAS fehérje az EGF receptoron keresztül aktiválódó jelátviteli kaszkád egyik legjelentősebb regulátorfehérjéje. Az onkogén RAS, ami az egyik leggyakoribb génhiba humán daganatokban, pontmutáció révén keletkezik, és leggyakrabban az 1. exon 12. és 13. kodonjában jön létre, melynek eredményeként konstitutívan aktív lesz a fehérje. A RAS családba tartozó KRAS mutációja leginkább a hasnyálmirigyrákokat jellemzi (az esetek 90%-ban jelen van), de gyakori még colorectalis és epeúti karcinómákban, ováriumtumorokban és NSCLC-ben is.[31,32,33] Ezzel szemben HNSCC-ben nagyon ritkán fordul elő.[20,34]

DOI:10.14753/SE.2015.1722

Az EGFR szabályozatlan aktivációja többféle módon létrejöhet, mely lehet ligandfüggő és ligandfüggetlen is (**2. ábra**). Egyrészt az EGF-receptor overexpressziója megnöveli a sejtfelszíni receptorok random találkozásának és dimerizálódásának esélyét és az aktivitási jel megszületését;[35,36] másrészt az EGF-receptor ligandjainak (EGF és TGF-α) túlzott expressziója a jelátvitel túlműködéséhez vezet (prostatarák, NSCLC).[37,38,39] Harmadrészt az EGFR más tirozin-kináz aktivitású receptorokkal való heterodimerizációja, pl. a Her-2 az EGF-receptorral képzett komplexe és keresztfoszforilációja növeli az EGFR ligandkötődési affinitását, megnő a heterodimer életideje, ezáltal a pozitív mitogén szignálok stabilizálódnak.[40] Az inaktivációt szabályozó foszfatázok gátlása ugyancsak a mitogén jel erősödését eredményezi.[36] Végül az EGFRvIII variánsa szintén a jelátviteli út szabályozatlan aktiválásához vezethet.



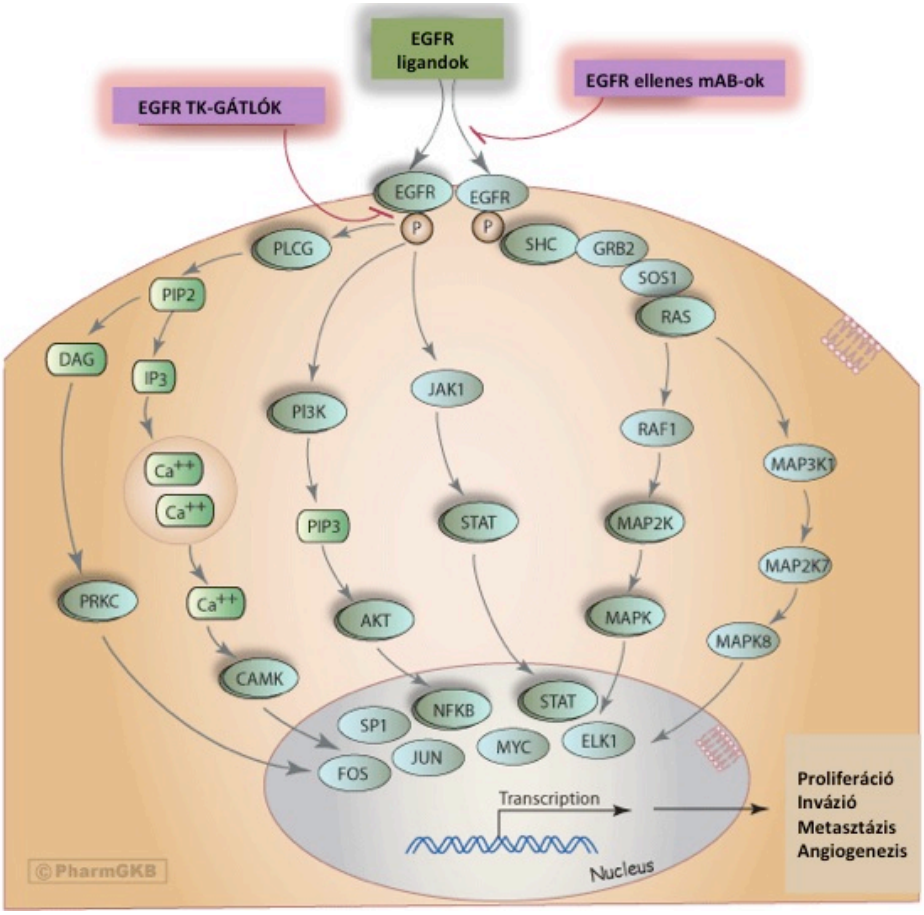
2. ábra: A fokozott EGFR-aktivitás lehetséges útjai[37]. (R = receptor; S = szubsztrát; K = tirozin-kináz; pY = foszforilált tirozin reziduum)

DOI:10.14753/SE.2015.1722

1.5 A célzott kezelés szerepe a terápiában

Többféle daganattípus, többek között a HNSCC esetén igazolódott, hogy a tirozin-kináz jelpálya abnormális aktivitása szerepet játszik a kontrollálatlan proliferáció, az invázió és a metasztázisképzés folyamataiban, ezért a daganatellenes kezelésnek optimális célpontjai lehetnek a növekedési faktor-receptorok.

Az EGF-receptor gátlására jelenleg két hatóanyagcsoport áll rendelkezésre: a gátlás megvalósulhat egyrészt extracellulárisan ható monoklonális antitestekkel, valamint kismolekulasúlyú tirozin-kináz inhibitorokkal, melyek intracellulárisan a receptor tirozin-kináz enzimaktivitását blokkolják (**3. ábra**).



3. ábra: ***Az EGFR gátlás lehetőségei*** (Li Gong és munkatársai alapján)[41] *A monoklonális antitestek (mAb) extracellulárisan, a kis molekulájú tirozin-kinázgátlók (TKI-k) intracellulárisan fejtik ki hatásukat*

DOI:10.14753/SE.2015.1722

1.5.1 Monoklonális antitestek

A monoklonális antitestek tumorellenes hatása többféle lehet. Gátolhatják a ligand bekötődését és az ezt követő konformációváltozást, így a szignáltraszdukció beindulását. Egyes antitestek a receptorok dimerizálódását akadályozzák meg. Egy monoklonális antitest kötődése a receptorban olyan konformációváltozást idézhet elő, amely csökkenti a jeltovábbítást, minek következtében a túlélést serkentő jelek csökkennek, s ezáltal érzékennyé válnak a tumorsejtek a sejtpusztító kezelés iránt. Ezen hatásokat erősíti az immunrendszer antitestfüggő immunválasza is az antitesttel megjelölt tumorsejtekkel szemben.[42,43,44]

A legalaposabban tanulmányozott anti-EGFR monoklonális antitest a cetuximab (C225, Erbitux®), mely a receptorhoz kötődve gátolja a tumornövekedést, a metasztázisképzést, az angiogenezist és a DNS-javító mechanizmusokat. Az EGFR ligandkötő régióját felismerve a cetuximab leszorítja a receptor természetes ligandjait, serkenti a felszíni receptorok endocitózisát, másrészt aktiválja az NK-sejteket és a makrofágokat, ezáltal pedig beindul az antitestfüggő celluláris citotoxicitás (ADCC) a tumorsejtek ellen.[45,46]

Több klinikai vizsgálat kimutatta, hogy a sugárkezeléssel kombinált cetuximab szignifikánsan növelte a lokálisan előrehaladott fej-nyaki tumoros betegek tünetmentességét és túlélését. Bonner és munkatársai 2006-ban publikálták vizsgálatukat, melybe 424 beteget randomizáltak. Az egyik csoport teljes dózisú sugárkezelést kapott monoterápiaként, a másik csoportnál ezt cetuximab adásával kombinálták. A cetuximab szignifikánsan növelte a betegség progressziómentes túlélését 14,9 hónapról 24,4 hónapra, illetve a teljes túlélést 29,3 hónapról 49 hónapra.[47] Ez volt az első olyan vizsgálat, melyben bizonyították a cetuximab hatásfölényét egy hagyományos terápiával, az irradiációval szemben HNSCC esetében.

Vermorken és munkatársai 2008-ban rekurrens, illetve metasztatikus fej-nyaki tumoros betegek esetében kombinációs terápiában vizsgálták a kemoterápia (ciszplatin vagy carboplatin és 5-fluorouracil) és a cetuximab hatását. A lokális tünetmentesség 5,6 hónapra növekedett cetuximab és kemoterápia együttes alkalmazásával az önmagában alkalmazott kemoterápiával elért 3,3 hónaphoz képest, az átlagos túlélés pedig 7,4 hónapról 10,1 hónapra emelledett.[48]

Az RTOG 0522 III. fázisú klinikai vizsgálat eredménye szerint nincs szignifikáns előnye a túlélésben a cetuximabbal kombinált kemoradioterápiának a cetuximab nélküli kemoirradiációval szemben.[49,50]

A fenti eredmények ismeretében az FDA (Food and Drug Administration) két indikációban engedélyezte a cetuximab használatát HNSCC esetén: lokálisan előrehaladott betegség esetén sugárterápiával kombinálva illetve recidív és/vagy metasztázist adó betegség esetén platina alapú kemoterápiával kombinálva.[51] Ezen kívül engedélyezett még metasztatikus colorectális (mCRC) és emlődaganatok, valamint az Amerikai Egyesült Államokban NSCLC terápiájában.

A cetuximab hazánkban is elérhető szer, a külföldi ajánlásoknak megfelelő indikációban adható. Telítő dózisa: 400 mg/m^2/hét, fenntartó dózisa: 250 mg/m^2/hét. Intravénásan alkalmazandó.

1.5.2 Kis molekulasúlyú tirozin-kináz inhibitorok

A kis molekulásúlyú inhibitorok intracellulárisan a tirozin-kináz régióban a molekula ATP-kötő zsebéhez kötődnek, ezáltal versengve a szubsztrátszintű foszforilációban fontos szerepet játszó ATP-vel. Ennek következtében az intracelluláris tirozinok foszforilációja elmarad, az aktivációs jel nem továbbítódik.

A TK-inhibitorok (TKI) tumorellenes aktivitását már számos, az EGFR-t túlexpresszáló szolíd tumorban vizsgálták, például NSCLC-ben, pancreas tumorban, glioblastomában és HNSCC-ben. A tirozin-kináz domén 18, 19, 20 és 21-es exonjának mutációját már számos tanulmányban leírták, és eltérő gyakorisággal ugyan, de ezekben a daganatokban előfordulnak. A TK domén mutációi három csoportba oszthatók: a 19-es exonban létrejöhet in-frame deléció, mely általában a 747-es pozícióban lévő leucin és a 749-es glutamát közötti szakaszt érinti. Ez az összes TK mutáció 44 százalékáért felelős. Pontmutáció szintén kialakulhat: leggyakrabban a 21-es exonban egy leucin argininra cserélődik (L858R), de nem ritka, hogy a 719-es pozícióban lévő glicin szerinre, alaninra, vagy ciszteinre cserélődik. A harmadik csoportot in-frame duplikációk és/vagy inzerciók alkotják, melyek viszonylag ritkán fordulnak elő.[52]

Az erlotinib (OSI-774, Tarceva®- *Roche*) egy orálisan is aktív gyógyszer, mely szelektíven és reverzibilisen gátolja az EGFR tirozin-kináz aktivitását. Több

vizsgálatban kimutatták, hogy nem-kissejtes tüdő adenocarcinomák és pancreastumorok esetében szignifikánsan megnöveli a túlélést, ezért az FDA 2004-ben engedélyezte használatát kemoterápiára rezisztens, előrehaladott NSCLC kezelésére, 2005-ben pedig gemcitabinnal kombinálva olyan áttétes pancreastumoros betegek kezelésére, akik megelőzően nem kaptak kemoterápiát.[53]

Fej-nyaki tumorok esetében az erlotinib hatása igen mérsékelt. Soulieres és munkatársai 2004-ben publikáltak egy fázis II vizsgálatot, melyben kiújult és metasztatikus tumorokon vizsgálták az erlotinib hatását. A betegeknek mindössze 4,3 százaléka reagált a kezelésre, az átlagos túlélés pedig 6 hónap volt. Hagyományos citotoxikus kemoterápiával ennél jobb eredményeket is sikerült elérni, így ebből arra lehet következtetni, hogy az erlotinib önmagában, ebben a populációban nem hatásos.[54]

A gefitinib (ZD1839, Iressa® – *AstraZeneca*) szintén orálisan aktív EGFR specifikus anilinokinazolin, mely reverzíbilisen gátolja a receptor autofoszforilációját. Preklinikai vizsgálatokban gefitinibbel végzett monoterápiával és kombinációs kezeléssel egyaránt sikerült antiproliferatív és proapoptotikus hatást elérni, a klinikai eredmények azonban nem ilyen biztatóak. Cohen és munkatársai vizsgálták először a gefitinib monoterápiát áttétes és recurrens HNSCC-s betegekben, és mindössze 10,6 százalékos reagálási arányról számoltak be.[55] A mai napig egyetlen olyan III-as fázisú vizsgálatot hoztak nyilvánosságra, melyben a gefitinib+metotrexát kombinációt hasonlították össze a metotrexát monoterápiával. A gefitinib sem a túlélést, sem a reagálási készséget nem növelte meg a vizsgált betegcsoportban.[56] A gefitinibet a lokálisan előrehaladott vagy áttétes, nem-kissejtes tüdőrákban szenvedő felnőtt betegek kezelésére törzskönyvezték, dózisa 250 mg/nap.

Mindezek alapján elmondható, hogy bár a preklinikai vizsgálatok alapján az EGF-receptor ideális célpontnak tűnt a daganatterápiában, a klinikai eredmények mégsem feleltek meg teljes mértékben az elvárásoknak. Megjelentek olyan publikációk is, melyek szerint a tumoros betegeknek mindössze 10-20 százaléka reagál megfelelően az anti-EGFR kezelésre. Egy részük már a terápia kezdetén sem fogékony ezen gyógyszerekre, míg másik részüknél szerzett rezisztencia alakul ki.[57,58] Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy alternatív jelátviteli útvonalak aktiválódnak, mint például a PI3K/AKT, c-Met, Src.[59,60] Elméleti lehetőségként felmerül a szignáltranszdukció egyedüli, vagy esetleg kombinációban (multitarget stratégia) történő gátlása (pl.

MAPK-gátlók, Raf-gátlók, PI3K-gátlók). Intenzív kutatások tárgyát képezi, hogy ezen lehetőségek miként valósíthatók meg a daganatterápiában, és vajon hoznak-e előrelépést a klinikumban.[58,61]

Több klinikai vizsgálat zajlik mind a monoklonális antitestekkel, mind a kis molekulasúlyú inhibitorokkal kapcsolatban, melyek alapján bizonyos hatóanyagok már a mindennapi onkológiai terápiában is elérhetőek (**2. táblázat**).[62]

DOI:10.14753/SE.2015.1722

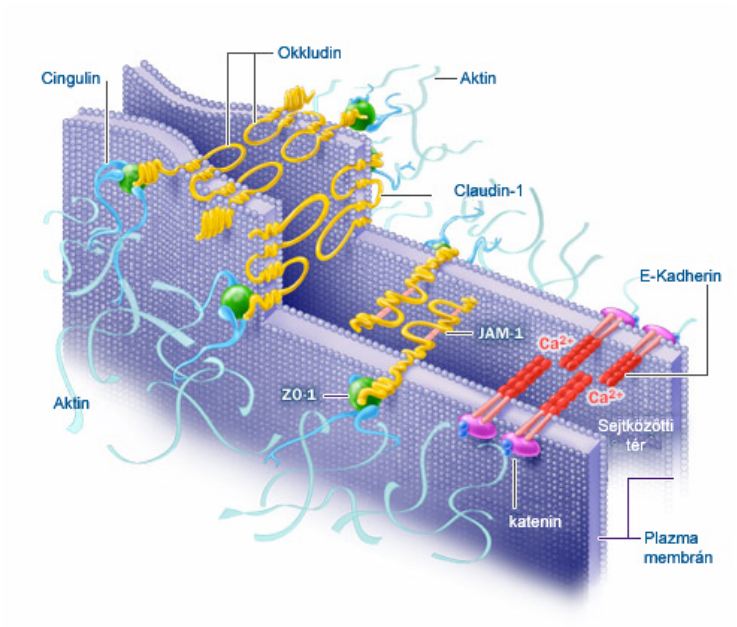
Tirozin-kináz gátló	**Célpont**	**Terápiás felhasználás**
PD1535035	EGFR	csak preklinikai kutatási célokra
gefitinib (Iressa®, ZD1839)	EGFR	NSCLC
erlotinib (Tarceva®, OSI-774)	EGFR	NSCLC, pancreasrák
lapatinib (Tycerb/Tyverb®, DB01259)	EGFR, Her-2	emlőrák
pelitinib (EKB-569)	EGFR (irreverzibilis)	klinikai kutatás alatt áll
Sym004	EGFR	HNSCC, klinikai kutatás alatt
Monoklonális antitestek	**Célpont**	**Terápiás felhasználás**
cetuximab (C225, Erbitux®-*Merck*)	EGFR	HNSCC, mCRC emlődaganat, NSCLC
zalutumumab,panitumumab, nimotuzumab, ABT806	EGFR	klinikai kutatás alatt áll

2. táblázat: Fontosabb EGFR-ellenes kis molekulasúlyú tirozinkináz gátlók és monoklonális antitestek terápiás felhasználhatósága

DOI:10.14753/SE.2015.1722

1.6 Sejtkapcsoló struktúrák, claudinok

A sejtkapcsoló struktúrák a sejtek felszínén található szerkezetek, melyek szerepe a szomszédos sejtek közötti mechanikai kapcsolat és kommunikáció biztosítása, valamint a sejtek környezetükhöz való rögzítése. E struktúrák a hámszövet szerveződésében nagy jelentőséggel bírnak, fellazulásuk több megbetegedésben, köztük a daganatokban is megfigyelhető. A sejtkapcsoló struktúrákat alkotó fehérjék eltérése több daganatban kimutatható, ezek potenciális terápiás targetként is szerepelhetnek.
A sejtek közötti kapcsolatokat funkcionális szempontból feloszthatjuk lezáró, lehorgonyzó és kommunikáló sejt-sejt kapcsolatokra (**4. ábra**).



4. ábra: ***Zonula occludens és zonula adherens szerkezete és interakciói*** (Scheimer és munkatársai alapján)[63]

A **lezáró kapcsolatok**, a *zonula occludens* (zároléc, *tight junction (TJ)*) jellemzően az epitélsejtek hordópántszerűen körbefutó sejtkapcsoló struktúrája, amely nagy szerepet játszik a hámok szigetelő, illetve bizonyos anyagokra szelektíven permeábilis barrier funkciójában. A szomszédos epiteliális sejteket az okkludin, a claudinok és JAM (junkcionális adhéziós molekulák) kapcsolják össze, és adapterfehérjék (ZO-1,-2,-3, szimplekin, cingulin) kötik a citoszkeleton aktin mikrofilamentum rendszeréhez. A TJ-k

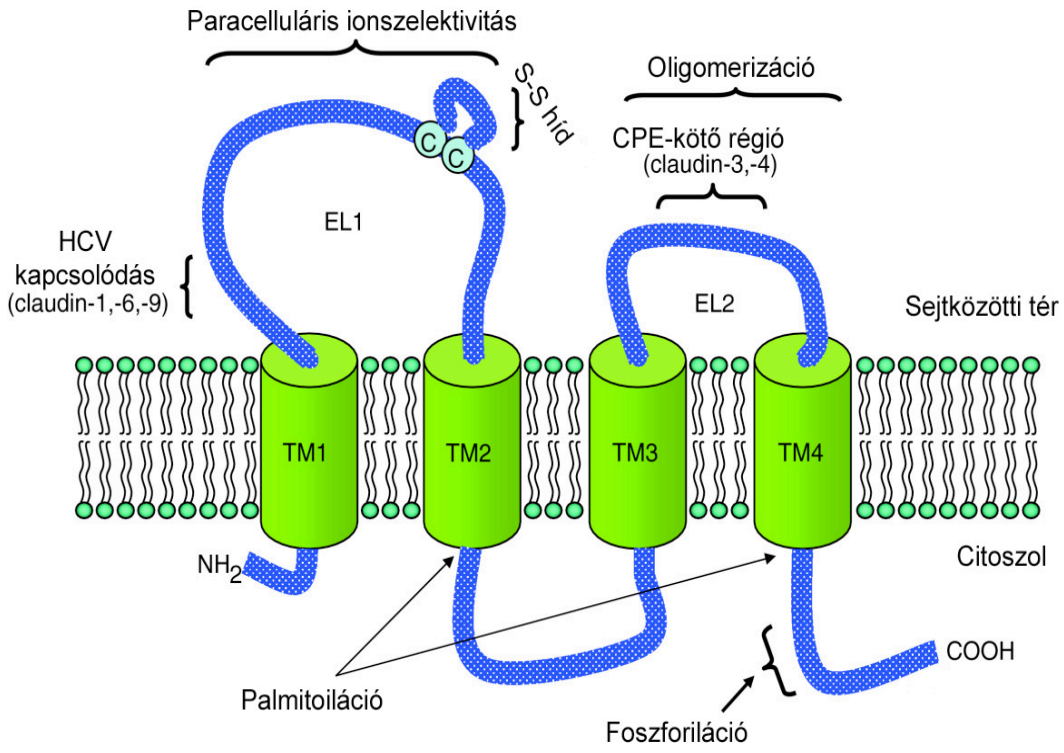
több fontos funkciója ismert: a védőfunkció biztosítja a sejt polaritását, a barrier- vagy kapufunkció szabályozza az ionok, a víz és különféle makromolekulák paracelluláris diffúzióját. Szerepet játszanak a szignáltranszdukcióban, mely révén részt vehetnek a sejtek proliferációs és differenciációs folyamataiban.[64,65]

A **lehorgonyzó kapcsolatok** a sejtmembrán speciális régiói, melyek a citoszkeleton aktin fonalainak letapadási helyéül szolgálnak. A *zonula adherens* (övdezmoszóma) egy övszerűen körbefutó struktúra a sejtek apikális részén, amely közvetlenül a zonula occludens alatt helyezkedik el; a sejt-sejt kapcsolatot ebben a szerkezetben a cadherin molekulák biztosítják. Amíg a zonula occludens elsődlegesen a paracelluláris permeabilitás gátlásáért felelős, addig a zonula adherens lokalizálja és stabilizálja a zonula occludenst. A *macula adherens* (folt-dezmoszóma) a sejtek közötti pontszerű kapcsolószerkezet, a citoplazmában a sejthártya felé itt intermedier filamentumok futnak és rögzülnek. Dezmoszómák olyan szövetekben fordulnak elő nagy számban, melyekben a sejt-sejt kapcsolatok erőteljes mechanikai hatásoknak vannak kitéve (pl. bőr stratum spinosum).[66]

A **kommunikáló kapcsolatok**, a *gap junction* (réskapcsolat) területén a két sejthártya nem tapad szorosan egymáshoz, köztük keskeny rés marad. A csatorna falát 6-6 *konnexin* fehérje molekula alkotja, melyek mindkét membránon áthaladva összekötik a két sejt citoplazmáját. Ionok és kis molekulák átjuthatnak rajta, így biztosítva a két sejt működésének összehangolását.[66]

A claudin molekulacsaládot 1998-ban fedezték fel és nevezték el; az elnevezés a latin „claudere” (bezár) szóból ered, utalva e fehérjék intercelluláris barrier szerepére.[67] Emlősökben 24 tagja ismert, emberben a 13-as claudin hiányzik. 20-27 kDa molekulasúlyú fehérjék, melyek a tight junction (TJ) típusú sejtkapcsoló struktúrák felépítésében vesznek részt, fontos szerepük van a paracelluláris permeábilitás szabályozásában és a sejt polaritásának fenntartásában epitel és endotel sejtekben.[68]

A claudinok (CLDN) négy transzmembrán doménből és két extracelluláris hurokból épülnek fel, emellett citoplazmatikus N-terminális és C-terminális végekkel rendelkeznek (**5. ábra**). A C-terminális végen lévő PDZ domén (nagymértékben konzervált, 80-90 aminosavból álló régió) citoplazmatikus fehérjékhez tud kötődni, ezáltal intracitoplazmatikus jelátvitelben vehet részt. A claudinok a PDZ doménon keresztül kötődnek más TJ fehérjékhez is.[69]



5. ábra: ***Claudinok sémás rajza*** **(**Lal-Nag és Morin nyomán).[70]

A claudinok megtalálhatóak a normál szövetekben, hám eredetű hiperpláziás folyamatokban, valamint jó- és rosszindulatú daganatokban. Az expresszióra jellemző a szerv- és szövetspecifikusság, a legtöbb szövet egyszerre többféle claudint is expresszál. Egyes claudinok eltérő szöveti mintázatot mutatnak, míg mások kizárólag egy adott sejt-, vagy szövettípusra jellemzőek.

Funkciójuk a normál hámszövet homeosztázisában jól ismert, azonban a tumorgenezisben betöltött szerepük, illetve a daganatokban megváltozott claudinexpresszió biológiai jelentősége jelenleg is intenzív kutatás tárgyát képezi.[71]

A claudin-1 alapvető fontosságú a szoros sejt-sejt kapcsolat szerkezetében.[72] Jellemzően magas rezisztenciájú hámszövetekben jelenik meg (pl. bőr).[67] Emelkedett claudin-1-expresszió mutatható ki papilláris pajzsmirigyrák és nyirokcsomó metasztázisa, illetve a nyelőcső laphámeredetű daganatai esetén.[68] A vastagbél rákmegelőző gyulladásos betegségeiben a claudin-1 (és claudin-2) fokozott expressziója észlelhető.[73] A Hepatitis C vírus sejtbe való bekerülésében is fontos szerepet játszik a claudin-1 molekula.[74]

A claudin-2 szintén bázisa a szoros sejt-sejt kapcsolatnak, a plazmamembrán mentén szakaszosan van jelen. Elsősorban a specifikusan átjárható hámszövetekben található, például a plexus choroideusban és a vese tubulusaiban.[75] Fokozott expresszióját a hámdaganatokon kívül néhány más daganatban is észlelték (pl.: melanoma malignum, nem kiérett szarkómák).[76]

A claudin-3 fehérje Clostridium perfringens enterotoxint (CPE) kötő kapacitással rendelkezik, CPE hatására a sejtek lízise következik be.[77]

A claudin-4 leginkább kevéssé áteresztő hámszövetekben mutatható ki, nyálmirigyekben a barrier kialakításában van szerepe.[78] Expressziója több humán daganatban megváltozik, fokozott expresszió jellemző az emlődaganatokra, a pancreas-, cholangiocellularis, prosztata- és ovárium-karcinomákra, és ez általában rosszabb prognózissal társul.[79,80,81,82] Szintén CPE-kötő tulajdonsággal rendelkezik, ez alapján a CLDN3-at és CLDN4-et fokozottan expresszáló tumorok esetében felmerült a Clostridium toxin targetterápiás szerként történő alkalmazása.[75,77]

A claudin-5 főként az endotélsejtek szoros kapcsolatainak formálásában vesz részt.[83] A normál erek endotéljében található meg, a vesében csupán az artériás oldalon mutatható ki.[84]A plexus choroideus, valamint a vér-agy gát epi- és endoteliális sejtjeiben is megjelenik.[85] Az éreredetű daganatok claudin-5 pozitívak.[84]

A claudin-6 embrionális szövetben található meg.[86]

A claudin-7 jelentősen expresszálódik a hámeredetű tumorok mindegyikében.[87] Csökkent az expressziója cervixcarcinomában és az uterus hámdaganataiban.[88]

A claudin-8 CPE-kötő tulajdonsággal rendelkezik, emelkedett expresszióját vesében és tüdőben írták le.[72] CPE-kötő tulajdonsága gyengébb, mint a CLDN3, vagy 4-é.[89]

A claudin-10 a kromofób vesesejtes karcinóma és vese oncocytoma elkülönítésének differenciáldiagnosztikai markere lehet.[90]

A claudinok felfedezése óta a daganatok és a megváltozott claudinexpresszió közötti összefüggést széleskörűen vizsgálják.[71] A daganatok egy részében a claudinexpresszió csökken, pl. emlőrák (claudin low altípus) és vastagbélrák esetén a claudin-1 szint[91,92], illetve fej-nyaki rákoknál a claudin-7 szint[93]. Más daganatokban ezzel ellenkezőleg a claudinexpresszió növekedését mutatták ki, mint pl. a claudin-3 és -4 szint emelkedése a petefészek, emlő-, prosztata- és hasnyálmirigyrákoknál.[71] A heterogen expresszió oka többnyire nem ismert, azonosítottak azonban növekedési faktorokat, citokineket és transzkripciós faktorokat, melyek befolyásolják azt. A tumorpromoting faktor, az EGF és a hepatocita növekedési faktor csökkentette a claudin-7 és növelte a claudin-1, -3, és -4 expressziót.[94,95]

A *karcinogenezis* során a sejtkapcsolatok átalakulhatnak, mely detektálható lehet a TJ bázisát alkotó claudinok vizsgálatával. A tumorok inváziója során a normál szöveti szerkezet felbomlik, melynek része lehet a sejtkapcsolatok átstrukturálódása, „remodelling”-je, ami a sejt-sejt kapcsolatok fellazulásával jár.[96] Ez a folyamat általában a tumorinvázióval párhuzamosan következik be, és a claudinok megváltozott expressziója kíséri.[73] Eszerint a claudinok megváltozott kifejeződésének vizsgálatával nyomon követhető lehet a daganatok kialakulása, emellett prognosztikai jelentőséget is hordozhat. A karcinogenezisben betöltött szerepe miatt a claudinok a targetspecifikus kezelés potenciális célpontjává váltak.

DOI:10.14753/SE.2015.1722

2. Célkitűzések

Hazai beteganyagon vizsgáltuk az EGF-receptor epitóp-mintázatát négy epitópspecifikus antitest segítségével, továbbá az EGFR gén lehetséges hibáit (amplifikáció, vIII-, TK domén mutáció), melyekről ismert, hogy a célzott terápia hatásosságát jelentősen befolyásolják. Ezen felül célkitűzésünk volt a HPV infekció és KRAS mutáció jelenlétének keresése a tumorokban.
További célkitűzésként fogalmaztuk meg ugyanezen daganatok és a szomszédos normál hám claudinexpressziós mintázatának vizsgálatát.

Felmerülő kérdéseink:

1. A különböző lokalizációjú fej-nyaki tumorok milyen mértékben expresszálják az EGFR fehérjét?
2. A fentebb említett és általunk vizsgált molekuláris tulajdonságok milyen összefüggésben állnak egymással, hatással vannak-e a betegek túlélésére illetve magyarázhatják-e az EGFR ellenes terápia esetleges hatástalanságát?
3. A fej-nyaki régió területén a normál és daganatos szövet claudinmintázata eltérő-e, mutat-e lokalizációs különbséget, illetve az esetleges expressziós különbségeknek van-e kapcsolatuk az általunk vizsgált klinikopatológiai paraméterekkel?
4. Az esetleges eltérő claudinmintázat összefüggést mutat-e a prognózissal?

DOI:10.14753/SE.2015.1722

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Betegek

Mintáink a Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikáján kezelt betegek műtéti anyagaiból származtak. Összesen 71 primer tumorból származó paraffinos műtéti blokkot dolgoztunk fel, melyeket a II. Sz. Patológia Intézet biztosított számunkra. A 71 mintából 19 a hypopharynx területéről, 6 a nyelvgyök, 10 a tonsilla palatina, 20 a glotticus és 16 a supraglotticus régióból származott. A tumorminták patológiai jellemzőit lásd a **4. táblázatban (36. oldal)**. A génkópiaszámot 2 mintában, valamint az érbetörés jelenlétét és a gyulladásos infiltráció mértéket 13 esetben nem tudtuk meghatározni. Ennek megfelelően a betegszám az összehasonlító vizsgálatoknál 71, 69, 58 és 56 volt (lásd 4. táblázat, 36. oldal; 5. táblázat, 43. oldal; 6. táblázat, 50. oldal).

Vizsgálataink egy részét a paraffinba ágyazott műtéti blokkokból származó 2 µm-es metszeteken végeztük el, másik részét TMA (tissue microarray) metszeteken.

3.2 Tissue microarray (TMA) blokk készítése

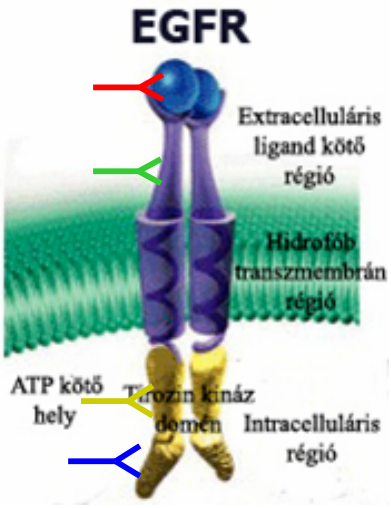
Első lépésként a korábban elkészített hematoxilin-eozinnal festett metszetek alapján minden blokkból két megfelelő, 0,6 mm átmérőjű tumoros és ép morfológiájú területet választottuk ki. A paraffinblokkból a kiválasztott szövethengert TMA Master (3D Histech, Budapest, Magyarország) segítségével távolítottuk el, és egy ehhez mért lyukakat tartalmazó másik paraffinos blokkba helyeztük át. Az így létrejött blokkokból 2 µm vastagságú metszeteket készítettünk immunhisztokémiai, illetve fluoreszcens *in situ* hibridizációs vizsgálatokhoz.

DOI:10.14753/SE.2015.1722

3.3 Az EGFR és a claudinok fehérjeszintű expressziójának vizsgálata

3.3.1 Primer antitestek

Az EGFR epitóp-mintázatának feltérképezésére négyféle antitestet használtunk. Monoklonális egér antitest ismerte fel a receptor ligandkötő régióját (IgG1, Clone E30, DakoCytomation, Glostrup, Denmark, 40x-es hígításban; **6. ábra:** piros antitest).
A második monoklonális egér antitest az extracelluláris membránközeli régióhoz kötődött (IgG2a, NCL-EGFR, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK, 40x-es hígítás; **6. ábra:** zöld antitest). Poliklonális nyúl antitest az intracelluláris C-terminális doménhez kapcsolódott (PU335-UP, BioGenex, San Remon, CA, USA, 10x-es hígításban; **6. ábra:** kék antitest), foszfospecifikus poliklonális nyúl antitest pedig a foszforilált tirozin-1086-os autofoszforilációs helyhez kötődött a tirozin-kináz (TK) doménen (44-790, Biosource International Inc, Camarillo, CA, USA, 100x-os hígítás; **6. ábra**: sárga antitest). Ez utóbbi használata során a kötődés mértékéből a tumorban jelen lévő aktív receptorok arányára következtethettünk.



6. ábra: ***Az epitópspecifikus antitestek kötődése*** *= antitest, a színek jelentése fentről lefelé: piros – ligandkötő domént jelölő antitest, zöld – EC membránközeli részt jelölő antitest, sárga – Y1086 autofoszforilációs helyet jelölő antitest a TK doménben, kék –IC domént jelölő antitest)*

Az EGFRvIII mutációt az L8A4 antitesttel mutattuk ki (monoklonális egér antitest Darrel D. Bigner szíves ajándéka jóvoltából, Department of Neurology, Duke University, Durham, NC, USA, higítás: 1:50); ez specifikusan kötődik a deléció következtében kialakult 1 és 8 exon fúziójához a receptor ligandkötő részén.

Az egyes claudinok (továbbiakban CLDN) expresszióját a következő specifikus antitestekkel vizsgáltuk: anti-CLDN 2 és 4 egér monoklonális antitestek (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) anti-CLDN 1 (Cell Marque San Francisco Rocklin, CA, USA) illetve 3, 7, 8, 10 poliklonális nyúl antiszérum antitestek (Zymed, San Francisco, CA, USA). Az elsődleges antitesteket 80-szoros hígításban használtuk.

A metszeteket a könnyebb tájékozódás érdekében hematoxilinnal utófestettük. Minden claudin esetén pozitív kontrollt alkalmaztunk. Az immunreakciót a gyártó által biztosított reagensekkel a Ventana ES automata immunfestőben hajtottuk végre (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA).

3.3.2 Immunhisztokémiai vizsgálatok

Immunhisztokémiai vizsgálatok során az EGFR, a vIII mutáció és a claudinok expresszióját térképeztük fel.

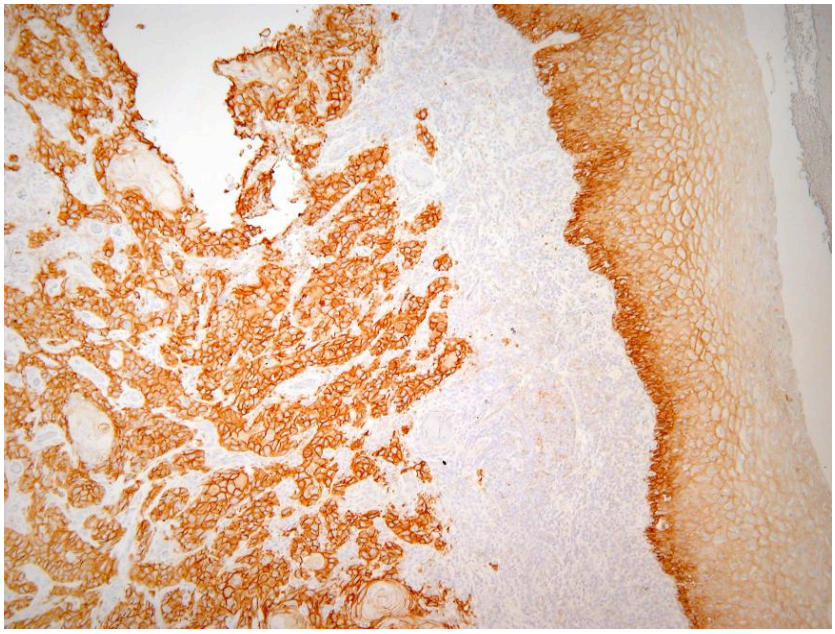
Deparaffinálás során a metszeteket először 2-szer 20 percig xilolban, majd 2-szer 15 percig alkoholban mostuk. Az endogén peroxidáz aktivitás blokkolásához 20 percen keresztül metanol és hidrogén-peroxid oldatot használtunk, majd 3-szor 5 percig desztillált vizes mosás következett. A mikrohullámú feltárást (MFX-800-3 automata mikrohullámú készülék, 750 W, Meditest, Budapest, Magyarország) 97°C-on 10+5 percig végeztük citrát pufferben (0,05 mM, pH=6, 10-szeres hígításban). Ezt követően 20 percig 3%-os BSA-val (bovine serum albumin, Sigma, St. Louis, MO) blokkoltuk a metszeteket szobahőmérsékleten, majd 3-szor 5 percig TRIS pufferben mostuk őket. Az elsődleges antitesteket az előző pontban részletesen ismertettük. Az antitestek hígítására, valamint reakcióközegként foszfát-puffert (PBS) alkalmaztunk, melyet PBS-tablettákból készítettünk el (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH). A negatív kontrollra izotípus kontrollt használtunk (Sigma). A metszeteket egy éjszakán keresztül inkubáltuk vizes kamrában 5°C-on, majd másnap 1 órán keresztül TRIS pufferben mostuk.

Másodlagos antitestként biotinnal konjugált anti-egér/ anti-nyúl IgG antitestet használtunk (Amersham, Buckinghamshire, UK, 100x-os hígításban). 10 perc inkubálás után ismét 3-szor 5 perc mosás, majd szintén 10 perces inkubálás következett a tercier antitesttel, Streptavidin HRP-vel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, 100x-os hígításban). A színreakciót 3-szor 5 perc mosás után DAB-bal (diamino-benzidin) hívtuk elő. A magfestést hematoxilinnal végeztük 10-20 másodpercen keresztül, a metszeteket glicerin-zselatin felhasználásával fedtük le, melyek ezután már kiértékelhetők voltak.

Az EGF-receptor vizsgálatához a metszeteket fénymikroszkópban 400x-os nagyításon vizsgáltuk. A festődés intenzitását egy 4 fokozatú skála segítségével értékeltük. Viszonyítási alapunk a minden metszetben megtalálható normál hám bazális rétegének festődése volt, melyet minden esteben 2+ pozitívnak vettük. Az ezzel megegyezően festődő tumorterületek szintén 2+ pozitívnak, a gyengébben festődött területek 1+ pozitívnak, míg az intenzívebben festődött részeket 3+ pozitívnak értékeltük. Ahol nem tapasztaltunk festődést, azt 0+ pozitívnak vettük. Az EGFRvIII receptor esetében a mintát akkor tekintettük pozitívnak, ha a membránban megjelent a jelintenzitás.

Minden metszeten a tumoros területen belül 6 látótérben számoltuk meg a tumorsejteket egy, az oculárban lévő 10x10-es háló segítségével. Külön-külön feljegyeztük az eltérő intenzitással festődő sejtek számát, végül a kapott értékekből becsültük meg a metszetben látható, eltérően festődő tumorsejtek daganaton belüli százalékos arányát (**7. ábra**).

DOI:10.14753/SE.2015.1722



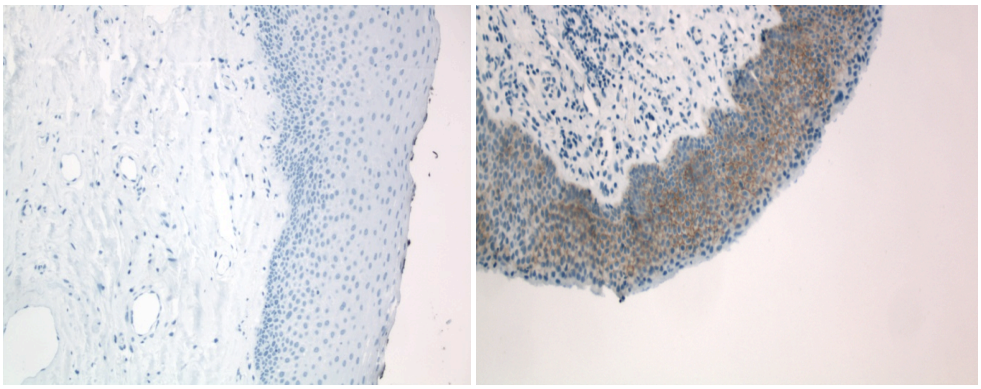
5

7. ábra: ***Az EGFR kimutatása immunhisztokémiával***

Jobb oldalon látszik a 2+ pozitívan festődő bazális sejtsorral rendelkező normál hám, bal oldalon a nagyrészt szintén 2+-en festődő tumoros terület (400x-os nagyítás)

A claudinok vizsgálatakor két tényezőt vettünk figyelembe az értékelésnél: a sejtek %-os festődését és intenzitását, illetve a lokalizációt. Az intenzitást tekintve 0-negatív, 1-gyenge, 2-közepes és 3-erős immunhisztokémiai reakciót határoztunk meg (**8. ábra**)[97]. Ezekből az értékekből képeztük az úgynevezett H-score-t, amely a hám százalékos festődésével és az intenzitás szorzatával arányos[98]. A statisztikai kiértékelések során a medián érték alapján választottuk szét a mintákat: az adott claudint erősen, illetve gyengén expresszáló csoportokra.

DOI:10.14753/SE.2015.1722



0+; 0% 3+; 80%

8. ábra: ***H-score számítás bemutatása: CLDN3 és CLDN1 expressziója normál hámban.***

H-score = hám százalékos festődése (0-100) x intenzitás (0-3+) (400x-os nagyítás)

3.4 Az EGFR génszintű vizsgálata fluoreszcens in situ hibridizációval

5 µm vastag metszeteket készítettünk a TMA blokkokból, melyeket egy éjszakán keresztül 56°C-on inkubáltunk. A deparaffinálást xilollal végeztük 2x10 percen keresztül, majd a metszeteket csökkenő koncentrációjú etanol sorozattal rehidráltuk. Ezt mikohullámú előkezelés követte Vector Antigen Unmasking oldatban (H-3300; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), először 800 W-on 3 percig, majd 160 W-on további 20 percig, majd a metszeteket pepszinnel (0,025%, P7012, Sigma) és sósavval (0,2 M) emésztettük 37°C-on 15 percig. Az emésztést egyperces desztillált vizes és kétszer 5 perces SSC mosással függesztettük fel. A dehidráció növekvő koncentrációjú etanol sorozattal történt.

10 µl ON EGFR, Her-1 (7p11) / SE 7, dual-color FISH próbát (KBI-10702, Kreatech Biotechnology B.V., Amsterdam, Hollandia) tettünk a metszetekre, melyeket üveglemezzel fedtünk. A minta és a DNS próba denaturációja 80°C-on történt 5 percig, majd a hibridizáció egy éjszakán át 37°C-on. Hibridizáció után a mintát 0,4x SSC / 0.3% Igepallal mostuk 2 percig szobahőmérsékleten és 0,4x SSC / 0.3% Igepallal 70°C-on újabb 2 percig. Dehidráció után a magokat megfestettük 4'6-diamidino-2-fenilindollal Vectashield mounting médiumban (1,5 µg/ml, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

A kész metszeteket fluoreszcens mikroszkóppal (Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) vizsgáltuk. Az EGFR génkópiaszámot és a 7-es kromoszómaszámot mintánként 40 sejtben számoltuk meg. Amennyiben a kromoszómaszám a sejtek több mint 25%-ban emelkedett volt, úgy a mintát poli- vagy triszómiásnak értékeltük.

3.5 Molekuláris biológiai vizsgálatok

3.5.1 Tirozin-kináz domén mutáció vizsgálata

A DNS-t a klinikai minták paraffinos blokkjaiból származó metszetekből izoláltuk. A mintákat először deparaffináltuk, majd ezt proteináz-K emésztés követte egy éjszakán át, melynek végén az enzimet hőinaktiváltuk, a felülúszót pedig centrifugálással választottuk el. Az EGFR TK mutációk azonosításához a következő sejtvonalakat használtuk kontrollként: H358 bronchoalveoláris carcinoma, mely vadtípusú EGFR-t tartalmaz, HCC-827 epiteliális adenocarcinoma, mely a 19 exonban deléciót hordoz, H1975 humán tüdő adenocarcinoma pontmutációval a 21 exonban. A vizsgálat során a Roche Lightcycler ® 480 Real Time PCR High Resolution Melting kitjét használtuk, 20 µl reakcióelegyben 10 µl mastermixet, 0,5-0,5 µl 10 µM forward- és reverse-primert, 2,5 µl gyártó által mellékelt 25 mM koncentrációjú kit $MgCl_2$-t és 25 ng DNS templátot adva.

A mutációs státusz meghatározásához a következő primereket használtuk 19HR01F CTGGATCCCAGAAGGTGAGA; 19HR01R GATTTCCTTGTTGGCTTTCG; 21HR01F AGCCAGGAACGTACTGGTGA; 21HR01R TGCCTCCTTCTGCATGGTAT.

A PCR protokoll a következő volt: 95°C 5 percig, 50 ciklus 95°C-on 15 másodpercig, 61°C>53°C (minden ciklusban 0,6°C-kal csökkentve a hőmérsékletet) 20 másodpercig, 72°C 15 másodpercig, HRM analízis: 95°C 1 percig, 45°C 1 percig, 61°C >53°C 25 másodpercig, végül 30°C 30 másodpercig.

3.5.2 HPV infekció kimutatása PCR technikával

A DNS izoláláshoz 4-5 darab 10 µm vastag metszetet tettünk minden tumormintából 2 ml-es Eppendorf csövekbe. A paraffint xilol-etil-alkoholos mosással távolítottuk el a mintákból. A levegőn szárított mintákat egy éjszakán át emésztettük 1 mg/ml Proteinase K-val Tris-EDTA oldatban (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=8,0). Magas fordulatszámú centrifugálás után a DNS-mintát tartalmazó folyadékfázist eltávolítottuk, majd minden mintát minimum kétszer megmértünk. Az izolált DNS integritását béta-globin gén amplifikálásával ellenőriztük (primerek: GH20, PCO4). A HPV tipizálást nested PCR-rel végeztük.[99] Az első körben az outer primerek a három leggyakoribb magas kockázatú HPV típus (16, 18, 33) közös E6 ORF szekvenciájához kötődtek. Az első amplifikálás eredményeként kapott mintából egy mikrolitert használtunk a második, 16-, 18-, vagy 33- specifikus PCR reakcióban templátként (**3. táblázat**). Az amplifikációt REDTaq ReadyMix-el (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) végeztük PCR Express thermal cycler-ben (Hybaid Ltd.-Thermo Electron Co.) 25 µl térfogatban. A keverék a következőket tartalmazta: 12,5 µl 2X ReadyMix, 20 pmol a primerekből és 1 µl templát. Az amplikonokat 0,5 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó 2%-os agaróz gélben (Pharmacia, Uppsala, Svédország) futtattuk meg (5 V/cm, 90 mA) Tris-acetát-EDTA pufferben (TAE, pH 7,5). A PCR termékeket Kodak Image Station 4000MM gel-documentation rendszerrel vizualizáltuk és dokumentáltuk (Carestream Health Inc., Rochester, NY, USA)

DOI:10.14753/SE.2015.1722

Primerek	Orinetáció	Szekvencia (5'-3')	Lokalizáció	Termék
Beta-Globin				
GH20	forward	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	72-91	267 bp
PCO4	reverse	CAACTTCATCCACGTTCACC	310-339	
HPV				
Outer	forward	ACCGAAAACGGTTGAACCGAAAAC GGT	35-61	307 bp
	reverse	AATAATGTCTATATTCACTAATT	319-341	
HPV 16-spec.	forward	ATGTTTCAGGACCCACAGGA	104-123	124 bp
	reverse	CCTCACGTCGCAGTAACTGT	208-227	
HPV 18-spec.	forward	ATGGCGCGCTTTGAGGATCC	106-125	188 bp
	reverse	GCATGCGGTATACTGTCTCT	274-293	
HPV 33-spec.	forward	GCAGTAAGGTACTGCACCAC	88-107	145 bp
	reverse	CCTCAGATCGTTGCAAAGGT	213-232	
MY11	forward	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	6582-6601	452 bp
MY09	reverse	CGTCCMARRGGAWACTGATC	7014-7033	
GP5+	forward	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	6624-6646	142 bp
GP6+	reverse	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	6741-6765	

3. táblázat: ***Összefoglalás - az egyes amplikonok méretei, lokalizációja, valamint a használt primerek szekvenciái***

3.5.3 KRAS mutáció kimutatása

A KRAS gén 12. kodon mutációinak meghatározása céljából a restrikciós fragmenshossz analízist (RFLP) alkalmaztuk. A genomiális DNS kinyerését paraffinba ágyazott tumorszövetből QIAamp DNA FFPE Tissue Kittel (Qiagen, Hilden, Németország) végeztük. A PCR reakció AmpliTaqGold PCR Master Mix (Applied Biosystems, Branchburg, NJ) és olyan primerek alkalmazásával történt, melyek BstnI

restrikciós enzimhasítóhelyet eredményeznek a vad típusú allél amplifikációja során. A primerek bázissorrendje a következő volt: forward 5-GAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3 és reverse 5-GGTCCTGCACCAGTAATATG-3. A PCR lépései: 95°C 10 percen keresztül, majd 38 ciklus (95°C 1 percig, 55°C 1 percig, 72°C 2 percig) és végül 72°C 4 percen át. A kapott termékeket ezután BstnI (New England Biolabs, Beverly, MA) enzimmel emésztettük 60°C-on 4 órán keresztül. A restrikciós enzim csak a vad típusú allélt hasítja, a mutánst nem, ezáltal a 12. kodon mutációt tartalmazó termékek az emésztés után teljes hosszúságúak maradnak. A DNS fragmenteket agaróz gélelektroforézis alkalmazásával etídium-bromidos festéssel tettük láthatóvá. A mutáns allélt is tartalmazó mintákban a mutáns-vad arányt Experion Automated Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) segítségével kvantifikáltuk. A mutáció pontos meghatározását direkt szekvenálással végeztük Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével.

3.6 Statisztika

A morfometrikus vizsgálatokból származó adatok összehasonlítására kétmintás Student-féle t-tesztet végeztünk. Több mint két csoport összehasonlításánál, amikor paraméteres teszt alkalmazható volt ANOVA tesztet végeztünk *post hoc* Scheffé-teszttel kiegészítve. A kategorikus adatok elemzését Khi-négyzet próba segítségével végeztük el. A párosított numerikus változókat (normálhám és laphámrák) Wilcoxon-teszttel elemeztük, a nem párosított numerikus változókat Kruskal-Wallis-teszttel és *post hoc* elemzéssel hasonlítottuk össze. A korrelációs együtthatót Spearman-féle rangkorreláció segítségével határoztuk meg. A túlélések összehasonlítására Kaplan-Meier módszert alkalmaztunk. Teljes túlélésnek a diagnózis kezdete és az elhalálozás közötti, illetve inkomplett eseménynél az utánkövetési időt számítjuk. A különböző csoportok túlélése közötti különbséget a long-rank statisztika mutatta meg. A többváltozós értékek, mint prognosztikai tényezők meghatározására Cox-féle regressziós modellt alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikáns különbségnek azokat az eseteket tüntettük fel, amelyek esetén $p<0,05$. A statisztikai analízishez a Statistica 9.0 szoftvert használtuk. (StatSoft, Tulsa, OK).

DOI:10.14753/SE.2015.1722

4. EREDMÉNYEK

4.1 A beteganyag jellemzése, hisztopatológiai paraméterek összefüggése a prognózissal

A vizsgált beteganyag jól reprezentálja a magyarországi fej-nyaki daganatos populációt. A betegek átlagéletkorára, nemére, dohányzási és alkoholfogyasztási szokásaira, valamint hisztopatológiai jellemzőire vonatkozó adatokat a **4. táblázatban** mutatjuk be. Mivel a betegek a diagnózis felállításakor szinte kivétel nélkül dohányoztak, ezért a dohányzásra vonatkozóan statisztikai elemzéseket nem lehetett elvégezni. Az átlagéletkor 53,7 év, az átlagos túlélés pedig 40,4 hónap volt. A minták többsége grade II-es volt, és a tumorgrade jól korrelált a túléléssel (**9. ábra**).

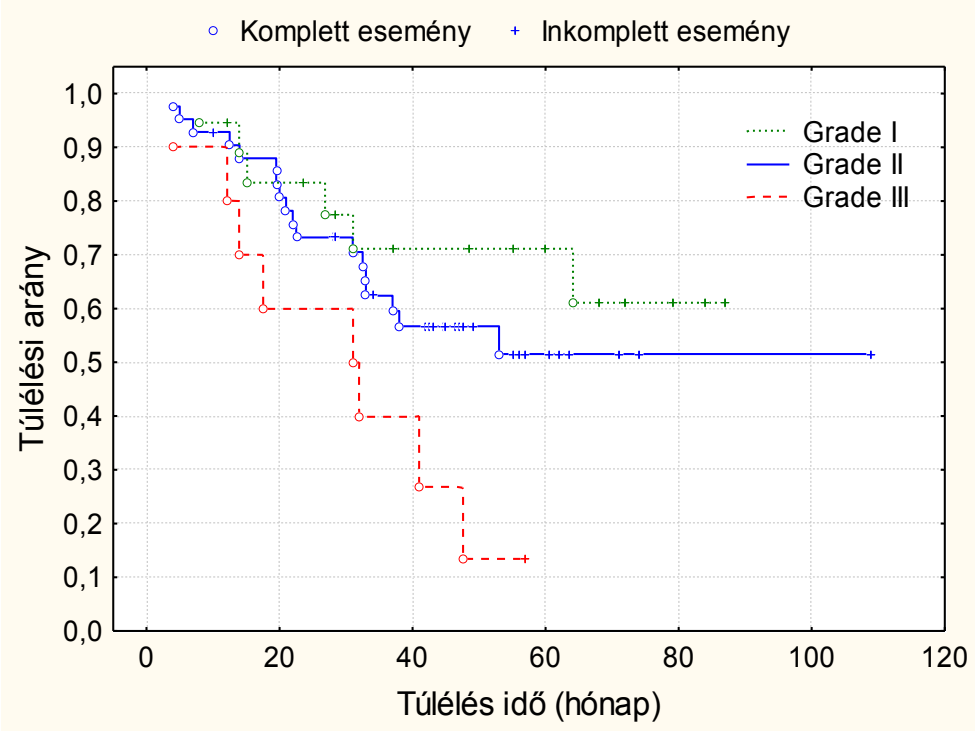
Érbetörést a tumorok szövettani vizsgálata során 32 esetben találtunk, közepes illetve kifejezett mértékű gyulladásos infiltráció 62 mintában volt jelen (a gyulladásos infiltráció mértékénél a patológiai leletet vettük alapul). Kaplan-Meier analízis során az érbetörés és a gyulladásos infiltráció közepes és kifejezett jelenléte rosszabb prognózissal társult (**10. és 11. ábra**).

DOI:10.14753/SE.2015.1722

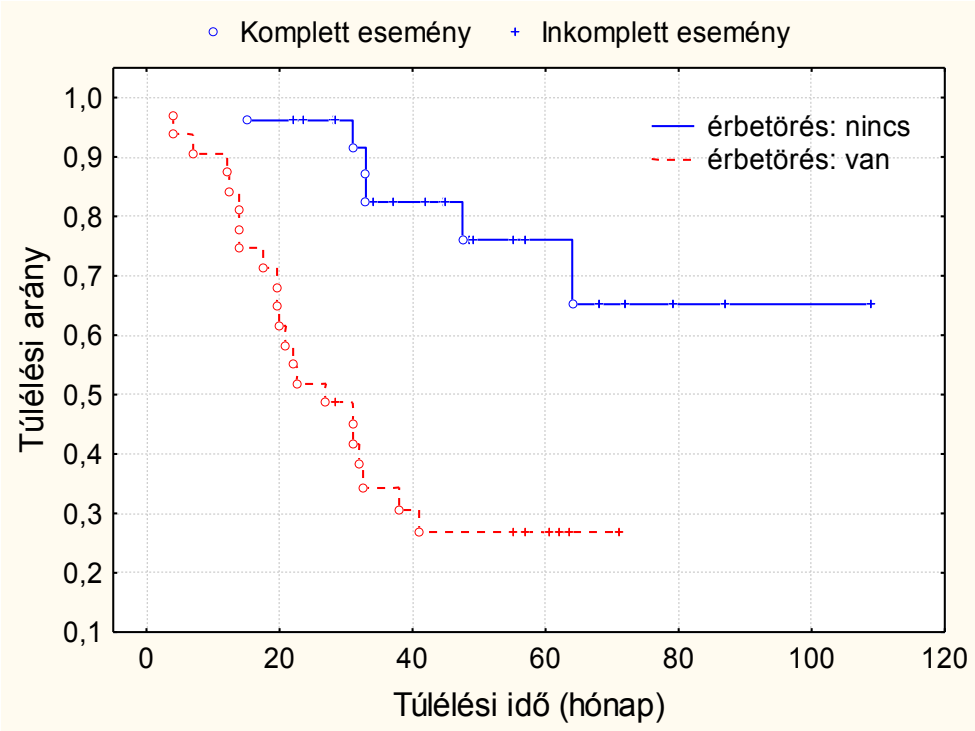
Változó	n
Nem:	
férfi	58
nő	13
Kor (diagnózis felállításakor):	
< 54	37
≥ 54	34
Lokalizáció:	
tonsilla palatina	10
nyelvgyök	6
glotticus	20
supraglotticus	16
hypopharynx	19
Alkoholfogyasztás:	
erős	27
mérsékelt	13
soha/alkalmanként	29
korábban fogyasztott alkoholt	2
Dohányzás:	
igen/erős	67
nem/alkalmanként	2
dohányzott	2
Stage:	
I.	8
II.	32
III.	19
IV.	10
ismeretlen	2
Grade:	
I.	19
II.	42
III.	10
Nyirokcsomó státusz:	
N0	30
N1	29
Nx	12
Érbetörés:	
van	32
nincs	26
Gyulladásos infiltráció:	
nincs/enyhe	17
közepes/kifejezett	41

4. táblázat: ***A vizsgált betegpopulációra vonatkozó adatok***

DOI:10.14753/SE.2015.1722

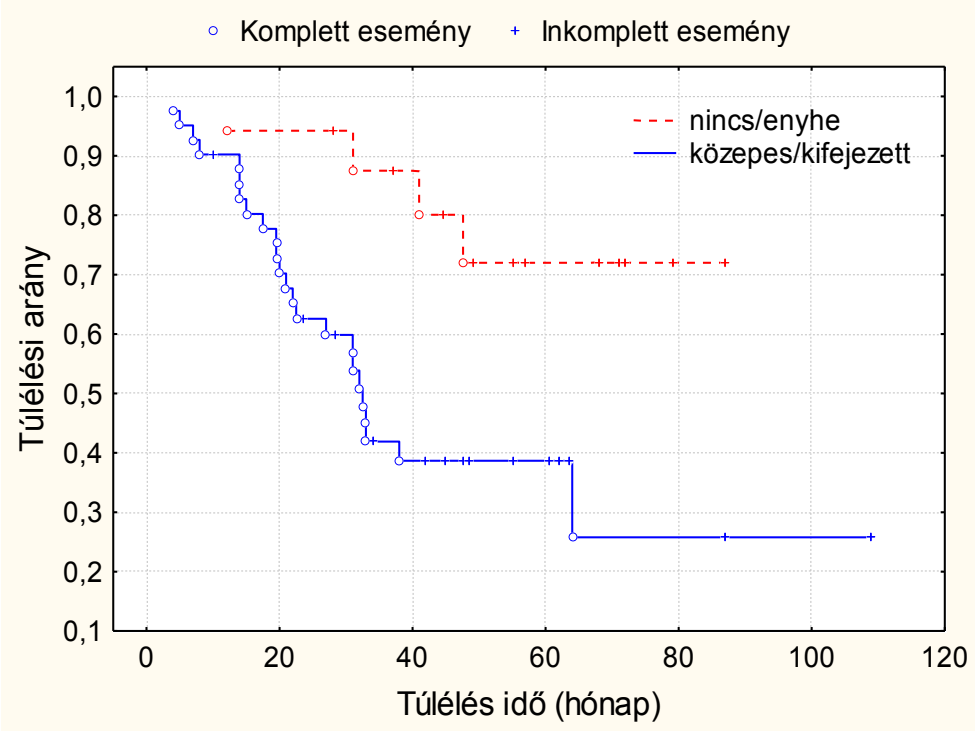


9. ábra: ***Tumorgrade és túlélés összefüggése Kaplan-Meier diagramon ábrázolva***
A tumorok differenciáltsági foka jól korrelált a túléléssel (p=0,042)



10. ábra: ***Érbetörés és túlélés összefüggése Kaplan-Meier diagramon ábrázolva***
Az érbetörés jelenléte szignifikánsan rosszabb túléléssel társult (p<0,0001)

DOI:10.14753/SE.2015.1722



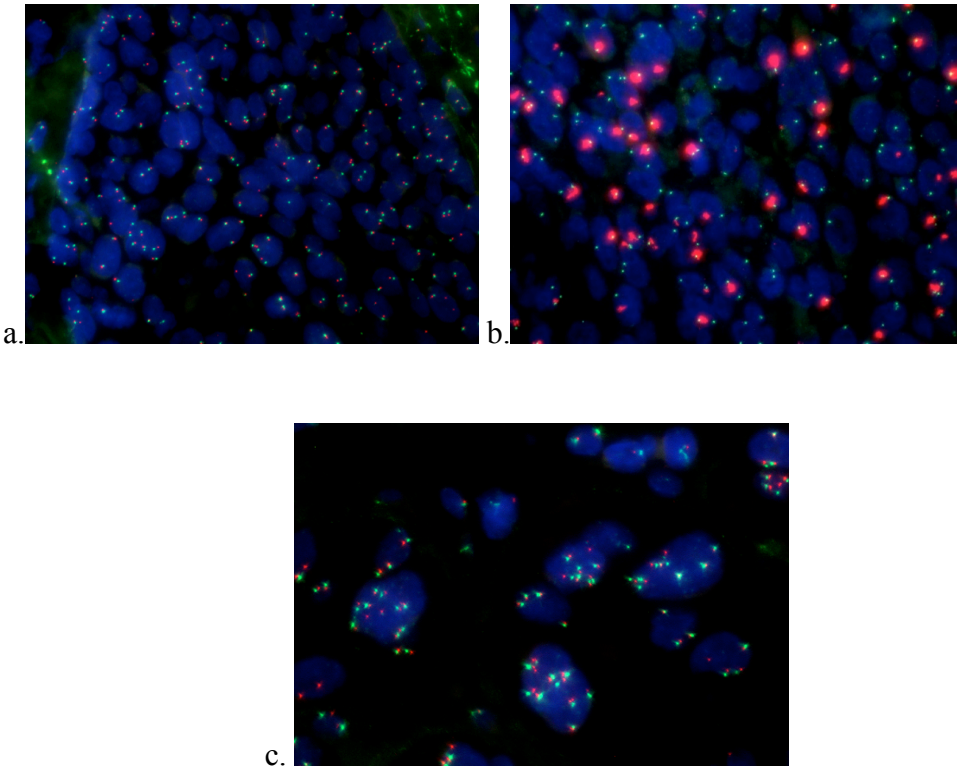
11. ábra: ***Gyulladásos infiltráció és a túlélés összefüggése Kaplan-Meier diagramon ábrázolva***

A gyulladásos beszűrődés közepes és kifejezett jelenléte a tumorban szignifikánsan rosszabb túléléssel társult (p<0,005)

DOI:10.14753/SE.2015.1722

4.2 EGFR génamplifikáció és emelkedett kópiaszám meghatározása

Az EGF-receptor génszámára vonatkozó vizsgálatokat FISH technikával végeztük. 71 primer tumor közül 8 mintában, vagyis az esetek 11,6%-ában találtunk génamplifikációt (**12./a-b ábra**). Leggyakrabban a hypopharyngeális régióban fordult elő génamplifikáció (19 mintából 6-ban), míg a glotticus és supraglotticus lokalizáció mintája összesen 1-1 esetben bizonyult amplifikáltnak. Tonsilla és nyelvgyöki tumorokban normális kópiaszámot találtunk.



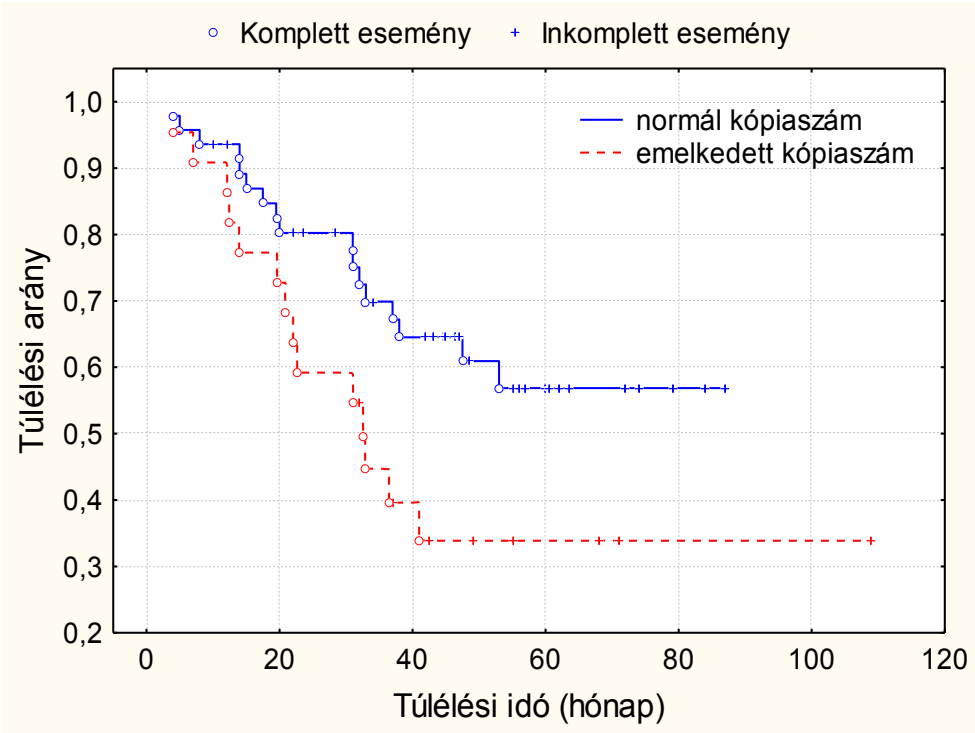
12. ábra: ***EGFR génkópiaszám vizsgálata fluoreszcens in situ hibridizációval***

A centromert zöld színnel, az EGFR gént pirossal jelöltük

*normál kópiaszám(**a**), EGFR génamplifikáció(**b**), poliszómia a sejtek többségében(**c**)*

Poliszómiát 6 betegnél (8,7%, ezen minták többsége 4 centromert tartalmazott), míg triszómiát 17 esetben (24,6%) állapítottunk meg (**12./c ábra**). Összesen tehát a minták 45%-ában volt emelkedett EGFR génkópiaszám. Statisztikai elemzések során összehasonlítottuk az emelkedett kópiaszámmal (amplifikáció + poliszómia) rendelkező

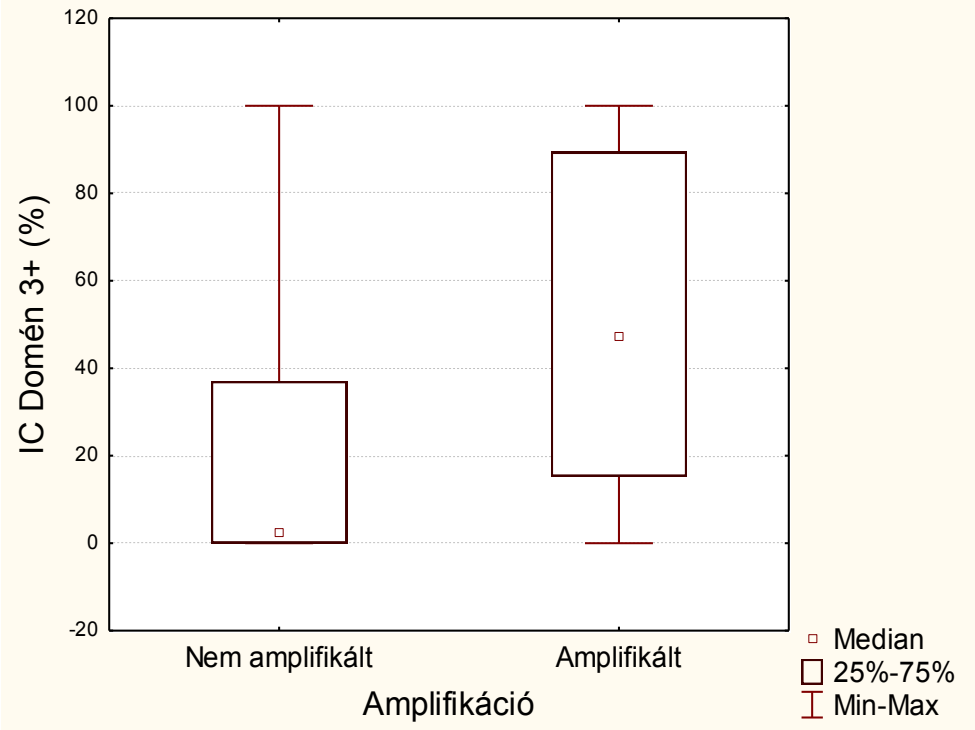
betegek túlélését a normál kópiaszámú betegekével és azt tapasztaltuk, hogy az emelkedett kópiaszám szignifikánsan rosszabb túléléssel társult (**13. ábra**).



13. ábra: ***EGFR kópiaszám és túlélés összefüggése Kaplan-Meier diagramon ábrázolva***

Az emelkedett kópiaszám szignifikánsan (p=0,041) rosszabb túléléssel társult

Az EGFR génamplifikáció és poliszómia erős korrelációt mutatott a proteinexpresszióval: az emelkedett kópiaszámot mutató tumorokban a 3+ erősséggel festődött sejtek aránya szignifikánsan magasabb volt az intracelluláris domént jelölő antitest használatával (**14. ábra**). Ez utóbbi összefüggés nem igazolódott az extracelluláris domént kötő antitestek esetében.



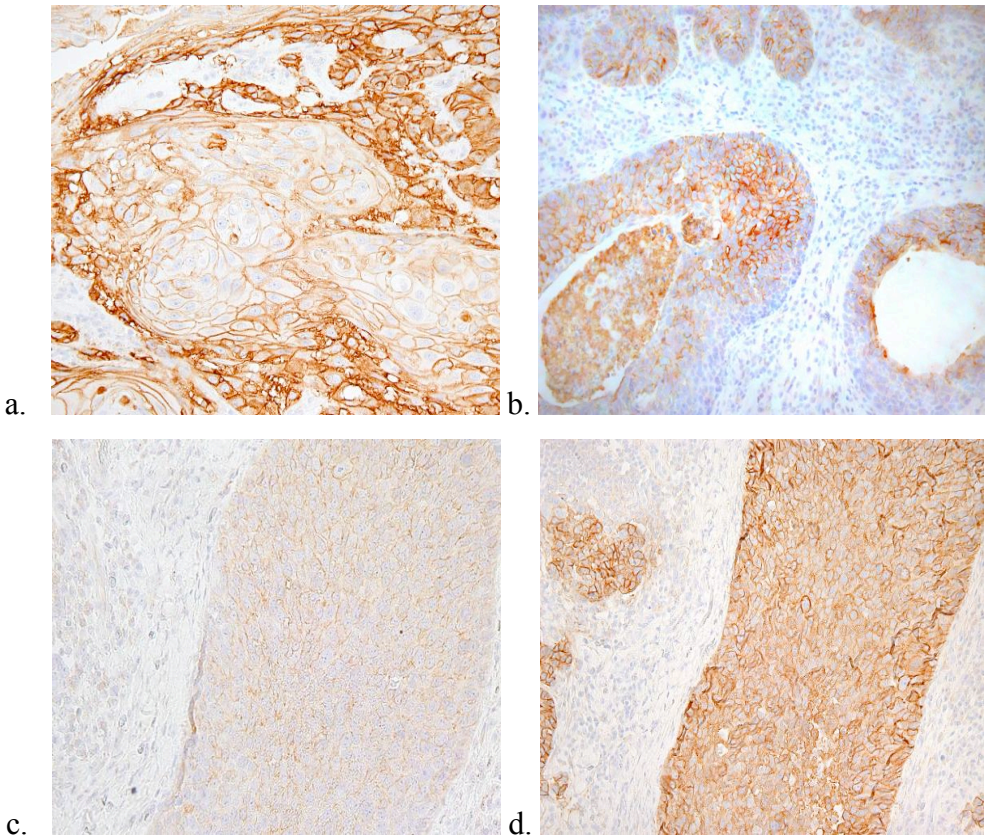
14. ábra: ***Amplifikáció és proteinexpresszió közötti összefüggés.***

Az EGFR génamplifikáció magasabb proteinexpresszióval társult (p=0,02).

DOI:10.14753/SE.2015.1722

4.3 EGFR proteinexpresszió

Az EGFR fehérje expressziója és aktivitása a különböző lokalizációjú tumorokban különbségeket mutatott, illetve a receptor különböző epitópjainak festődése is eltérő intenzitású volt. Ezen kívül egy tumoron belül is nagyfokú heterogenitást tapasztaltunk (**15./a-d ábra**, **5. táblázat**).



15. ábra: ***Immunhisztokémia az EGFR expressziójának feltérképezésére***

*Fészkes elhelyezkedésű és eltérő intenzitással festődő tumorsejtek (**a**), heterogén festődés (**b**), ugyanazon tumorterület a foszforilált TK domént (**c**) és az extracelluláris membánközeli régiót (**d**) jelölő antitesttel festve (400x-os nagyítás)*

	Nyelvgyök n=6	Tonsilla n=10	Supraglotticus n=16	Glotticus n=20	Hypopharynx n=19
EC ligandkötő domén					
alacsony	26,9±23,2	31,8±26,8	23,5±31,9	38,7±29,9	33±39,3
normál	39,7±19,7	59,2±18,6	48,7±25,6	51,5±15,3	41,5±22,6
magas	33,4±33,7	9±15,7	27,9±29,7	9,8±16,4	25,5±31,2
EC membránközeli domén					
alacsony	17,7±25,2	28±50,5	41,7±46,3	46,1±37	30,5±43,2
normál	59,7±28,6	70,5±33,5	44,3±27,8	43,6±18,4	50,5±30
magas	22,6±30,5	1,5±4,6	14±16,8	10,3±10,4	19±36,4
Intracelluláris domén					
alacsony	25,51±38	37,5±36,4	33,2±19,3	46,5±42,1	35,8±38,2
normál	49,3±27,2	52,1±23,6	61,4±18,7	45,1±20,6	50±23,2
magas	25,16±24,9	10,4±17,1	5,4±9,4	8,35±22,2	14,2±17,9
Foszfo-EGFR (Y-1086)					
aktív	3*	4*	8*	5*	6*
inaktív	3*	6*	8*	15*	13 *

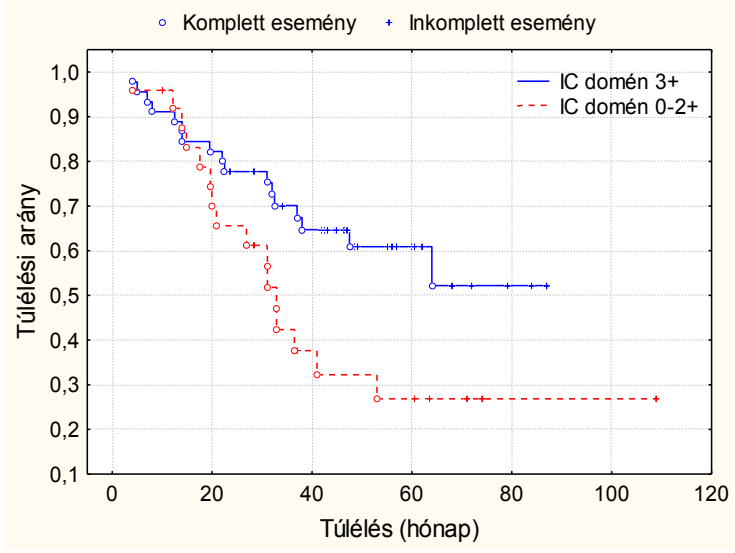
5. táblázat: ***Az EGFR expresszió mértéke (%) lokalizációk szerint 4 epitóp-specifikus antitesttel***

Az első három antitest esetén alacsony (0 és 1+) normál (2+) és magas (3+) intenzitású festődést különböztettünk meg. Az értékeket a sejtek százalékos eloszlása szerint adtuk meg (normál ± SD). A foszfo-EGFR-specifikus antitest használatakor akkor értékeltük aktívnak a mintát, ha a sejtek több mint 25%-a festődött.

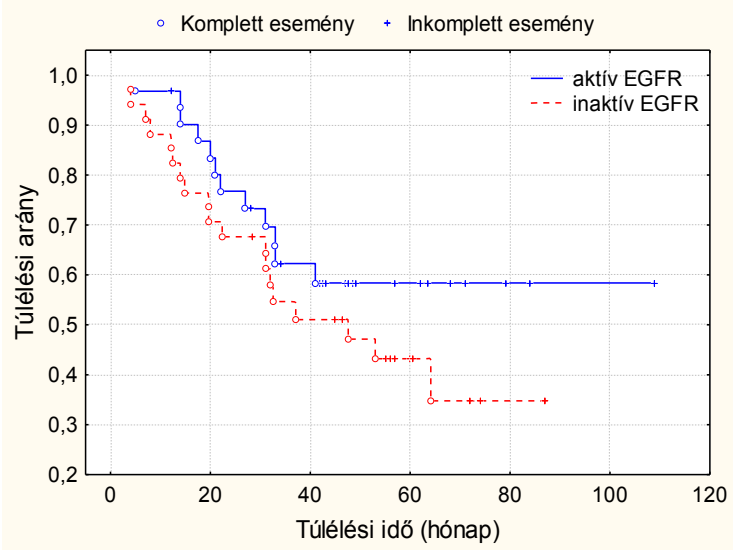
**: Az értékeket esetszámban adtuk meg.*

A proteinexpresszió mértéke és a túlélés közötti összefüggést Kaplan-Meier analízis segítségével értékeltük. Ennek során azt találtuk, hogy az intracelluláris domént felismerő antitestet használva a 3+ erősségű proteinexpresszió szignifikánsan rosszabb túléléssel társult (**16./a ábra**). A többi antitest esetében szignifikáns összefüggést nem találtunk, azonban azoknak a betegeknek, akiknek a tumorában az EGF-receptor emelkedett aktivitást mutatott (foszfo-EGFR specifikus antitesttel vizsgálva az aktivitást), jobb volt a túlélése. Ez az eredmény azonban a statisztikai szignifikancia szintjét nem érte el (**16./b ábra**).

DOI:10.14753/SE.2015.1722



a.



b.

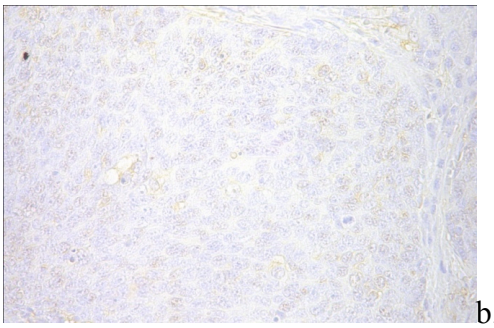
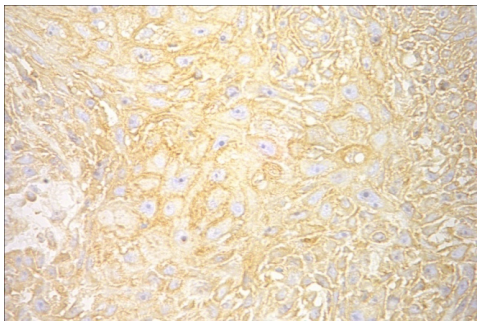
16. ábra: ***Proteinexpresszió és túlélés összefüggése Kaplan-Meier analízissel***

*Az intracelluláris domént (IC domén) 3+ mértékben expresszáló tumorok szignifikánsan rosszabb prognózist mutattak (p<0,05) (**a**). Érdekes, hogy a magas EGFR aktiváció jobb túléléssel társult, bár ez statisztikailag nem volt szignifikáns (**b**).*

DOI:10.14753/SE.2015.1722

4.4 EGFRvIII expresszió

A vIII mutáció gyakoriságát immunhisztokémiai vizsgálatok során az L8A4 monoklonális antitesttel határoztuk meg a mintáinkból készült TMA metszeteken (**17. ábra**). 71 mintából 15 bizonyult pozitívnak (21%), melyek többsége (8/15) a laryngealis régióban fordult elő, azonban tonsilláris és hypopharingeális daganatokban szintén találtunk vIII mutációt.

a.  b. 

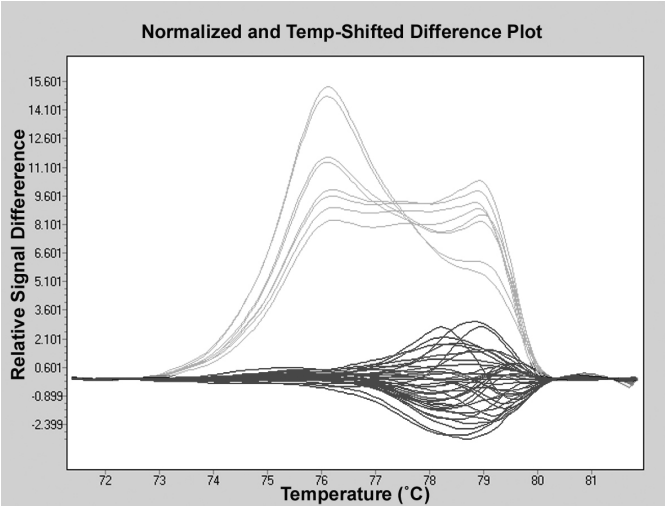
17. ábra: ***EGFR vIII kimutatása immunhisztokémiával***

*A bal oldali képen egy negatív (**a**), a jobb oldali képen egy vIII mutáns (**b**) tumorminta látható (400x-os nagyítás)*

DOI:10.14753/SE.2015.1722

4.5 TK domén mutáció

Az EGFR tirozin-kináz domén 19-es és 21-es exonjában előforduló mutációt HRM (high resolution melting) technikával vizsgáltuk. Pozitív kontrollként a 19-es exonban deléciós mutációt hordozó HCC827 epiteliális adenocarcinomát és a 21-es exonban pontmutációt hordozó H1975 tüdő adenocarcinomát használtuk. Negatív kontrollként a H358 bronchoalveoláris carcinoma szolgált, mely vad típusú TK domént expresszál. Az általunk vizsgált anyagban egyetlen mutáns mintát sem találtunk. (**18. ábra**)



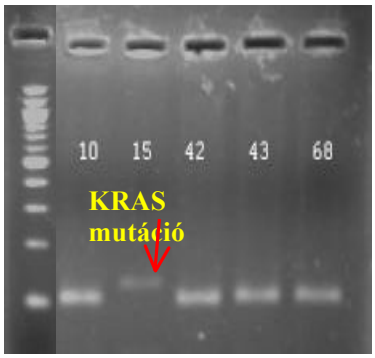
18. ábra: ***TK domén mutáció kimutatása HRM módszerrel***

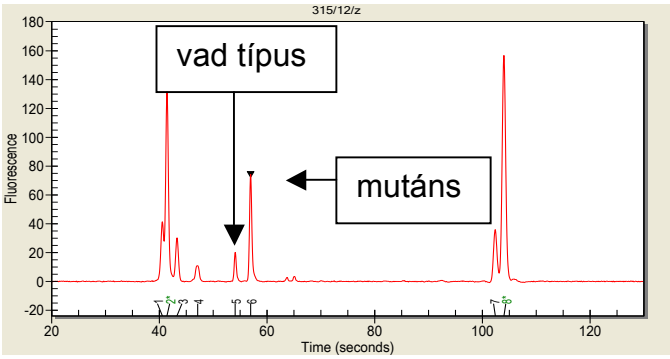
Az ismert TK domén mutációt hordozó sejtek hisztogramjait a szürke vonal ábrázolja, míg a fekete vonal a vad típusú mintákat. Egyik mintában sem volt kimutatható mutáció.

DOI:10.14753/SE.2015.1722

4.6 KRAS mutáció

Az anti-EGFR terápia sikeressége nagymértékben függ a KRAS státusztól, ezért mintáinkban megvizsgáltuk a mutáció jelenlétét a fehérje 12-es kodonjában. RFLP analízis során a tumorokból származó DNS mintákat BstnI restrikciós enzimmel kezeltük, mely a gén vad típusát emészti, mutáns változatát azonban nem. A 71 mintából összesen 2 daganatban találtunk KRAS mutációt (2,8%). (**19. ábra**)

a. 

b. 

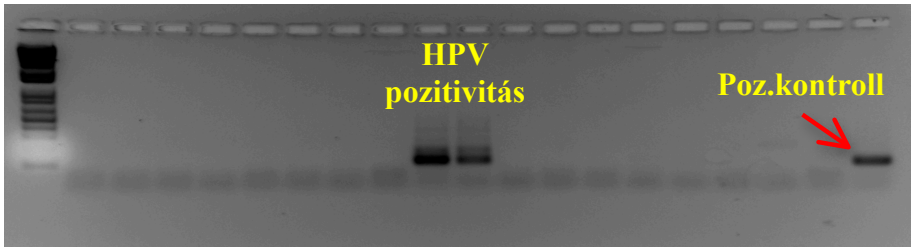
19. ábra: *KRAS mutáció*

*(**a**) A gélkép első oszlopában a DNS létra, a harmadik oszlopban (15. minta) egy KRAS mutáns minta látható. A többi oszlopban vad típusú KRAS-t expresszáló tumor van. (**b**) a mutáns mintában a vad típusú allél majdnem teljesen eltűnt.*

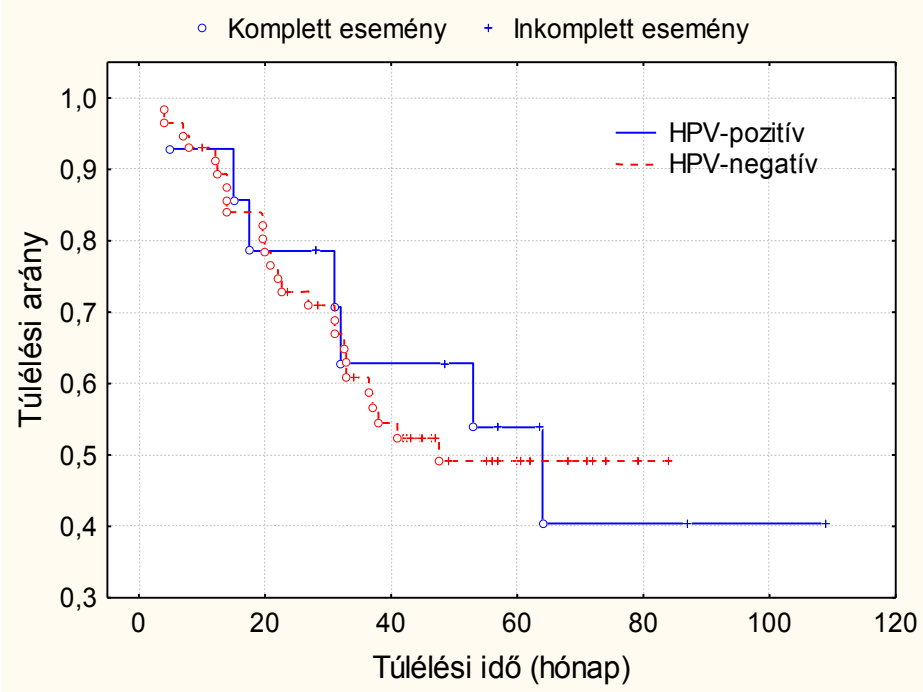
DOI:10.14753/SE.2015.1722

4.7 HPV infekció

Integrált HPV jelenlétét 71 mintából 14 esetben tudtunk kimutatni (19,7%, **20. ábra**). 5 tumorban HPV 16, 6 tumorban HPV 18 és 3 daganatban HPV 33 infekciót találtunk. A lokalizációt tekintve a pozitív minták 33%-a a nyelvgyökből, 30%-a a tonsillából, 19%-a a supraglotticus régióból, 20%-a a glottisból, míg 5%-a a hypopharynxból származott. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a fertőzöttség incidenciája a szájüreg felől a gége felé haladva csökkenő tendenciát mutat. A korábbi irodalmi adatokkal ellentétben az általunk vizsgált populációban a HPV pozitivitás nem társult jobb túléléssel (**21. ábra**).



20. ábra: ***PCR gélkép, melyen két, integrált HPV-t tartalmazó minta látható***



21. ábra: ***Kaplan-Meier analízis során a HPV pozitív tumorok nem társultak jobb túléléssel***

DOI:10.14753/SE.2015.1722

4.8 Az EGFR hibái, a hisztológiai jellemzők és a HPV infekció együttes statisztikai kiértékelése

Az általunk vizsgált biológiai sajátosságokat különböző statisztikai elemzésekkel egymással is összehasonlítottuk. Az eredményeket a **6.** és a **7. táblázat** foglalja össze. Megállapítottuk, hogy az összes vIII mutáns esetben emelkedett génkópiaszám volt jelen, míg vad EGFR-t kifejező tumoroknál az emelkedett kópiaszám csak 30%-ban fordult elő ($p<0,0001$). Az EGFR aktiváció mértéke és a HPV infekció nem állt összefüggésben a vIII mutáns receptor jelenlétével.

Statisztikailag semmilyen összefüggést nem sikerült kimutatni a HPV infekció és a vIII mutáció, illetve az EGFR aktivitás között, továbbá érdekes megfigyelésünk volt, hogy a HPV-pozitív daganatokban egy esetben sem fordult elő génamplifikáció.

A hisztológiai paraméterek esetében pozitív korreláció mutatkozott az érbetörés jelenléte és az emelkedett génkópiaszám között. Ebből arra lehet következtetni, hogy a megnövekedett EGFR kópiaszám esetén fokozottabb az érbetörés esélye.

Multivariációs Cox-regressziós modell segítségével kimutattuk, hogy a vizsgált fej-nyaki tumorok esetén a klasszikus klinikopatológia faktorok közül a gyulladásos infiltráció és az érbetörés rendelkezik prognosztikai jelentőséggel. Emellett az EGFR-aktivitás és a vIII ugyan statisztikailag nem szignifikáns mértékben, de tendenciózusan úgy tűnik, hogy befolyásolta a halálozási kockázatot - ez utóbbi összefüggés vélhetően kijönne nagyobb mintaszám használata mellett.

DOI:10.14753/SE.2015.1722

	Normál génkópiaszám	Emelkedett génkópiaszám	P-érték
vIII negatív vIII pozitív	38 0	16 15	**0,0001**
HPV negatív HPV pozitív	29 9	28 3	0,13
Érbetörés nincs Érbetörés van	17 12	7 20	**0,013**
Gyulladás enyhe/nincs Gyulladás közepes/kifejezett	7 25	10 14	0,111
	Inaktív EGFR	Aktív EGFR	
vIII negatív vIII pozitív	35 10	21 5	0,77
HPV negatív HPV pozitív	37 8	20 6	0,71
Normál kópaiszám Emelkedett kópiaszám	21 22	17 9	0,181
Érbetörés nincs Érbetörés van	19 21	7 11	0,542
	vIII neg	vIII poz	
HPV negatív HPV pozitív	45 11	12 3	0,1

6. táblázat: ***Az egyes EGFR hibák együttes statisztikai kiértékelése***

Prognosztikai faktor	Relatív kockázat (95%-os konfidencia intervallum)	p
Lokalizáció	1 (0,718-1,392)	0,997
Érbetörés	9,669 (2,607-35,856)	**0,0006**
Gyulladásos infiltráció	3,313 (1,032-10,628)	**0,044**
Stage	0,963 (0,80-1,144)	0,665
Grade	1,407 (0,807-2,452)	0,229
EGFR aktivitás (p-EGFR)	0,476 (0,213-1,061)	*0,069*
vIII	3,008 (0,979-9,249)	*0,054*
HPV	1.079 (0.406-2.872)	0,879
EC ligandkötő domén	1,839 (0,838-4,034)	0,128

7. táblázat: ***COX analízis az egyes biológiai sajátosságok hatásáról a betegek túlélésére***

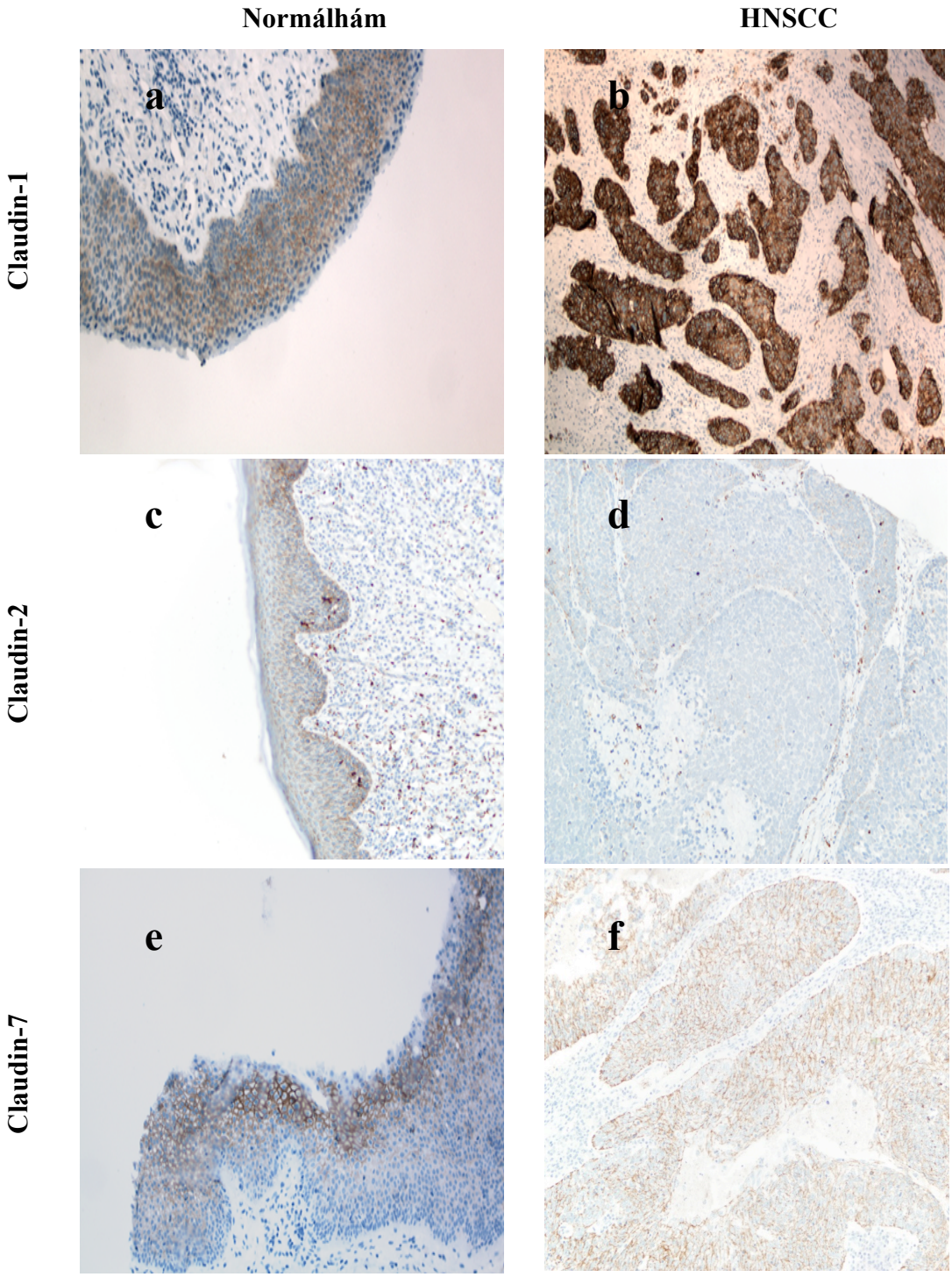
DOI:10.14753/SE.2015.1722

4.9 Claudinok

4.9.1 Claudinok kifejeződése a fej-nyak régió normál hámjában

A claudinok megoszlása a fej-nyak régió laphámjában egyedi különbségeket mutat, azonban néhány általános tulajdonságra sikerült rávilágítani. Kifejezett CLDN1 sejtmembrán pozitivitás volt kimutatható a minták többségében a normál hám bazális kétharmadában, mely reakció a felsőbb rétegekben nem volt jelen (**22/a ábra**). A CLDN2 erős citoplazmatikus pozitivitást mutat a normál hám minden rétegében (**22/c ábra**). A CLDN4 esetében hasonló eredményt kaptunk mint CLDN1 esetében, kivéve, hogy csupán 21 minta adott pozitív jelet, és a reakció nagyon gyenge volt. CLDN7-re mintáinkból 28-nál gyenge membránpozitivitás volt jellemző a hám apikális harmadában (**22./e ábra**). A vizsgált három lokalizáció (oropharynx, hypopharynx és larynx) egyik claudin kifejeződése szempontjából sem különbözött szignifikánsan (az összes vizsgált $p>0,05$; Kruskal-Wallis teszt). Valamennyi minta negatívnak bizonyult CLDN3, -8 és -10-re a normál szövettani hámban (**23. ábra**).

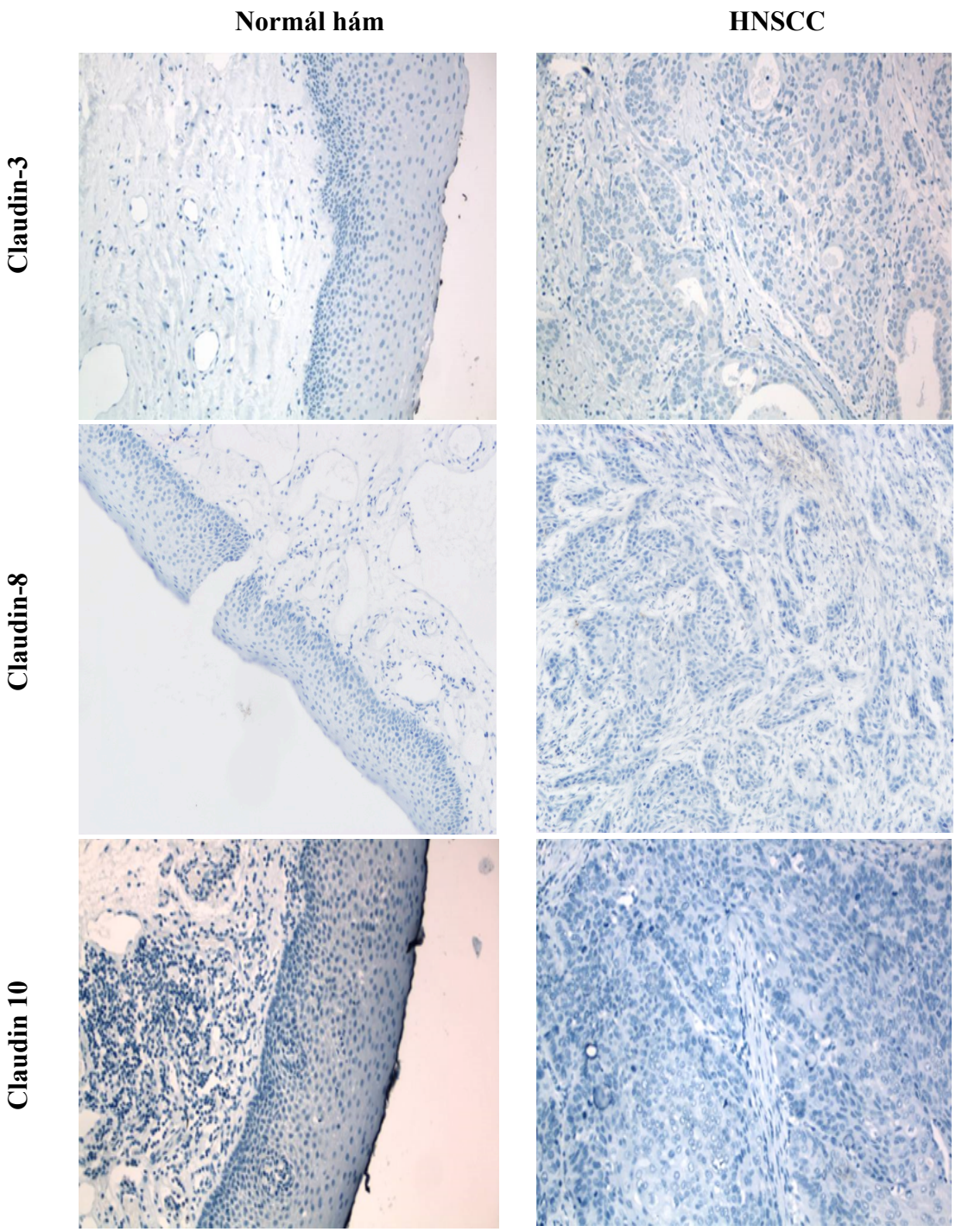
DOI:10.14753/SE.2015.1722



22. ábra: ***A CLDN1, -2 és -7 expressziója normál hámban és fej-nyaki laphámrákban***

*Normál hámban a CLDN1 kifejezett sejtmembrán pozitivitást mutat a hám bazális kétharmadában (**a**). Daganatos szövetben a CLDN1 diffúzan erősebb membránpozitivitást mutat (**b**). Normál hámban a CLDN2 erős pozitivitást mutat a hám minden rétegében (**c**). A CLDN2 reakció szignifikánsan gyengébb a daganatban (**d**). A CLDN7 expresszió közel hasonló a CLDN1 mintázatával normál (**e**) és daganatos szövetben egyaránt (**f**) (400x-os nagyítás)*

DOI:10.14753/SE.2015.1722



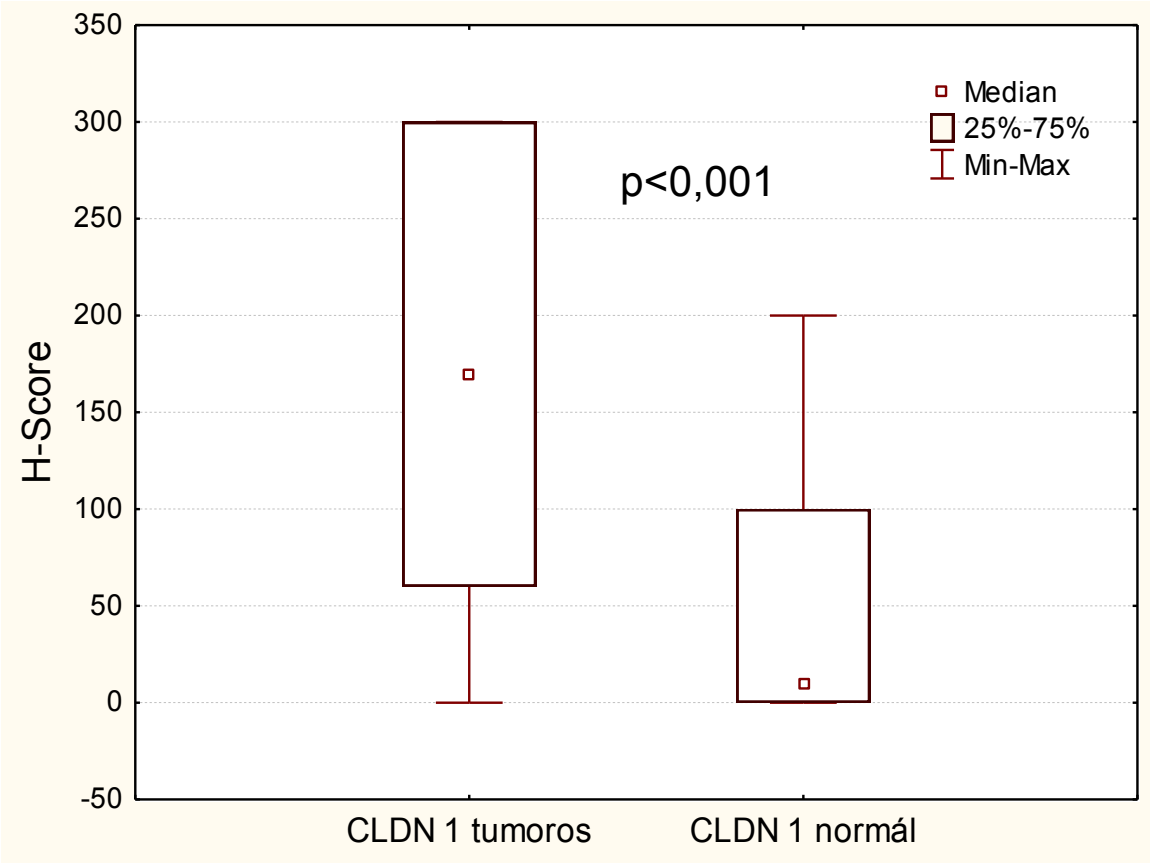
23. ábra: ***A CLDN3, -8 és -10 expressziója normál hámban és fej-nyaki laphámrákban*** *(400x-os nagyítás)*

DOI:10.14753/SE.2015.1722

4.9.2 Claudinok kifejeződése a fej-nyak régió laphámrákjában

További, részletes elemzéseink a CLDN1, -2 és -7 molekulákra irányultak, melyek a vizsgált anyagban szignifikáns expressziót mutattak.

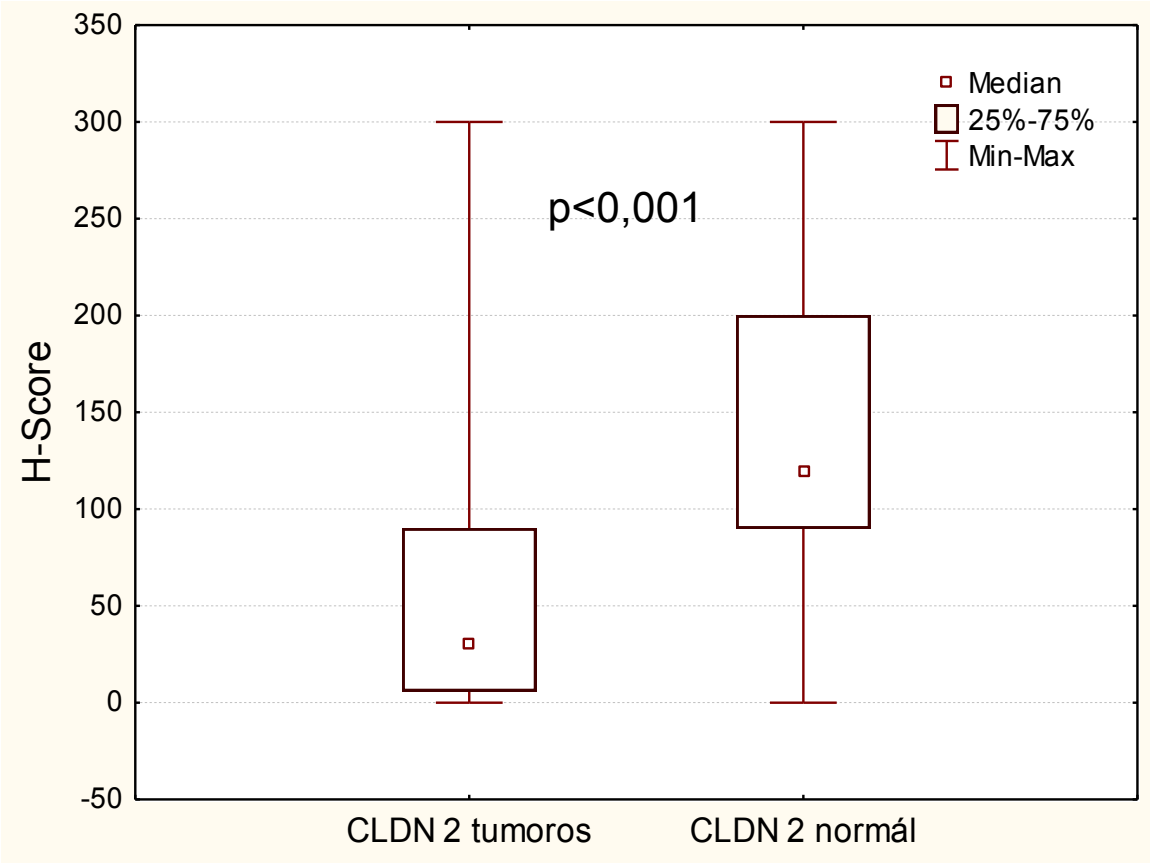
A minták 90,1%-a kifejezett CLDN1 pozitivitást mutatott. Összehasonlítva a normál hámmal, a CLDN1 diffúzan erősebb membránpozitivitást mutat (**22./b ábra**), amely szignifikáns eltérés volt (**24. ábra**).



24. ábra: ***Claudin-1 kifejeződése a fej-nyak régió tumoros és normális hámjában***
Az expresszió szignifikánsan magasabb a laphámráksejtekben (párosított Wilcoxon-teszt)

DOI:10.14753/SE.2015.1722

Ezzel szemben a CLDN2 (**22./d ábra**) szignifikánsan gyengébb reakciót mutatott a daganatos szövetben, mint a normál hámban (**25. ábra**).



25. ábra: ***Claudin-2 kifejeződése a fej-nyak régió tumoros és normális hámjában***
Az expresszió szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a laphámrák-sejtekben (párosított Wilcoxon-teszt).

A vizsgált HNSCC minták 78,9%-a kifejezett CLDN7 pozitivitástmutatott (**22./f ábra**), megközelítőleg ugyanolyan mintázatban, mint a CLDN1. A két molekula expresszióját tekintve enyhe korreláció volt mérhető (**8. táblázat**). A CLDN1 és CLDN2 expressziója ugyanakkor nem mutatott szignifikáns összefüggést (**8. táblázat**). A nyers számokat véve a Spearman-féle rangkorrelációs vizsgálat szintén mérsékelt, de szignifikáns korrelációt mutatott ki a CLDN1 és CLDN7 között (R=0,425, P<0,05).

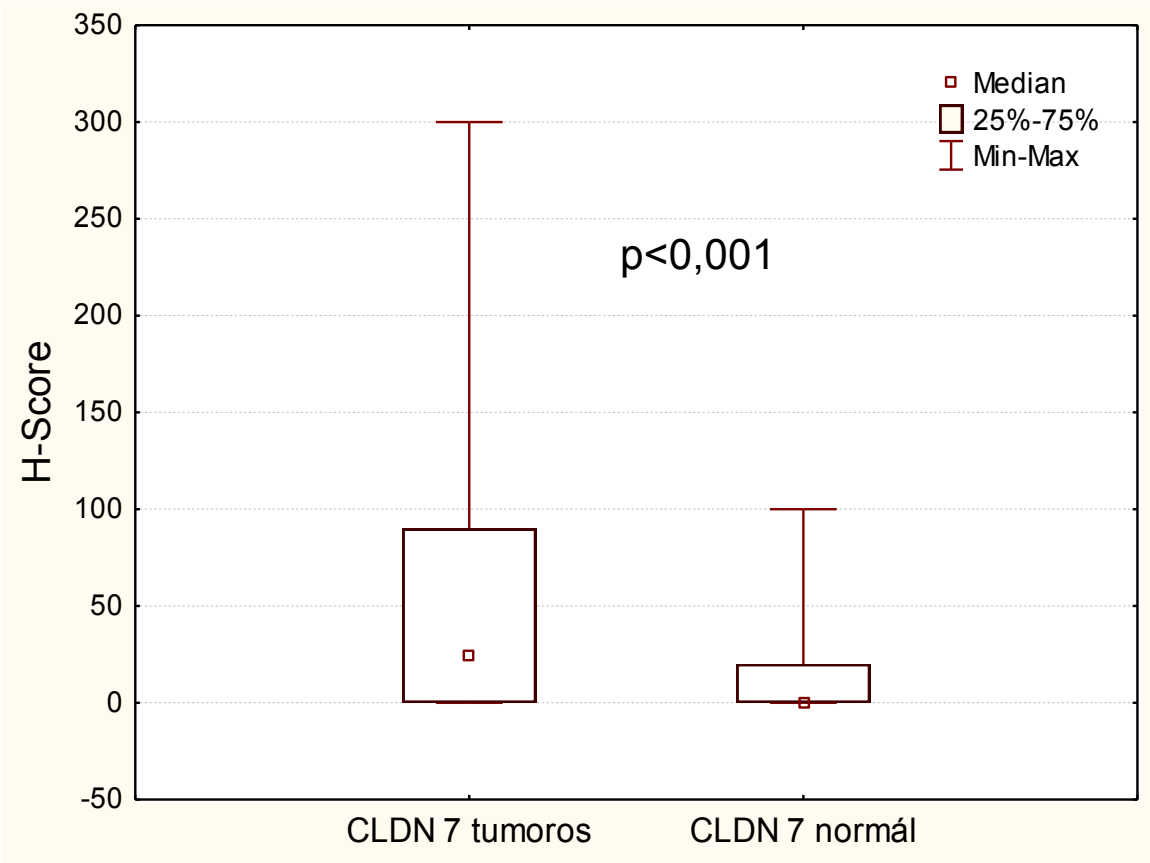
	CLDN1 - alacsony	**CLDN1 - magas**	**p (Khi-négyzet)**
CLDN2 - alacsony	18	15	
CLDN2 - magas	18	20	0,546
CLDN7 - alacsony	23	13	
CLDN7 - magas	13	22	**0,024**

8. táblázat: ***A CLDN1, -2 és -7 expresszió összefüggései előfordulási gyakoriságok alapján***

A CLDN1 és -7 szignifikáns összefüggést mutatott, míg a CLDN2 függetlennek bizonyult.

Összehasonlítva a normál és tumoros szöveteket, a CLDN7 expresszió intenzitása **(22./e,f ábra**) emelkedett a daganatos mintákban (**26. ábra**), azonban a reakció gyengébbnek bizonyult, mint a CLDN1 esetében, és csupán a daganatos minták 64,8%-a volt pozitív. Ha a claudinokat lokalizációnként csoportosítva (oropharynx, hypopharynx, gége) vizsgáljuk, a normál hám és a laphámsejtes daganatok közötti különbségek ugyanúgy megmaradnak (összes $p<0,05$, Wilcoxon-teszt).

Az összes vizsgált fej-nyaki daganatos szövettani minta negatívnak bizonyult CLDN3, -4, -8 és CLDN10-re (**23. ábra**).

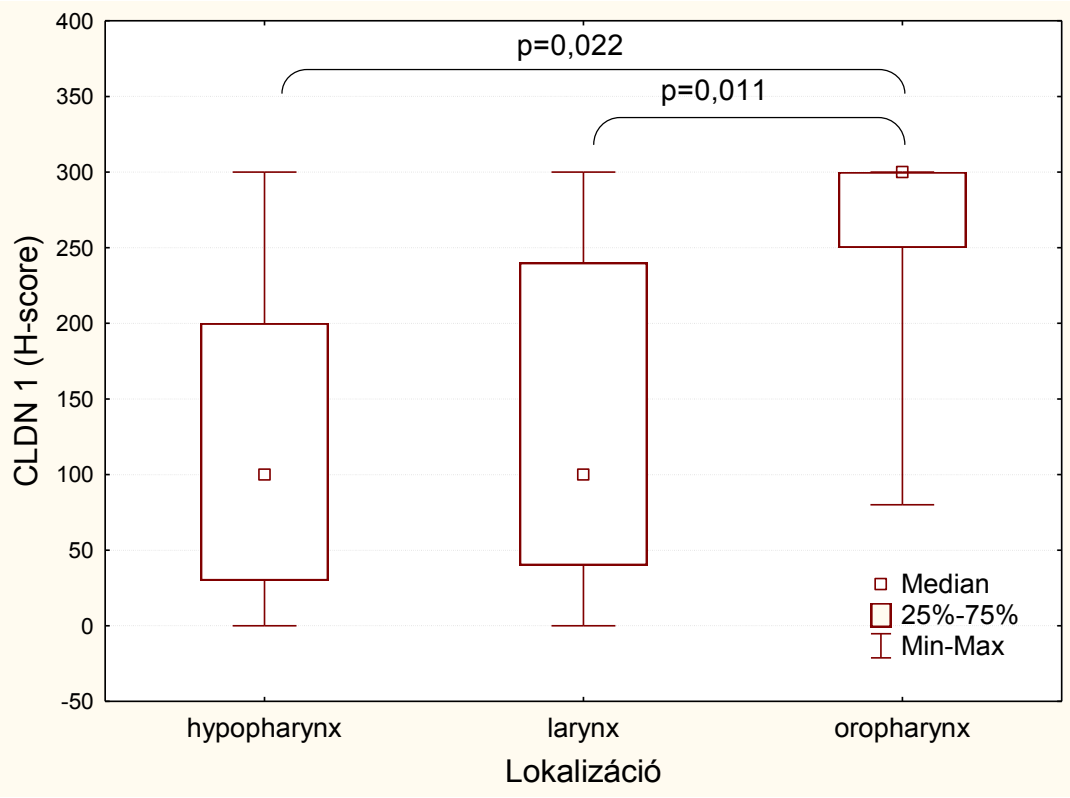


26. ábra: A *claudin-7 kifejeződése a fej-nyak régió tumoros és normális hámjában*
Az expresszió szignifikánsan magasabb a laphámrák-sejtekben (Wilcoxon-teszt).

DOI:10.14753/SE.2015.1722

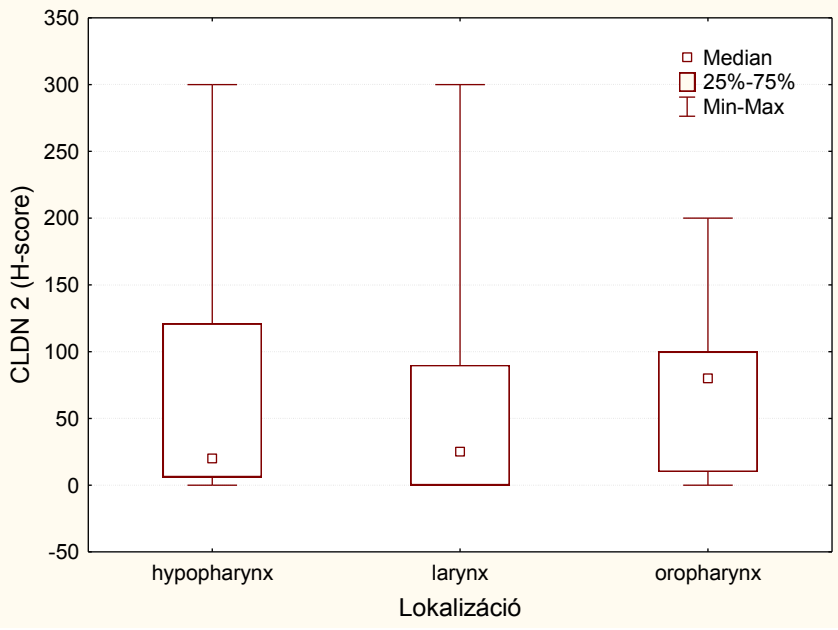
4.9.3 Összefüggés a claudin expresszió és a különböző klinikopatológiai paraméterek között

A CLDN1 kifejeződése oropharyngealis daganatokban szignifikánsan magasabb volt, mint a másik két lokalizációban (**27. ábra**). A CLDN2 és CLDN7 eloszlása függetlennek bizonyult a primer tumor helyétől (**28. és 29. ábra**).



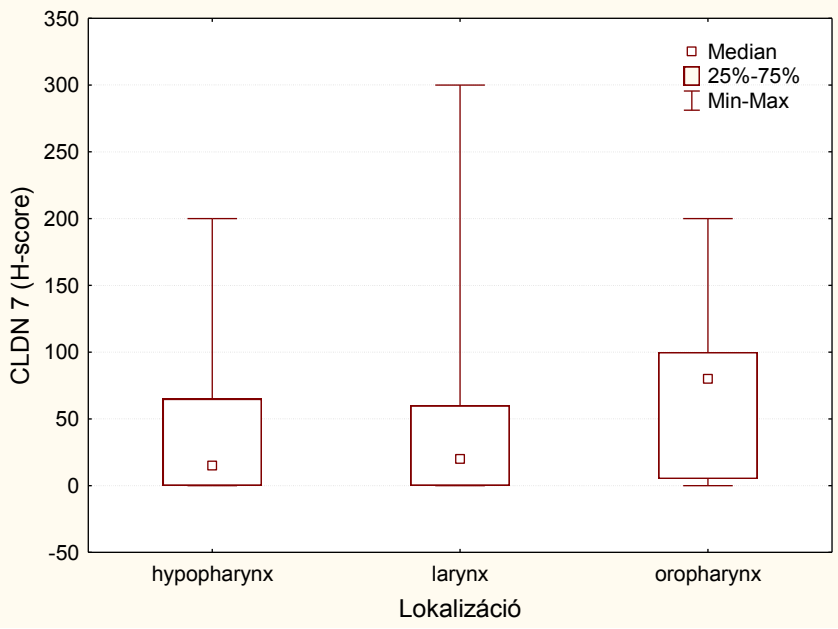
27. ábra: ***A claudin-1 kifejeződése különböző lokalizációjú HNSCC-ban***
Az expresszió szignifikánsan magasabb az oropharynxban (Kruskal-Wallis teszt)

DOI:10.14753/SE.2015.1722



28. ábra: ***A claudin-2 kifejeződése különböző lokalizációjú HNSCC-ban***

Az expresszió nem mutatott különbséget (Kruskal-Wallis teszt, p>0,05).



29. ábra: ***A claudin-7 kifejeződése különböző lokalizációjú HNSCC-ban***

Az expresszió nem mutatott különbséget (Kruskal-Wallis teszt, p>0,05).

A CLDN1, -2 és -7 expressziója függetlennek bizonyult a legtöbb ismert klinikai és patológiai paramétertől, például kortól, nemtől, HPV-státusztól, alkoholfogyasztástól, stádiumbeosztástól és szöveti differenciálódástól (**9. táblázat**).

DOI:10.14753/SE.2015.1722

	Esetszám (%)	CLDN-1 alacsony[a] (%)	CLDN-1 magas[a] (%)	*p érték*	CLDN-2 alacsony[a] (%)	CLDN-2 magas[a] (%)	*p érték*	CLDN-7 alacsony[a] (%)	CLDN-7 magas[a] (%)	*p érték*
Összes eset	71 (100%)	36 (50,7%)	35 (49,3%)		33 (56,8%)	38 (42,2%)		36 (50,7%)	35 (49,3%)	
Életkor (évek)[a]										
54<	34 (47,9%)	20 (55,6%)	14 (40%)		16 (48,5%)	18 (47,4%)		21 (58,3%)	13 (37,1%)	
54≥	37 (52,1%)	16 (44,4%)	21 (60%)	0.19[b]	17 (51,5%)	20 (52,6%)	0.925[b]	15 (41,7%)	22 (62,9%)	0,074[b]
Nem										
Férfi	58 (81,7%)	29 (80,6%)	29 (80,6%		27 (81,2%)	31 (81,6%)		31 (86,1%)	27 (77,1%)	
Nő	13 (18,3%	7 (19,4%)	6 (19,4%)	0.802[b]	6 (18,8%)	7 (18,4%)	0.979[b]	5 (13,9%)	8 (22,9%)	0,329[b]
Lokalizáció										
Oroph.	16 (22,5%)	2 (5,6%)	14 (40%)		4 (12,1%)	12 (31,6%)		6 (16,7%)	10 (28,6%)	
Larynx	35 (49,3%)	21 (58,3%)	14 (40%)		18 (54,5%)	17 (44,7%)		19 (52,8%)	16 (45,7%)	
Hypoph.	20 (28.2%)	13 (36.1%)	7 (20%)	0.002[b]	11 (33.3%)	9 (23.7%)	0.143[b]	11 (30.6%)	9 (25.7%)	0,486[b]
HPV										
Neg.	57 (80,3%)	30 (83,3%	27 (77,1%)		27 (81,2%)	30 (79%)		29 (80,6%)	28 (80%)	
Poz.	14 (19,7%)	6 (16,7%)	8 (22,9%)	0.512[b]	6 (18,8%)	8 (21%)	0.762[b]	7 (19,4%)	7 (20%)	0,953[b]
Alkoholfogyasztás										
Soha	19 (26,8%)	11 (30,6%)	8 (22,9%)		9 (27,3%)	10 (26,3%)		11 (30,6%)	8 (22,9%)	
Mérs.	23 (32,4%)	10 (27,8%)	13 (37,1)		14 (42,4%)	15 (39,5%)		12 (33,3%)	11 (31,4%)	
Erős vagy nagyon erős	29 (40,8%)	15 41,7%	14 (40%)	0.642[b]	10 (30,3%)	13 (34,2%)	0.939[b]	13 (36,1%	16 (45,7%)	0,666[b]
Klinikai stádium										
I-II	41 (57,7%)	19 (52,8%)	22 (62,9%)		18 (54,5%)	23 (60,5%)		17 (47,2%)	24 (68,6%)	
III-IV	30 (42,3%)	17 (47,2%)	13 (37,1%)	0.39[b]	15 (45,5%)	15 (39,5%)	0.611[b]	19 (52,8%)	11 (31,4%)	0,069[b]
Differenciáltság										
1	19 (26,8%)	13 (36,1%)	6 (17,1%)		8 (24,2%)	11 (29%)		10 (27,8%)	9 (25,7%)	
2	42 (59,2%	19 (52,8%)	23 (65,8%)		18 (54,5%)	24 (63,2%)		18 (50%)	24 (68,6%)	
3	10 (14,9%)	4 (11,1%)	6 (17,1%)	0.188[b]	7 (21,2%)	3 (7,9%)	0.274[b]	8 (22,2%)	2 (5,7%)	0,106[b]

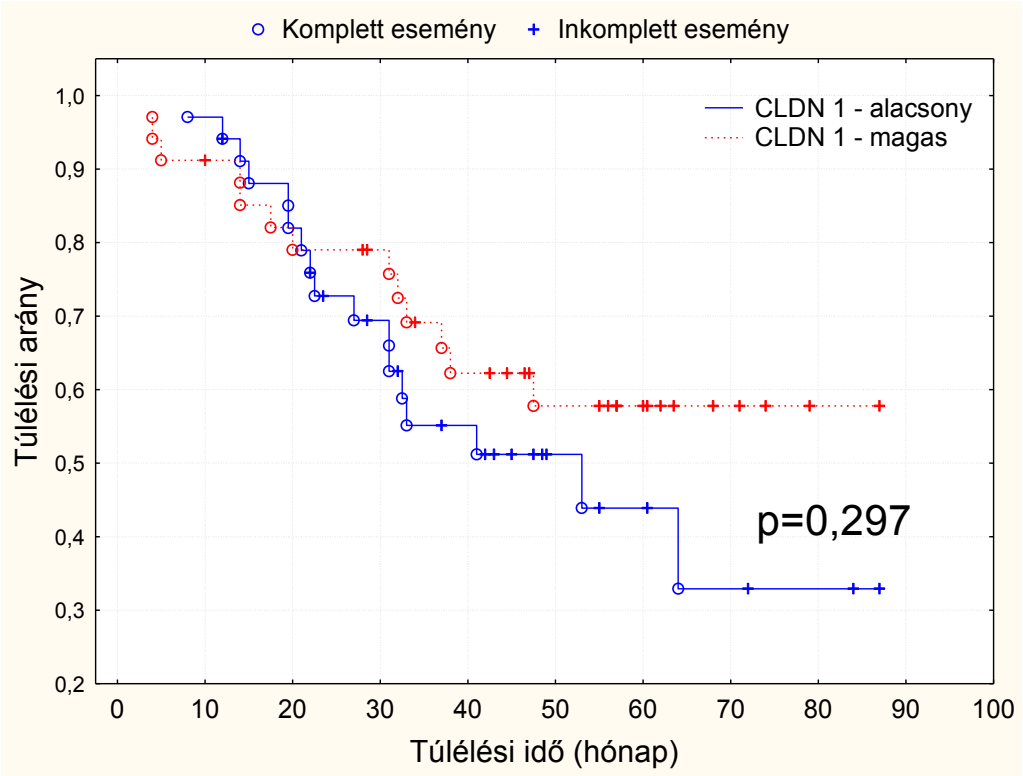
[a]Küszöbérték: medián; [b] Khi-négyzet próba; (A zárójelben megjelölt értékek százalékban értendők.)

9. táblázat: ***A vizsgálatban szereplő daganatminták klinikopatológiai paramétereinek összefüggése a claudin expresszióval***

DOI:10.14753/SE.2015.1722

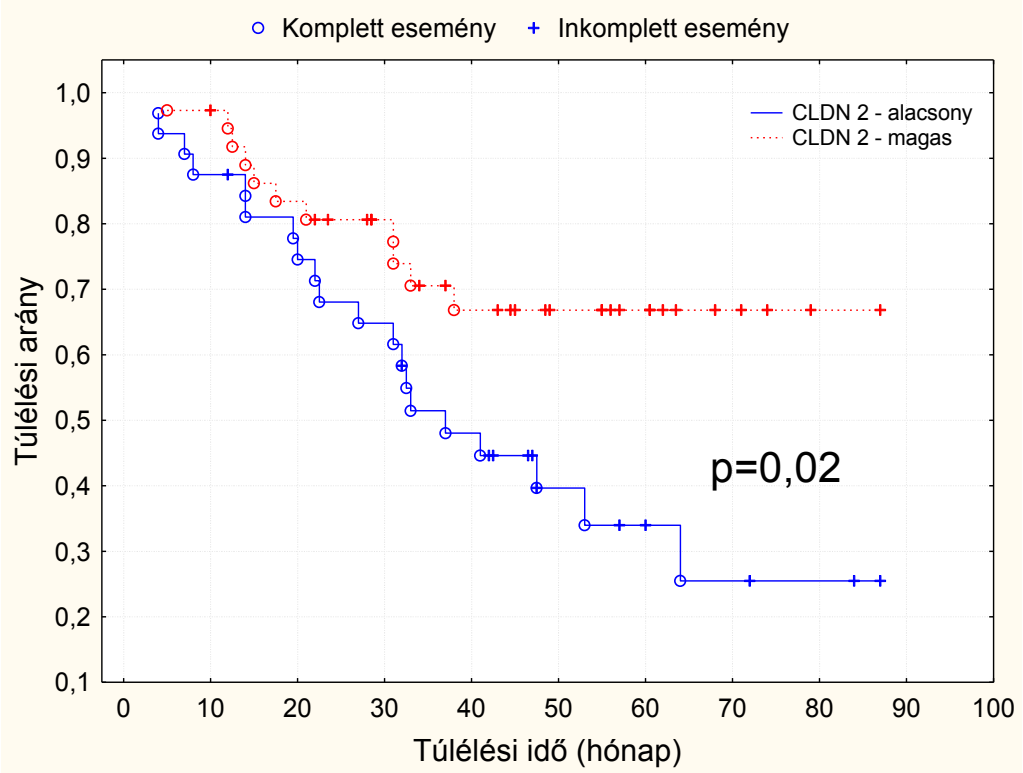
4.9.4 Claudinok prognosztikai szerepe a fej-nyaki laphámrákokban

A claudinok túlélést befolyásoló szerepének megítélésére Kaplan-Meier görbéket és log-rank analízist használtunk. A daganatokat a claudinok szempontjából alacsonyan és magasan expresszáló csoportra osztottuk (küszöbértékül a medián értékek szolgáltak). Azt találtuk, hogy a CLDN1 és CLDN7 expressziója nem befolyásolja a teljes túlélést (**30. és 32. ábra**), azonban a CLDN2 alacsonyabb expressziójához rosszabb túlélés társult (p=0,02; **31. ábra**).

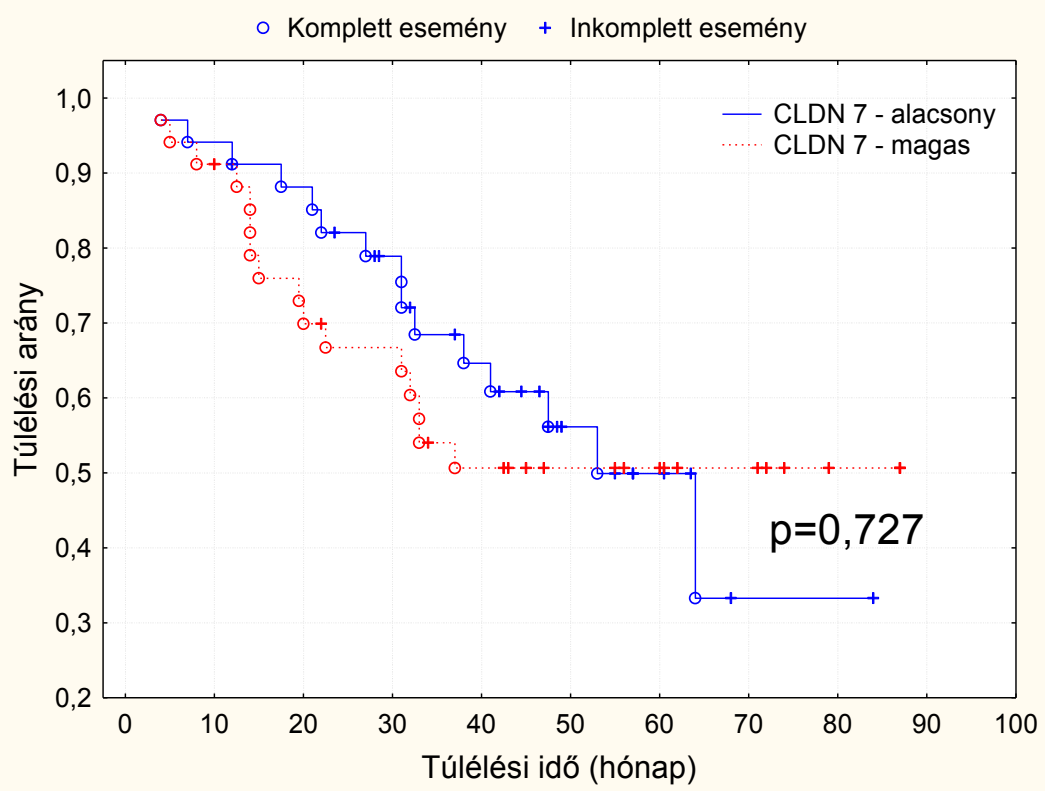


30. ábra: ***A claudin-1 expresszió és túlélés összefüggése (Kaplan-Meier görbe)***
A túlélésben nem volt szignifikáns különbség a claudin-1 molekulát mérsékeltebben és fokozottabban expresszáló tumoros csoportok között

DOI:10.14753/SE.2015.1722



31. ábra: ***A claudin-2 expresszió és túlélés összefüggése (Kaplan-Meier görbe)***
A claudin-2-t kevésbé expresszáló csoport szignifikánsan rosszabb túlélést mutatott



32. ábra: ***A claudin-7 expresszió és túlélés összefüggése (Kaplan-Meier görbe)***

A túlélésben nem volt szignifikáns különbség a claudin-7 molekulát mérsékeltebben és fokozottabban expresszáló tumoros csoportok között

Multivariációs Cox-regressziós analízis segítségével a claudinokat olyan további standard prognosztikai változókkal vetettük össze, mint az életkor, a nem, a daganatstádium (stage), a szövettani differenciáció foka (grade), az alkoholfogyasztás és a HPV-státusz (**10. táblázat**), így keresve a független prognosztikai faktorokat. Az eredmények azt mutatták, hogy a magas CLDN2 szint jelentősen csökkentette a kockázatot (p=0,04), ezzel szemben CLDN7 nem rendelkezett prognosztikai szereppel. Emellett a stádium további, független prognosztikai tényezőnek bizonyult, ugyanis az előrehaladottabb esetekhez rosszabb túlélés társult, amely megállapítás teljesen összhangban állt a korábban publikált vizsgálatokkal.[100] Megjegyezzük, hogy mivel a Spearman-féle rangkorrelációs vizsgálat mérsékelt, de szignifikáns korrelációt mutatott ki a CLDN1 és CLDN7 között (R=0,425, P<0,05), e két érték közül csupán az egyik szerepelhetett Cox regressziós modellben.

Prognosztikai faktorok	**RR**	**95% CI**	***P***
Életkor (években) (<54 vagy ≥54)	0,552	(0,189-1,619)	0,279
Nem (nő vagy férfi)	1,299	(0,623-2,709)	0,485
Klinikai stádium (I-II vagy III-IV)	4,427	(2,004-9,781)	**0,0002**
Differenciáltság (1 vs. 2 vs. 3)	1,111	(0,693-1,78)	0,662
Alkoholfogyasztás (soha, mérsékelt, erős vagy nagyon erős)	1,03	(0,653-1,625)	0,897
HPV (negatív vagy pozitív)	1,537	(0,613-3,849)	0,359
CLDN2 (alacsony vs. magas)[a]	0,461	(0,22-0,967)	**0,04**
CLDN7 (alacsony vs. magas)[a]	1,312	(0,619-2,814)	0,472

10. táblázat: ***Fej-nyaki daganatos betegek független prognosztikai faktorokat vizsgáló többváltozós analízise***

A klinikai stádium mellett a CLDN2 is független prognosztikai faktornak bizonyult.
[a] küszöbérték: medián; RR: relatív kockázat; CI: konfidencia intervallum

DOI:10.14753/SE.2015.1722

5. Megbeszélés

5.1. Az EGFR-jelpálya humán fej-nyaki laphámrákokban

A sebészi, kemo- és radioterápia rohamos fejlődése ellenére a lokoregionálisan előrehaladott vagy távoli áttéteket adó fej-nyaki tumorok prognózisa továbbra is igen rossz. Sem a sebészi technikák további fejlődésétől, sem a tolerálhatóság határát már-már elérő klasszikus cytotoxicus kemoterápia és a sugárkezelés fejlesztésétől sem várható érdemi javulás. A kezelés hatékonyságának növelésére reményteli lehetőség az eddigi kezelések kiegészítése targetspecifikus terápiával, ezen kívül igen fontos az új molekuláris biológiai prognosztikai és prediktív faktorok feltérképezése és alkalmazása is.

Az epidermális növekedési faktor receptora ígéretes célpontnak tűnt, ezért az EGFR ellenes monoklonális antitestek és a tirozin-kináz inhibitorok egyaránt kipróbálásra kerültek a terápiában.[101] Az EGF-receptornak azonban számos olyan hibája ismert, mely a célzott terápia kimenetelét jelentősen befolyásolja, ezért kutatásaink során célkitűzésünk volt többek között az EGFR expressziójának és genetikai hibáinak meghatározása a hazai betegpopulációban. Összesen 71 tumormintát vizsgáltunk, melyek öt különböző lokalizációból származtak. Az általunk vizsgált betegcsoport jól reprezentálja a magyarországi HNSCC-s populációt: a betegek többsége férfi, erős dohányos, és rendszeres alkoholfogyasztó volt. A daganatok főként II-es és III-as stádiumúak voltak. A túlélés erős korrelációt mutatott a lokalizációval, a grade-del, az érbetörés jelenlétével és a tumor gyulladásos infiltrációjával.

Az EGF-receptornak számos hibája ismert daganatokban. A protein overexpresszión és a génamplifikáción túl[102] a TK domén mutációját[103] és az extracelluláris ligandkötő domén delécióját (mely az ún. vIII variánst hozza létre)[104] is leírták számos tumortípusban. A KRAS, mely az EGFR-szignalizáció egyik legjelentősebb fehérjéje és az egyik leggyakoribb onkogén humán tumorokban, szintén hordozhat az anti-EGFR terápia kimenetelét befolyásoló mutációkat.[105]

Vizsgálatainkban az EGFR expresszió meghatározásához 4 epitóp-specifikus antitestet használtunk, mely lefedte az egész receptort, nevezetesen az extracelluláris ligandkötő

domént, az extracelluláris membránközeli és az intracelluláris régiót. Ezeken kívül az egyik antitest az intracelluláris TK domén foszforilált formáját festette meg, mellyel az aktív receptorok jelenlétét tudtuk kimutatni. A festődés erősségének meghatározásakor minden esetben ugyanazon beteg normál hámjához viszonyítottuk az értékelést. Az anatómiai lokalizációtól függetlenül kifejezett heterogenitást tapasztaltunk a fehérje-expresszióban: expressziót nem mutató és a fehérjét erősen kifejező sejtek egyaránt előfordultak egy tumoron belül is. Statisztikai elemzések során kimutattuk, hogy az EGFR túlzott expressziója (az intracelluláris domént felismerő antitesttel detektálva) szignifikánsan rosszabb túléléssel társult az általunk vizsgálat betegpopulációban. Ezt az eredményt korábbi vizsgálatok megerősítik, melyek szintén kimutatták, hogy az EGFR overexpresszió negatív prognosztikai faktor.[18,106] Az extracelluláris ligandkötő domént felismerő antitestet használva azonban az előbbi eredményt nem sikerült kimutatni. Ennek hátterében az állhat, hogy a vIII mutáns EGFR ezzel az antitesttel nem tud reagálni, mivel az extracelluláris domén 2-7-es exonja komplett deléciót szenved a mutáció során.[26] Kutatásaink során a minták 21%-a erős pozitivitást mutatott a vIII variánst felismerő antitesttel festve. Ehhez hasonló publikációk is megjelentek már korábban, melyben a vIII mutáció gyakoriságát HNSCC-s betegekben 42 százalékra tették.[27] Egy japán tanulmányban azonban 13 esetből egyben sem sikerült kimutatni az EGFRvIII jelenlét, ami arra utalhat, hogy regionális különbségek előfordulhatnak ebben a betegségben is.[107] Erős korrelációt találtunk a vIII mutáció és az emelkedett génkópiaszám jelenléte között, de az EGFR fokozott aktivitása (a foszforilált TK domént felismerő antitesttel detektálva), a génamplifikáció, a HPV infekció és a vIII mutáció között szignifikáns összefüggés nem mutatkozott. Érdekes megfigyelés, hogy az EGFR fokozott aktivitása jobb túléléssel társult, bár az eredmény a statisztikai szignifikancia szintjét nem érte el. Ez azt sugallja, hogy az emelkedett génkópiaszámmal és fehérjeexpresszióval ellentétben a fokozott receptoraktiváció jobb prognózissal társul. Hasonló megfigyeléseket írtak le tüdőtumoros betegekben is[108], de ezen összefüggést fej-nyaki daganatokban munkacsoportunknak sikerült először kimutatni.

A TK domén mutációja gyakori bizonyos tumorokban, mint például nem-kissejtes tüdődaganatban[102], HNSCC-ben azonban nagyon ritka.[22,28] Európai tanulmányokban eddig nem tudtak kimutatni mutációt a TK doménben, egy japán vizsgálatban pedig az

esetek 7,3%-ában volt jelen.[30] Az eddigi vizsgálataink is azt a megfigyelést látszanak alátámasztani, mely szerint az európai HNSCC betegek körében ez a mutáció extrém ritkán fordul elő.

A RAS fehérje az EGF receptoron keresztül aktiválódó jelátviteli kaszkád egyik legjelentősebb regulátorfehérjéje. A RAS géncsalád (KRAS, HRAS, NRAS) mutációi gyakori génhibák humán daganatokban, melynek eredményeként konstitutívan aktív a fehérje, s ezáltal a mitotikus szignál EGF receptortól függetlenül is folyamatosan aktív lesz. Ebből következik, hogy mutáns RAS esetén az EGFR-gátlás nem vezethet eredményre. Több tanulmány szerint a KRAS mutáció gyakorisága 30-70% között változik különböző daganatokban[109], a fej-nyaki régióban azonban alig fordul elő.[20,34] Nekünk összesen két mintában sikerült kimutatni mutáns KRAS-t, mely a 12-es kodonban hordozott hibás allélt.

A HPV-infekció fej-nyaki tumorok etiológiájában betöltött szerepével több kutatás foglalkozott.[5] A HPV-fertőzés befolyásolhatja az anti-EGFR terápiát, hiszen egyre több adat utal arra, hogy az integrált HPV jelenléte kedvezőbb túléléssel társul.[110] Egy korábbi vizsgálat szerint a magyarországi populációban a szájüregi és oropharyngeális rákok 48,5%-ában, laryngeális tumorokban pedig 35,7%-ban fordult elő HPV infekció.[111] A verrukózus tumorok mindegyike, a basaloid daganatoknak pedig a döntő többsége HPV pozitív volt, míg a szövettanilag típusos laphámsejtes rákokban (mint amilyeneket mi is vizsgáltunk) mindössze 19,6%-ban volt kimutatható a fertőzés. Ez utóbbi eredmény jól korrelál a megfigyelésünkkel, mely szerint a minták 19,7%-ában volt jelen magas rizikójú humán papilloma vírus (16, 18, 33).

Statisztikailag szignifikáns összefüggést nem tudtunk kimutatni az infekció és a túlélés, az EGFR expresszió, illetve egyéb génhibák jelenléte között. A HPV incidenciája a szájüregtől a gége felé haladva csökkenő tendenciát mutatott és minden esetben normál kópiaszámban volt jelen az EGFR gén. Ezen eredmények alapján annak meghatározásához, hogy a HPV-nek milyen hatása van a HNSCC-k karcinogenezisében, még további vizsgálatokra van szükség. Azt azonban fontos megjegyezni, hogy a vizsgált betegek szinte kivétel nélkül erős dohányosok és rendszeres alkoholfogyasztók voltak, ezért a kémiai és a virális karcinogenezist ebben az esetben nem lehet szétválasztani.

Összefoglalásképpen kijelenthetjük, hogy eredményeink alapján a hazai HNSCC betegpopuláció az EGFR biológiai jellemzőit tekintve nem tér el az európai átlagtól, viszont karcinogenezisében nagyobb hatással bír az alkohol és a dohányzás, mint a virális infekció. Mivel az anti-EGFR terápiák gyakran hatástalanok, fontos hangsúlyozni, hogy az antitestek alkalmazása előtt célszerű lenne a vIII variáns jelenlétének kimutatása, hisz ez a mutáció alapvetően befolyásolja a terápiás antitestek hatásosságát. Az EGFR gátlás hatástalanságának másik lehetséges magyarázata lehet, hogy alternatív jelátviteli útvonalak aktiválódnak, mint például a PIP3/AKT, c-Met, Src. A fenti tények ismeretében kutatócsoportunk az értekezésemben leírtakon felül preklinikai kutatásokat végez, melyeknek legfőbb célja az, hogy *in vitro és in vivo* körülmények között feltérképezzük a már terápiában használatos EGFR inhibitorok, egy RAS gátlószer és a hepatocita növekedési faktor receptor (c-Met) gátlószer hatását HNSCC sejtvonalakon és tumor xenograftokon. Előzetes eredményeink azt mutatják, hogy az anti-EGFR terápiára rezisztens kísérletes HNSCC daganatokra a c-Met ellenes terápia hatásosnak bizonyulhat. Ezek alapján az EGFR-ellenes terápiák megválasztásakor érdemes az EGFR hibáin kívül a c-Met-gátlás lehetőségét is vizsgálni.

További munkáink során vizsgáltuk az immunrendszer szerepét a fej-nyaki laphámrákok célzott terápiájában. Az antitestterápiák hatásosságában elengedhetetlen az immunrendszer szerepe, a terápiás antitesteket megkötött tumorsejteket az immunrendszer sejtjei eliminálják.[112] Munkánk során vizsgáljuk a cetuximab *iv vitro* kötődését, immunmoduláló hatását és *in vivo* hatásosságát vIII mutációt hordozó HNSCC sejteken. Az immunválasz vizsgálatára végzett előzetes kísérleteink azt mutatják, hogy az immunrendszernek kulcsszerepe van az anti-EGFR terápiában is. Úgy tűnik, hogy az EGFRvIII variáns kifejeződése a tumorban rezisztenciát okozhat, mivel a terápiás antitest nem kötődik a mutáns receptorhoz, ezáltal nem indul be az ADCC sem.

5.2. A claudinexpresszió humán fej-nyaki laphámrákokban

A rosszindulatú daganatok kialakulása és progressziója során a sejt-sejt kapcsolatok megváltozása tapasztalható, mely folyamat során a sejtkapcsoló struktúrák, köztük a

claudin molekulák alterálódása is tetten érhető. Ezek a változások megnyilvánulhatnak a claudinoknak a normál szövethez képest fokozott vagy csökkent expressziójában, amely a későbbiekben felhasználható lehet a szövettani differenciál-diagnosztikában, prognosztikai jelentőséget hordoz, és targetspecifikus terápia alapját is képezheti.

Korábbi vizsgálatok foglalkoztak a claudinok expressziójával és prognosztikai szerepével emlő-, petefészek-, hasnyálmirigy-, prosztata-, méhnyak-, nyelőcső és húgyhólyagrákokban[68,73,79,80,97,113,114,115,116], a HNSCC-ra vonatkozóan azonban idáig még kevés adat áll rendelkezésre, mivel a témában kevés publikáció látott napvilágot.[117,118,119,120] Vizsgálatainkban immunhisztokémiai eljárás segítségével szisztematikusan feltérképeztük a claudinok expressziós profilját ugyanazon 71 HNSCC daganat mintáiban, valamint a szomszédos normál hámszövetben. Eredményeink alapján elmondható, hogy a normál és a daganatos hám claudin expressziójában különbség van.

Vizsgálatunkban a CLDN1, -2, -3, -4, -7, -8 és -10 molekulákra fókuszáltunk. A normál és a daganatos hámból származó mintáink egyaránt negatívnak bizonyultak CLDN3, -8, és -10-re. Beteganyagunkban a claudin-3 vizsgálata alátámasztotta azon korábbi vizsgálati eredményeket, melyek szerint a CLDN3 a laphámban nincs jelen.[89] A normál hámban a CLDN4 enyhe kifejeződést mutatott, azonban laphámrákos mintáinkban ez teljesen eltűnt. Annak ellenére, hogy más régiók (pl. emlő, petefészek, hasnyálmirigy, prosztata) tumoraiban a CLDN4 tűnik a legígéretesebb terápiás célpontnak[78,121], saját eredményeink alapján a fej-nyak régióban az alacsony mértékű expresszió miatt erre nem lehet számítani. A szövettani hasonlóság és régió közelsége miatt érdemes megemlíteni, hogy Shi és munkatársai nyelőcső laphámrákjában nyelőcsőrezekciót követően a CLDN4 alacsony expressziója esetén a kiújulás és az áttétképzés valószínűségét szignifikánsan magasabbnak találták.[116]

A CLDN1, -2 és -7 expresszió szignifikáns különbséget mutatott a normál és malignus szövetek között. A normál és a daganatos szövetekben mindhárom claudin expressziója független volt a kiindulási helytől, kivéve a CLDN1 esetében. Összehasonlítva a hypopharynx, a gége és az oropharynx daganatait, ez utóbbi esetén szignifikánsan magasabb CLDN1 expressziót kaptunk. A nyelőcső, a méhnyak és a bőr rosszindulatú daganataihoz hasonlóan[122123124] a HNSCC-k a normál hámnál magasabb CLDN1 expressziót mutattak, míg azokban a rákokban, ahol a daganat a mirigyszövet

komponensből ered (emlő, vastagbél), a CLDN1 eltűnése jellemző.[125,126,127] Ez a megfigyelésünk korrelál Ouban és munkatársai azon eredményével, mely szerint a különböző lokalizációjú hámdaganatok, köztük a HNSCC CLDN1 expressziója a normál hámhoz viszonyítva fokozott mértékű.[117] Dos Reis és munkatársai a szájüregi laphámrákok fokozott CLDN1 expressziója esetén megnövekedett inváziót és agresszív szövettani képet találtak.[118]

Ouban és munkatársai fordított arányosságot találtak a húgy-ivarszervi és a nőgyógyászati régiók laphámrákjai esetén a CLDN1 expresszió és a tumor grade között, ezt azonban a fej-nyak régióban jelen vizsgálatunk során nem tudtuk kimutatni.[117] A mi vizsgálatunk is alátámasztja, hogy a CLDN1, -2 és -7 expressziója független a legtöbb ismert klinikai és patológiai paramétertől, például kortól, nemtől, HPV-státusztól, alkoholfogyasztástól, stádiumbeosztástól és szöveti differenciálódástól.

Egy korábbi vizsgálatban azt találták, hogy HNSCC esetében a CLDN7 csökkent expressziót mutatott. Ezzel szemben saját daganatos anyagunkban a CLDN7 megnövekedett expresszióját tapasztaltuk: Al Moustafa és munkatársai *in silico* vizsgálatot végeztek, melybe mindössze 12, kizárólag szájüregi daganatos mintát vontak be.[93] A mi eredményeink Hewitt és munkatársai megállapításaival állnak összhangban: ők azt mutatták ki, hogy a hasnyálmirigy, húgyhólyag, pajzsmirigy, petevezeték, petefészek, gyomor, vastagbél, emlő, méh és prosztata rosszindulatú daganatainak CLDN7 expressziója emelkedett a normál hámhoz viszonyítva.[128]

Lourenco és munkatársai szájüregi laphámrákok CLDN1, -2, -3, -4, -5, -7 vizsgálatakor azt találták, hogy ezek mintázata erősen összefügg a szövettani grade-del, vagyis a jól differenciált tumorokban ezek expressziója változó mértékben, de emelkedett, míg a kevésbé és rosszul differenciált daganatok esetén nem kimutathatóak. Kimondottan igaz ez a CLDN7-re, amelynek hiánya kedvezőtlen prognózissal társul.[119] Yoshizawa és munkatársai eredményei ezzel korrelálnak, azaz szájüregi laphámrákok esetén a CLDN7 expresszió csökkenése vagy a mintázat eltűnése megnövekedett inváziós és metasztázis készséggel, illetve rosszabb prognózissal jár.[120] Megemelítendő, hogy saját beteganyagunk Spearman-rangkorrelációs vizsgálata mérsékelt, de szignifikáns korrelációt mutatott a CLDN1 és a CLDN7 expressziója között ($R=0,425$, $p<0,05$).

A szövettani hasonlóság miatt érdemes összevetni a méhnyak invazív laphámrákját (CIN) a fej-nyaki laphámrákokkal. Sobel és munkatársai a claudinok expressziós

mintázatát vizsgálták a cervix premalignus és invazív elváltozásaiban: CIN-ben a normál hámhoz viszonyítva megnövekedett a CLDN1, -2, -4 és -7 expressziója, míg invazív karcinómában a stádiummal párhuzamosan fokozatos csökkenést írtak le. A legkifejezettebb változás a CLDN1-re volt jellemző.[87] Ez az eredmény különbözik a vizsgálati megfigyelésünktől, melyek alapján a HNSCC-ben a CLDN1 markáns, a CLDN7 pedig enyhe növekedést mutat, ugyanakkor a CLDN2 expressziója csökkent a normál szövethez képest. Mintáinkban a CLDN4 nagyon gyenge jelet adott normál hámban, laphámrákban pedig gyakorlatilag eltűnt.

Kutatásunk talán legérdekesebb eredménye, hogy ellentétben a CLDN1 és -7 expresszióval, a CLDN2 kifejeződése a tumoros szövetben csökkent, és ez szoros összefüggést mutatott a túléléssel. Kutatócsoportunk elsőként azonosította a CLDN2 prognosztikai szerepét humán daganatokban. Bebizonyítottuk, hogy a CLDN2 kifejeződése inkább a normál hámszövetre jellemző, HNSCC esetén expressziójának megőrzöttsége kedvezőbb túléléssel társul, más szóval csökkent expressziója HNSCC-ben rosszabb prognózist jelenthet (daganatos betegeink független prognosztikai faktorokat vizsgáló többváltozós analízise alapján a klinikai stádium mellett a CLDN2 is független prognosztikai faktornak bizonyult). A CLDN2 negatív prognosztikai szerepét más daganattípusokban is vizsgálták. Kimbung és munkatársai megállapították, hogy emlőtumorban észlelt fokozott expressziója megnöveli a lokális kiújulás és a májáttét kialakulásának esélyét.[129]

Összegezve kijelenthetjük, hogy mintáink CLDN1, -2 és -7 expressziója különbségeket mutatott az ép és a daganatos szövetekben. A normál és tumoros hám közötti expressziós különbségek többnyire függetlenek voltak a lokalizációtól. A normál hámhoz viszonyítva emelkedett CLDN1 és -7, illetve csökkent CLDN2 expressziót találtunk a tumoros mintáinkban. A CLDN2 csökkent expressziója szignifikánsan rosszabb prognózissal társult, ebből következően jelenlétét vagy hiányát ígéretes prognosztikai faktornak tekintjük.

A különféle szervek tumoraiban eltérő módon megjelenő claudinok jó terápiás célpontok lehetnek.[130] Egy ilyen lehetőség például a claudinok extracellularis hurkait felismerő antitestek kifejlesztése és alkalmazása. Mintáinkban a CLDN1 expressziója volt a legkifejezettebb, ezért HNSCC-ben ez jósolható a leghatásosabb terápiás targetnek, míg a CLDN2 alkalmazása inkább prognosztikus markerként merül fel.

Mindazonáltal jelen, retrospektív jellegű tanulmányaink eredményeit klinikai vizsgálatok segítségével szükséges megerősíteni.

DOI:10.14753/SE.2015.1722

6. Következtetések

1. Eredményeink alapján a hazai HNSCC betegpopuláció az EGFR biológiai jellemzőit tekintve nem tér el az európai átlagtól. A hagyományos patológiai paraméterek (tumorok differenciáltsági foka, érbetörés, gyulladásos beszűrődés) szoros korrelációt mutattak a túléléssel. Az EGFR túlzott expressziója daganatos mintáink nagy részében kimutatható volt. Az EGFR fehérje expressziója és aktivitása, a különböző epitópok festődése azonban a különböző lokalizációjú tumorokban, illetve egy tumoron belül is nagyfokú heterogenitást mutatott. Ebből következően ennek diagnosztikai és prognosztikai jelentőséget nem tulajdonítunk.
2. Az EGFR emelkedett kópiaszáma és túlzott expressziója szignifikánsan kedvezőtlenebb túléléssel társult. Szemben az eddigi szakirodalmi adatokkal, saját tumoros mintáink HPV pozitivitása (19,7%) nem társult kedvezőbb túléléssel, ami azzal magyarázható, hogy betegeinknél az anamnesztikus adatok alapján a kémiai és a virális karcinogenezis együtt fordult elő. Daganatos mintáinkban egyátalán nem volt jelen a TK domén mutációja, és a KRAS mutáció is ritkán fordult elő (2,8%). Ezzel szemben a vIII mutáció 21%-os gyakorisága azt sugallja, hogy az anti-EGFR terápiák hatástalanságának hátterében az egyik jelentős tényező az EGFR vIII variánsa lehet. Célszerű lenne ezért a terápiás antitestek alkalmazása előtt az EGFR expresszió mértékének vizsgálatán felül a vIII variáns jelenlétének kimutatása is.
3. A normál és a daganatos hámból származó mintáink egyaránt negatívnak bizonyultak CLDN3, -8, és -10-re. A CLDN1, -2 és -7 expresszió szignifikáns különbséget mutatott a normál és malignus szövetek között, mely többnyire független volt a lokalizációtól, és az általunk vizsgált legtöbb ismert klinikai és patológiai paramétertől. A normál hámhoz viszonyítva a tumoros mintáinkban emelkedett CLDN1 és -7 expressziót mutattunk ki; ennek összefüggése a túléléssel nem volt szignifikáns. A vizsgált daganatokban a CLDN1 expressziója volt a legkifejezettebb, ezért HNSCC-ben ezt jósoljuk potenciálisan leghatásosabb terápiás targetnek.
4. Daganatos mintáinkban a CLDN2 csökkent expressziója szignifikánsan kedvezőtlenebb prognózissal társult, ebből következően jelenlétét vagy hiányát ígéretes prognosztikai faktornak tekintjük.

DOI:10.14753/SE.2015.1722

Munkánk során az alábbi új megállapításokat tettük:

1. Az EGFR fehérje expressziója és aktivitása a különböző lokalizációjú tumorokban kifejezett heterogenitást mutatott, illetve a receptor különböző epitópjainak festődése is eltérő intenzitású volt. Ezen kívül egy tumoron belül is nagyfokú heterogenitást tapasztaltunk.
2. Az EGFR túlzott expressziója (az intracelluláris domént felismerő antitesttel detektálva) szignifikánsan kedvezőtlenebb túléléssel társult az általunk vizsgált betegpopulációban. Kedvező trendet mutatott ugyanakkor a túlélés azoknál a betegeknél, akiknek a tumorában az EGF-receptor aktivitása emelkedett volt (foszfo-EGFR specifikus antitesttel vizsgálva az aktivitást). Ez az eredmény a statisztikai szignifikancia szintjét nem érte el.
3. A vIII mutáció gyakorisága a minták 21%-ban volt kimutatható, melyek többsége a laryngealis régióban fordult elő.
4. A HPV fertőzöttség incidenciája a szájüreg felől a gége felé haladva csökkenő tendenciát mutatott. Az általunk vizsgált populációban a HPV pozitivitás nem társult kedvezőbb túléléssel.
5. A normál és a daganatos hámból származó mintáink egyaránt negatívnak bizonyultak CLDN3, -8, és -10-re.
6. A CLDN1, -2 és -7 expresszió szignifikáns különbséget mutatott a normál és malignus szövetek között, mely expressziós különbségek többnyire függetlenek voltak a lokalizációtól. A normál hámhoz viszonyítva a tumoros mintáinkban emelkedett CLDN1 és -7, illetve csökkent CLDN2 expressziót találtunk.
7. A CLDN2 csökkent expressziója szignifikánsan rosszabb prognózissal társult.

DOI:10.14753/SE.2015.1722

7. Összefoglalás

A HNSCC-k egyik fő jellemzője az EGFR túlzott expressziója, és ennek következtében a receptor-jelpálya fokozott stimulációja, melynek fontos szerepe van a daganat kialakulásában. Az EGF-receptort célzó gyógyszerek több daganat, köztük a HNSCC terápiájában is bevezetésre kerültek, illetve intenzív kutatások tárgyát képezik a mai napig is. Ugyanakkor nem ritka az anti-EGFR terápia hatástalansága, melynek hátterében a receptor, illetve a jelpálya rendellenességei állhatnak. A sejtkapcsoló struktúrákat alkotó fehérjék, köztük a claudinok szerepe a daganatok progressziójában és inváziójában szintén ismert. A claudinok expressziója és ennek megváltozása számos daganattípusban vizsgált, mely az eddigi kutatások alapján jelentős prognosztikai és terápiás potenciállal bírhat.

Munkánk célja az volt, hogy hazai HNSCC beteganyagon feltérképezzük az EGF-receptor epitóp-mintázatát, továbbá megvizsgáljuk az EGFR gén lehetséges hibáit (amplifikáció, vIII-, TK domén mutáció), valamint az EGFR szignalizáció egyik fontos fehérjéjének, a KRAS-nak a mutációját. Közismert, hogy ezek jelentősen befolyásolják a célzott terápia hatásosságát. Megvizsgáltuk ugyanezen daganatok és a szomszédos normál hám claudinexpressziós mintázatát, továbbá kerestük a HPV infekció jelenlétét a tumorokban.Eredményeink alapján a hazai HNSCC betegpopuláció az EGFR biológiai jellemzőit tekintve nem tér el az európai átlagtól. Az EGFR fehérje expressziója és aktivitása a különböző lokalizációjú tumorokban kifejezett heterogenitást mutatott. Az EGFR túlzott expressziója (az intracelluláris domént felismerő antitesttel detektálva) szignifikánsan kedvezőtlenebb túléléssel társult. A TK domén mutációja az általunk vizsgált anyagban nem fordult elő, KRAS mutációt a 71 mintából 2 esetben mutattunk ki. A vIII mutáció 21%-os gyakorisága azt sugallja, hogy az anti-EGFR terápiák hatástalanságának hátterében az egyik jelentős tényező az EGFR vIII variánsa lehet. HPV 19,7%-ban volt kimutatható, a HPV pozitivitás nem társult kedvezőbb túléléssel.

A normál hámhoz viszonyítva a tumoros mintáinkban emelkedett CLDN1 és CLDN7, illetve csökkent CLDN2 expressziót találtunk. Az emelkedett CLDN1 és CLDN7 expresszió összefüggése a túléléssel nem volt szignifikáns. Daganatos mintáinkban a CLDN2 csökkent expressziója szignifikánsan kedvezőtlenebb prognózissal társult, ebből következően jelenlétét vagy hiányát ígéretes prognosztikai faktornak tekintjük.

DOI:10.14753/SE.2015.1722

Summary

One of the key features of HNSCC-s is EGFR overexpression, and as a consequence, increased stimulation of the receptor signalling pathway, which plays an important role in the development of tumours. Medications targeting the EGF-receptor have been introduced in the therapy of several types of cancer including HNSCC, and are still subjects of intense research. However, anti-EGFR therapy is often ineffective most probably due to the abnormalities of the receptor or signalling pathway. The role of proteins forming cell junction structures, including claudins in the role of tumour progression and invasion is also known. The expression of claudin and changes of its expression are well studied in several types of tumours, which could have a significant prognostic and therapeutic potential. The aim of our work was to map the EGF-receptor epitop pattern in the Hungarian HNSCC patient population; to study potential abnormalities of the EGFR gene (amplification, vIII-, TK domain mutation), and to study the mutation of KRAS, one the important proteins of EGFR signalling. These factors are widely known to significantly influence the efficacy of targeted therapy. We examined the claudin expression pattern of the same tumours and of the neighbouring normal epithelium, as well. In addition, we also looked at the presence of HPV infection in the tumours.Based on our results and regarding the biological characteristics of EGFR, the Hungarian HNSCC patient population does not deviate from the European average. EGFR protein expression and activity in tumours with various localization showed expressed heterogeneicity. EGFR overexpression (detected by antibodies that recognize the intracellular domain) was associated with a significantly worse survival. Mutation of the TK domain was not present in the studied population, and we detected KRAS mutation in 2 out of 71 samples. The 21% frequency of the vIII mutation indicates that one major factor contributing to the inefficacy of anti-EGFR therapy could be the vIII variant of the EGFR. HPV could be detected in 19.7% and HPV positivity was not associated with a better survival. As compared to the normal epithelium we found increased CLDN1 and CLDN7, and decreased CLDN2 expression in our tumorous samples. Increased CLDN1 and CLDN7 expression was not significantly associated with survival. In our tumorous samples decreased CLDN2 expression was associated with a significantly worse prognosis, thus we consider its presence or absence as a promising prognostic factor.

8. Irodalomjegyzék

[1]Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012, www.globocan.iarc.fr

[2]http://www.oncol.hu/rakreg/stat/2011 orszagos.pdf

[3]Perrone F, Suardi S, Pastore E, Casieri P, Orsenigo M, Caramuta S, Dagrada G, Losa M, Licitra L, Bossi P, Staurengo S, Oggionni M, Locati L, Cantu G, Squadrelli M, Carbone A, Pierotti MA, Pilotti S. (2006) Molecular and cytogenetic subgroups of oropharyngeal squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res, 12(22): 6643-51.

[4]Goon PK, Stanley MA, Ebmeyer J, Steinstrasser L, Upile T, Jerjes W, Bernal-Sprekelsen-M, Görner-M, Sudhoff HH. (2009) HPV & head and neck cancer: a descriptive update. Head Neck Oncol, 1: 36.

[5]Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. (2005) Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 14(2): 467-75.

[6]Michl P, Pazdera J, Prochazka M, Pink R, Stosova T. (2010) Human papillomavirus in the etiology of head and neck carcinomas. Biomed Pap Med FacUnivPalacky Olomouc Czech Repub, 154(1): 9-12.

[7]Tamás L, Szentkúti G, Pál A, Kásler M, Gaudi I, Szentirmay Z. (2010) Humán papilloma vírusok előfordulása és jelentősége fej-nyaki daganatokban. Fül-Orr-Gégegyógyászat, 56(1): 212-221.

[8]Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. (2008) Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. J Natl Cancer Inst, 100(4): 261-9.

[9]Szentirmay Z, Pólus K, Tamás L, Szentkuti G, Kurcsics J, Csernák E, Tóth E, Kasler M. (2005) Human papillomavirus in head and neck cancer: Molecular biology and clinicopathological correlations. Cancer and Metastasis Reviews, 24: 19-34.

[10]Tímár J, Csuka O, Remenár E, Répássy G, Kásler M. (2005) Progression of head and neck squamous cell cancer. Cancer Metastasis Rev, 24(1): 107-27.

[11]Kopper L, Tímár J, Becságh P, Nagy Zs. Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában 3., Semmelweis Kiadó, Budapest, 2013: 167.

[12]Sundvall M, Karrila A, Nordberg J, Grénman R, Elenius K. (2010) EGFR targeting drugs in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. Expert Opin Emerg Drugs, 15(2): 185-201.

[13]http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site

[14]Zimmermann M, Zouhair A, Azria D, Ozsahin M. (2006) The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. Radiat Oncol, 1: 11.

[15]Mendelsohn J, Baselga J. (2000) The EGF receptor family as targets for cancer therapy. Oncogene, 19: 6550-6565.

[16]Herbst RS. (2004) Review of epidermal growth factor receptor biology. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 59: 21-6.

[17]Andrew J. Dannenberg, Scott M. Lippman, Jason R. Mann, Kotha Subbaramaiahand Raymond N. DuBois. (2005) Cyclooxygenase-2 and Epidermal Growth Factor Receptor:Pharmacologic targets for chemoprevention. J ClinOncol 23: 254-266.

[18]Rogers SJ, Harrington KJ, Rhys-Evans P, O-Charoenrat P, Eccles SA. (2005) Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. Cancer Metastasis Rev, 24(1): 47-69.

[19]Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. (2001) EGFR and cancer prognosis. Eur J Cancer, 37: 9-15.

[20]Sheikh Ali MA, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, Beder LB, Demircan K, Fujii M, Yamanaka N, Shimizu K, Grenman R, Nagai N. (2008) Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Sci, 99(8): 1589-94.

[21]Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, Lang W, Issa JP, Lee JJ, Mao L. (2007) Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. J Clin Oncol, 25(16): 2164-70.

[22]Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, Jarrett C, Carter J, Murphy BA, Netterville J, Burkey BB, Sinard R, Cmelak A, Levy S, Yarbrough WG, Slebos RJ, Hirsch FR. (2006) Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. J Clin Oncol, 24(25): 4170-6.

[23]Rubin Grandis J, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ. (1996) Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factorand epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer, 78: 1284-1292.

[24]Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc Natl Acad Sci USA, 91(16): 7727-31.

[25]Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, Biegel JA, Hayes RL, Wong AJ. (1995) Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. Cancer Res, 55(23): 5536-9.

[26]Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK, Hill ML, Humphrey PA, Kurpad SN, McLendon RE, Moscatello D, Pegram CN, Reist CJ, Traweek ST, Wong AJ, Zalutsky MR, Bigneret DD. (1995) Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. Cancer Res, 55(14): 3140-8.

[27]Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, Freilino ML, Graner MW, Wikstrand CJ, Bigner DD, Gooding WE, Furnari FB, Grandis JR. (2006) Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. Clin Cancer Res, 12(17): 5064-73.

[28]Lemos-Gonzalez Y, Paez de la Cadena M, Rodriguez-Berrocal FJ, Rodriguez-Pineiro AM, Pallas E, Valverde D. (2007) Absence of activating mutations in the EGFR kinase domain in Spanish head and neck cancer patients. Tumour Biol, 28(5): 273-9.

[29]Carlson M, Wuertz B, Lin J, Taylor R, Ondrey F. (2009) Exons 19 and 21 of epidermal growth factor receptor are highly conserved in squamous cell cancer of the head and neck. Int J Otolaryngol, 2009: 649615.

[30]Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam HK, Park WS, Nam SW, Kim MS, Sun DI, Lee YS, Jang JJ, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. (2005) Somatic mutations of EGFR gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. Clin Cancer Res, 11(8): 2879-82.

[31]Ahmad D, Siddiqui, MD, Bilal Piperdi. (2010) KRAS Mutation in Colon Cancer: A Marker of Resistance to EGFR-I Therapy. Ann SurgOncol, 17: 1168–1176.

[32]Tímár J, Láng I. (2008) Az epidermálisnövekedési faktor receptorát célzó terápiák RAS paradoxona vastag- és végbélrákban. Magyar Onkológia, 52: 185–191.

[33]Auner V, Kriegshäuser G, Tong D, Horvat R, Reinthaller A, Mustea A, Zeillinger R. (2009) KRAS mutation analysis in ovarian samples using a highsensitivity biochip assay. BMC Cancer, 9: 111.

[34]Hoa M, Davis SL, Ames SJ, Spanjaard RA. (2002) Amplification of wild-type K-ras promotes growth of head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res, 62(24): 7154-6.

[35]Arteaga CL. (2002) Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? Oncologist, 7 Suppl 4: 31-9.

[36]Scaltriti M, Baselga J. (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. Clin Cancer Res, 12: 5268-72.

[37]Gorgoulis V, Aninos D, Priftis C, Evagelopoulou C, Karameris A, Kanavaros P, Spandidos DA. (1992) Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in thyroid tumors. In Vivo, 6: 291-6.

[38]Cohen DW, Simak R, Fair WR, Melamed J, Scher HI, Cordon-Cardo C. (1994) Expression of transforming growth factor-alpha and the epidermal growth factor receptor in human prostate tissues. J Urol, 152: 2120-4.

[39]Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Pisters PW, Langenfeld J, Dmitrovsky E. (1997) Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. Clin Cancer Res, 3: 515-22.

[40]Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS. (1999) ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. J Biol Chem, 274: 8865-74.

[41]https://www.pharmgkb.org/pathway/PA162356267#tabview=tab0&subtab=

[42]Mendelsohn J. (1997) Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. Clin Cancer Res, 3(12): 2703-7.

[43]Overholser JP, Prewett MC, Hooper AT, Waksal HW, Hicklin DJ. (2000) Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice. Cancer, 89(1):74-82.

[44]Tonini G, Calvieri A, Vincenzi B, Santini D. (2009) First-line targeted therapies in the treatment of metastatic colorectal cancer - role of cetuximab. Onco Targets Ther, 2: 73-82.

[45]Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, Radinsky R, Dinney CP. (1999) Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. Clin Cancer Res, 5(2): 257-65.

[46]Andrés López-Albaitero, Robert L. Ferris. (2007) Immune Activation by Epidermal Growth Factor Receptor–SpecificMonoclonalAntibodyTherapy for Head and Neck Cancer. ArchOtolaryngol Head Neck Surg, 133(12): 1277-1281.

[47]Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. (2006) Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous- Cell Carcinoma of the Head and Neck. N Engl J Med, 354: 567-78.

[48]Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I, De Raucourt D, Bokemeyer C, Schueler A, Amellal N, Hitt R. (2008) Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. N Engl J Med, 359: 1116-27.

[49]Shirai K, O'Brien PE. (2007) Molecular Targets in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. Current Treatment Options in Oncology, 8: 239–251.

[50]Nicholas Lukens J. (2011) A randomized phase III trial (RTOG 0522) of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III-IV head and neck squamous cell carcinomas (HNC). The Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania, http://www.oncolink.org/conferences/article.cfm?id=6653

[51]Astsaturov I, Cohen R.B, Harari P. (2007) EGFR-TargetingMonoclonalAntibodies in Head and Neck Cancer. Current Cancer Drug Targets,7: 650-665.

[52]Gazdar AF. (2009) Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. Oncogene, 28: 24-31.

[53]M.A. Bareschino, C. Schettino, T. Troiani, E. Martinelli, F. Morgillo, F. Ciardiello. (2007) Erlotinib in cancer treatment. Annals of Oncology, 18: 35-41.

[54]Soulieres D, Senzer NN, Vokes EE, Hidalgo M, Agarwala SS, Siu LL. (2004) Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosinekinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamouscell cancer of the head and neck. J Clin Oncol, 22: 77–85.

[55]Cohen EE, Rosen F, Stadler WM. (2003) Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Oncol, 21: 1980–1987.

[56]Stewart JS, Cohen EE, Licitra L, Van Herpen CM, Khorprasert C, Soulieres D, Vodvarka P, Rischin D, Garin AM, Hirsch FR, Varella-Garcia M, Ghiorghiu S, Hargreaves L, Armour A, Speake G, Swaisland A, Vokes EE. (2009) Phase III study of gefitinib compared with intravenous methotrexate for recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Oncol, 27(11): 1864-71.

[57]Wheeler DL, Iida M, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Dunn EF, Armstrong EA, Huang S, Harari PM. (2009) Epidermal growth factor receptor cooperates with Srcfamilykinases in acquired resistance to cetuximab. Cancer Biol Ther, 8(8): 696–703.

[58]Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, Gondi V, Hsu KT, HarariPM. (2008) Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. Oncogene, 27(28): 3944–3956.

[59]Benavente S, Huang S, Armstrong EA, Chi A, Hsu KT, Wheeler DL, Harari PM. (2009) Establishment and Characterization of a Model of Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Targeting Agents in Human Cancer Cells. Clin Cancer Res, 15(5): 1585–1592.

[60]Boerner JL. (2009) Role of Srcfamilykinases in acquiredresistance to EGFR therapies in cancer. CancerBiology Therapy, 8: 704-706.

[61]Koppikar P, Choi SH, Egloff AM, Cai Q, Suzuki S, Freilino M, Nozawa H, Thomas SM, Gooding WE, Siegfried JM, Grandis JR. (2008) Combined Inhibition of c-Src and Epidermal Growth Factor Receptor Abrogates Growth and Invasion of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Clin Cancer Res, 14(13): 4284-91.

[62]Schmitz S, Ang KK, Vermorken J, Haddad R, Suarez C, Wolf GT, Hamoir M, Machiels JP. (2014) Targeted therapies for squamous cell carcinoma of the head and neck: Current knowledge and future directions. Cancer Treat Rev, 40(3): 390-404

[63]Schmieder P. (2007) Molecular and structural pattern of claudin-claudin interactions in tight junctions. (Available from: http://www.fmp-berlin.de/schmieder/research/tight_junctions.htm.)

[64]Anderson JM, Van Itallie CM. (2009) Physiology and function of the tight junction. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 1(2): a002584.

[65]http://semmelweis.hu/biokemia/files/2014/01/HU_kon_SEJTADHEZIO_20110118.pdf

[66]Szeberényi J. Sejtmembrán I.: A lipoprotein membrán szerkezete. Sejt–sejt kapcsolatok. In: Szeberkényi J (szerk.), Molekuláris sejtbiológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest 2011: 241-249

[67]Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. The Journal of cell biology, 141(7): 1539-50.

[68]Nemeth J, Nemeth Z, Tatrai P, Peter I, Somoracz A, Szasz AM, Kiss A, Schaff Z. (2010) High expression of claudin-1 protein in papillary thyroid tumor and its regional lymph node metastasis. Patho Oncol Res : POR, 16(1): 19-27.

[69]Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. (1999) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. J Cell Biol, 147(6): 1351-63.

[70]Lal-Nag M, Morin PJ. (2009) The claudins. Genome biology, 10(8): 235.

[71]Lei Ding, Zhe Lu Qun, LuYan-Hua Chen. (2013) The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective. Cancer Management and Research, 5: 367–375.

[72]Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. PNAS, 96(2): 511-6.

[73]Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR. (2008) Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. Lab Invest, 88(10): 1110-20.

[74]Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatziioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. Nature, 446(7137): 801-5.

[75]Gonzalez-Mariscal L, Lechuga S, Garay E. (2007) Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. Progress in histochemistry and cytochemistry, 42(1): 1-57.

[76]Soini Y, Tommola S, Helin H, Martikainen P. (2006) Claudins 1, 3, 4 and 5 in gastric carcinoma, loss of claudin expression associates with the diffuse subtype. Virchows Archiv, 448(1): 52-8.

[77]Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, Sukumar S. (2004) Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. Am J Pathol,164(5): 1627-33.

[78]Michikawa H, Fujita-Yoshigaki J, Sugiya H. (2008) Enhancement of barrier function by overexpression of claudin-4 in tight junctions of submandibular gland cells. Cell Tissue Res, 334(2): 255-64.

[79]Borka K, Kaliszky P, Szabo E, Lotz G, Kupcsulik P, Schaff Z, Kiss A. (2007) Claudin expression in pancreatic endocrine tumors as compared with ductal adenocarcinomas. Virchows Archiv, 450(5): 549-57.

[80]Lodi C, Szabo E, Holczbauer A, Batmunkh E, Szijarto A, Kupcsulik P, Kovalszky I, Paku S, Illyes G, Kiss A, Schaff Z. (2006) Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas. Modern Pathology, 19(3): 460-9.

[81]Landers KA, Samaratunga H, Teng L, Buck M, Burger MJ, Scells B, Lavin MF, Gardiner RA. (2008) Identification of claudin-4 as a marker highly overexpressed in both primary and metastatic prostate cancer. Brit J Cancer, 99(3): 491-501.

[82]Agarwal R, D'Souza T, Morin PJ. (2005) Claudin-3 and claudin-4 expression in ovarian epithelial cells enhances invasion and is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity. Cancer Research, 65(16): 7378-85.

[83]Findley MK, Koval M. (2009) Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. IUBMB life, 61(4): 431-7.

[84]Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. J Cell Biol, 147(1): 185-94.

[85]Lippoldt A, Liebner S, Andbjer B, Kalbacher H, Wolburg H, Haller H, Fuxe K. (2000) Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell tight junctions and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C. Neuroreport, 11(7): 1427-31.

[86]Sullivan LM, Yankovich T, Le P, Martinez D, Santi M, Biegel JA, Pawel BR, Judkins AR. (2012) Claudin-6 is a nonspecific marker for malignant rhabdoid and other pediatric tumors. Am J Surg Pathol, 36(1): 73-80.

[87]Sobel G, Paska C, Szabo I, Kiss A, Kadar A, Schaff Z. (2005) Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. Human pathology, 36(2): 162-9.

[88]Sobel G, Nemeth J, Kiss A, Lotz G, Szabo I, Udvarhelyi N, Schaff Z, Paska C. (2006) Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. Gynecol oncol, 103(2): 591-8.

[89]Shrestha A, McClane BA. (2013) Human claudin-8 and -14 are receptors capable of conveying the cytotoxic effects of Clostridium perfringens enterotoxin. mBio, 4(1).

[90]Kim SS, Choi YD, Jin XM, Cho YM, Jang JJ, Juhng SW, Choi C. (2009) Immunohistochemical stain for cytokeratin 7, S100A1 and claudin 8 is valuable in differential diagnosis of chromophobe renal cell carcinoma from renal oncocytoma. Histopathology, 54(5): 633-5.

[91]Prat A1, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. (2010) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. Breast Cancer Res, 12(5): R68. doi: 10.1186/bcr2635. Epub 2010 Sep 2.

[92]Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. (2005) Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. ModPathol, 18(4): 511–518.

[93]Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, Hernandez-Perez M, Serruya C, Alpert L, Black MJ, Sladek R, Foulkes WD. (2002) Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. Oncogene, 21(17): 2634–2640.

[94]LuZ, DingL, HongH, HoggardJ, LuQ, ChenYH. (2011) Claudin-7inhibits human lung cancer cell migration and invasion through ERK/MAPK signaling pathway. Exp Cell Res, 317(13): 1935–1946.

[95]Walsh SV, Hopkins AM, Nusrat A. (2000) Modulation of tight junction structure and function by cytokines. Adv Drug Deliv Rev, 41(3): 303–313.

[96]Shen L, Weber CR, Turner JR. (2008) The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. J Cell Biol,181(4): 683-95.

[97]Szekely E, Torzsok P, Riesz P, Korompay A, Fintha A, Szekely T, Lotz G, Nyirady P, Romics I, Timar J, Schaff Z, Kiss A. (2011) Expression of claudins and their prognostic significance in noninvasive urothelial neoplasms of the human urinary bladder. J Histochem and Cytochem, 59(10): 932-41.

[98]McCarty KS, Jr., Szabo E, Flowers JL, Cox EB, Leight GS, Miller L, Konrath J, Soper JT, Budwit DA, Creasman WT, Seigier FH, S. McCarty KS. (1986) Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. Cancer Research, 46(8 Suppl): 4244s-8s.

[99]Nawa A, Nishiyama Y, Kikkawa F, Kawai M, Mano H, Goto S, Suganuma N, Tomoda Y, Nakashima N. (1993) Detection of human papillomaviruses from histologically normal lymph nodes of Japanese cervical cancer patients by nested polymerase chain-reaction assay. Int J Cancer, 53(6): 932-7.

[100]Guntinas-Lichius O, Wendt T, Buentzel J, Esser D, Lochner P, Mueller A, Schultze-Mosgau S, Altendorf-Hofmann A. (2010) Head and neck cancer in Germany: a site-specific analysis of survival of the Thuringian cancer registration database. Journal of cancer research and clinical oncology, 136(1): 55-63.

[101]Bozec A, Peyrade F, Fischel JL, Milano G. (2009) Emerging molecular targeted therapies in the treatment of head and neck cancer. Expert Opin Emerg Drugs, 14(2): 299-310.

[102]Gupta R, Dastane AM, Forozan F, Riley-Portuguez A, Chung F, Lopategui J, Marchevsky AM. (2009) Evaluation of EGFR abnormalities in patients with pulmonary adenocarcinoma: the need to test neoplasms with more than one method. Mod Pathol, 22(1): 128-33.

[103]Rosell R, Taron M, Reguart N, Isla D, Moran T. (2006) Epidermal growth factor receptor activation: how exon 19 and 21 mutations changed our understanding of the pathway. Clin Cancer Res, 12(24): 7222-31.

[104]Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liau LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukhim R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS. (2005) Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. N Engl J Med, 353(19): 2012-24.

[105]Saridaki Z, Georgoulias V, Souglakos J. (2010) Mechanisms of resistance to anti-EGFR monoclonal antibody treatment in metastatic colorectal cancer. World J Gastroenterol, 16(10): 1177-87.

[106]Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, Drenning SD, Tweardy DJ. (1998) Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. J Natl Cancer Inst, 90(11): 824-32.

[107]Hama T, Yuza Y, Saito Y, J Ou, Kondo S, Okabe M, Yamada H, Kato T, Moriyama H, Kurihara S, Urashima M. (2009) Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma. Oncologist, 14(9): 900-8.

[108]Endoh H, Ishibashi Y, Yamaki E, Yoshida T, Yajima T, Kimura H, Kosaka T, Onozato R, Tanaka S, Mitsudomi T, Kuwano H. (2009) Immunohistochemical analysis of phosphorylated epidermal growth factor receptor might provide a surrogate marker of EGFR mutation. Lung Cancer, 63(2): 241-6.

[109]Harris TJ, McCormick F. (2010) The molecular pathology of cancer. Nat Rev Clin Oncol, 7(5): 251-65.

[110]Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. (2008) Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. J Natl Cancer Inst, 100(4): 261-9.

[111]Szentirmay Z, Polus K, Tamas L, Szentkuti G, Kurcsics J, Csernak E, Tóth E, Kásler M. (2005) Human papillomavirus in head and neck cancer: molecular biology and clinicopathological correlations. Cancer Metastasis Rev, 24(1): 19-34.

[112]Yang X, Zhang X, Mortenson ED, Radkevich-Brown O, Wang Y, Fu YX. (2013) Cetuximab-mediated tumor regression depends on innate and adaptive immune responses. Molecular Therapy, 21(1): 91-100.

[113]Smith JJ, Deane NG, Dhawan P, Beauchamp RD. (2008) Regulation of metastasis in colorectal adenocarcinoma: a collision between development and tumor biology. Surgery, 144(3): 353-66.

[114]Szasz AM, Nemeth Z, Gyorffy B, Micsinai M, Krenacs T, Baranyai Z, Harsanyi L, Kiss A, Schaff Z, Tokes AM, Kulka J. (2011) Identification of a claudin-4 and E-cadherin score to predict prognosis in breast cancer. Cancer science, 102(12): 2248-54.

[115]Morita K, Tsukita S, Miyachi Y. (2004) Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. The British journal of dermatology, 151(2): 328-34.

[116]Shi M1, Wang Z, Song L, Wang D, Sun Z. (2014) Low expression of claudin-4: an indicator of recurrence in esophageal squamous cell carcinoma after Ivor Lewis esophagectomy? Med Oncol, 31(5): 951. doi: 10.1007/s12032-014-0951-2. Epub 2014 Apr 16.

[117]Ouban A, Hamdan H, Hakam A, Ahmed AA. (2012) Claudin-1 expression in squamous cell carcinomas of different organs: comparative study of cancerous tissues and normal controls. International journal of surgical pathology, 20(2): 132-8.

[118]Dos Reis PP1, Bharadwaj RR, Machado J, Macmillan C, Pintilie M, Sukhai MA, Perez-Ordonez B, Gullane P, Irish J, Kamel-Reid S. (2008) Claudin 1 overexpression increases invasion and is associated with aggressive histological features in oral squamous cell carcinoma. Cancer, 113(11): 3169-80. doi: 10.1002/cncr.23934.

[119]Lourenço SV1, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Pereira CM, Carvalho AL, Kowalski LP, Soares FA. (2010) Oral squamous cell carcinoma: status of tight junction claudins in the different histopathological patterns and relationship with clinical parameters. A tissue-microarray-based study of 136 cases. J Clin Pathol, 63(7): 609-14. doi: 10.1136/jcp.2009.070409.

[120]Yoshizawa K1, Nozaki S, Kato A, Hirai M, Yanase M, Yoshimoto T, Kimura I, Sugiura S, Okamune A, Kitahara H, Noguchi N, Kato K, Ueki K, Kawashiri S. (2013) Loss of claudin-7 is a negative prognostic factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. Oncol Rep, 29(2): 445-50. doi: 10.3892/or.2012.2161. Epub 2012 Nov 30.

[121]Neesse A, Griesmann H, Gress TM, Michl P. (2012) Claudin-4 as therapeutic target in cancer. Archives of Bioche and Biophys, 524(1): 64-70.

[122]Morita K, Tsukita S, Miyachi Y. (2004) Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. The British journal of dermatology, 151(2): 328-34.

[123]Gyorffy H, Holczbauer A, Nagy P, Szabo Z, Kupcsulik P, Paska C, Papp J, Schaff Z, Kiss A. (2005) Claudin expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma. Virchows Archiv : an international journal of pathology, 447(6): 961-8.

[124]Miyamoto K, Kusumi T, Sato F, Kawasaki H, Shibata S, Ohashi M, Hakamada K, Sasaki M, Kijima H. (2008) Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in esophageal squamous cell carcinoma. Biomedical research, 29(2): 71-6.

[125]Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, Szilak L, Kiss A, Bogi K, Schaff Z. (2005) Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. Breast Cancer Research : BCR, 7(2): R296-305.

[126]Kramer F, White K, Kubbies M, Swisshelm K, Weber BH. (2000) Genomic organization of claudin-1 and its assessment in hereditary and sporadic breast cancer. Human Genetics, 107(3): 249-56.

[127]Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. (2005) Claudin-1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. Modern Pathology, 18(4): 511-8.

[128]Hewitt KJ1, Agarwal R, Morin PJ. (2006) The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. BMC Cancer, 6:186.

[129]Kimbung, S, Kovacs A, Bendahl PO, Malmstrom O, Ferno M, Hatschek T, Hedenfalk I. (2014) Claudin-2 is an independent negative prognostic factor in breast cancer and specifically predicts early liver recurrences. Mol Oncol, 8(1): 119-28

[130]Kominsky SL. (2006) Claudins: emerging targets for cancer therapy. Expert Rev Mol Med, 8: 1-11.

DOI:10.14753/SE.2015.1722

9. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Szabó B, Nelhűbel GA, Kárpáti A, Kenessey I, Jóri B, Székely Cs, Peták I, Lotz G, Hegedűs Z, Hegedűs B, Füle T, Döme B, Tímár J, Tóvári J. (2011) Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. Oral Oncol, 47:(6) pp. 487-496.
IF: 2.857

Nelhűbel GA, Károly B, Szabó B, Lotz G, Kiss A, Tóvari J, Kenessey I. (2014)
The Prognostic Role of Claudins in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. Pathol Oncol Res, 20(1)**:** 99-106.
IF: 1.555

DOI:10.14753/SE.2015.1722

10. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Tóvári Józsefnek a közel hét éve tartó folyamatos támogatásáért, bíztatásáért, a sok segítségért és tanácsért, valamint a munkacsoportunkban dolgozó korábbi TDK hallgatóinknak, Dr. Nelhűbel Györgyinek, Dr. Kárpáti Adélnak és Dr. Károly Borókának.

Köszönöm az Országos Onkológiai Intézet Tumorprogressziós Osztályának, Kísérletes Farmakológiai Osztályának illetve a II. sz. Patológiai Intézetnek a lehetőséget és a kísérleteink elvégzéséhez szükséges feltételek megteremtését, dolgozóinak, különösen Parragné Derecskei Katalinnak és Kalocsáné Piurkó Violettának a labormunkában nyújtott segítséget. Külön köszönet illeti Dr. Kenessey Istvánt, aki a statisztikai elemzések kiértékelésében és szakmai kérdésekben volt segítségemre.

Köszönet illeti a következő munkatársakat az egyes vizsgálatokban nyújott munkájukért: Dr. Lotz Gábor a FISH analízisért, Dr. Jóri Balázs és Dr. Székely Csilla (KPS Kft) a HRM analízisért, Dr. Füle Tibor a HPV kimutatásért, Dr. Hegedűs Balázs és Dr. Hegedűs Zita az RFLP vizsgálatért, Dr. Kiss András a claudin vizsgálatért.

Hálás vagyok Dr. Tamás Lászlónak, Prof. Dr. Répássy Gábornak, Prof. Dr. Tímár Józsefnek és Prof. Dr. Kásler Miklósnak, hogy lehetővé tették munkámat az általuk vezetett intézetekben.

Köszönöm feleségemnek a dolgozat átnézése során tett hasznos észrevételeit és az angol fordításban nyújtott segítségét, neki és lányaimnak a sok éves támogatást és a mérhetetlen türelmüket. Végezetül, de nem utolsó sorban hálával tartozom édesanyámnak és édesapámnak.

A dolgozatomat édesapám, Dr. Szabó Iván emlékének ajánlom.