

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

3076.

GURBI BIANKA

A gyógyszerészeti tudományok korszerű kutatási irányai
című program

Programvezető: Dr. Antal István, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Csala Miklós, egyetemi tanár

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

Doktori értekezés

Gurbi Bianka

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Csala Miklós, DSc., tanszékvezető egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Krencz Ildikó, Ph.D., klinikai szakorvos
Dr. Bencsik Norbert, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

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

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

Dr. Tóvári József, Ph.D., osztályvezető

Budapest
2025

Tartalomjegyzék

1. Rövidítésjegyzék	4
2. Bevezetés – Irodalmi háttér	8
2.1. Rosszindulatú daganatok	9
2.1.1. A rosszindulatú daganatok biológiai jellemzői	11
2.1.2. A rosszindulatú daganatok genetikai és epigenetikai jellemzői	12
2.1.3. A rosszindulatú daganatok kezelése	14
2.1.4. A daganatok kemorezisztenciájának leggyakoribb mechanizmusai	15
2.1.4.1. A taxánrezisztencia leggyakoribb mechanizmusai	16
2.2. Fej-nyaki tumorok	16
2.2.1. Fej-nyaki tumorok kialakulásában szerepet játszó faktorok.....	17
2.2.1.1. Környezeti tényezők	17
2.2.1.2. Molekuláris tényezők	20
2.2.2. Prognosztikai markerek fej-nyaki tumorokban	21
2.2.2.1. Az epidermális növekedési faktor receptorcsalád	21
2.2.2.2. A connexin 43.....	23
2.2.3. Fej-nyaki tumorok kezelése.....	24
2.2.3.1. Kemoterápia és prediktív markerei fej-nyaki tumorokban.....	24
2.2.3.2. Lehetséges terápiás célpontok fej-nyaki tumorokban	25
3. Célkitűzések	28
4. Anyagok és módszerek.....	29
4.1. <i>In vitro</i> módszerek	29
4.1.1. Alkalmazott sejtvonalak	29
4.1.2. Alkalmazott kezelőszerek.....	29
4.1.3. Géncsendesítés (siRNS-transzfekció)	30
4.1.4. Fehérjetútermeltetés (plazmidtranszfekció)	31

4.1.5. A sejtek életképességének vizsgálata MTT méréssel.....	31
4.1.6. Gyógyszerszinergizmus vizsgálata Compusyn segítségével.....	32
4.1.7. A sejtek életképességének vizsgálata tripánkékkizárásos sejtszámolással...	33
4.1.8. Apoptózis vizsgálata fluoreszcens áramlási citometriával	34
4.1.9. Fehérjeexpresszió és -foszforiláció vizsgálata Western blottal.....	35
4.1.10. Fehérjeexpresszió és -lokalizáció vizsgálata fluoreszcens immuncitokémiával	38
4.2. Szövettani mintákon alkalmazott módszerek	39
4.2.1. Felhasznált minták.....	39
4.2.2. Szöveti mikrochip (TMA-blokk) készítése	40
4.2.3. Fehérjeexpresszió értékelése manuális immunhisztokémiával	40
4.2.4. Fehérjeexpresszió értékelése gépi immunhisztokémiával.....	42
4.2.5. Statisztikai analízis	43
5. Eredmények.....	44
5.1. Tumorprogressziós markerek vizsgálata fej-nyaki tumorokban	44
5.1.1. Paclitaxel hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére	44
5.1.2. Paclitaxel által indukált apoptózis fej-nyaki tumorsejtvonalakban	45
5.1.3. Cx43- és Bcl-2-expresszió fej-nyaki tumorsejtvonalakban.....	46
5.1.4. A Cx43-szint csökkentésének és növelésének hatása a fehérjeexpresszióra fej- nyaki tumorsejtvonalakban.....	48
5.1.5. A Cx43-expresszió csökkentésének hatása a paclitaxelérzékenységre fej- nyaki tumorsejtvonalakban.....	50
5.1.6. A Cx43-expresszió növelésének hatása a paclitaxelérzékenységre FaDu sejtvonalban.....	54
5.1.7. Cx43- és Bcl-2-expresszió fej-nyaki tumoros betegekből származó szövettani mintákon	56
5.2. Potenciális terápiás célpontok azonosítása fej-nyaki tumorokban	58

5.2.1. EGFR-gátlók hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére	58
5.2.2. MEK-gátlók hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére.....	58
5.2.3. EGFR- és MEK-gátlók kombinációjának hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére	62
5.2.4. Fehérjeexpresszió és -foszforiláció fej-nyaki tumorsejtvonalakban	62
5.2.5. MEK-gátlás hatása a fehérjefoszforilációra fej-nyaki tumorsejtvonalakban	64
5.2.6. Az EGFR expressziója és a pY1068-EGFR mennyisége fej-nyaki tumoros betegekből származó szövettani mintákon	65
6. Megbeszélés	67
7. Következtetések.....	79
8. Összefoglalás	80
9. Summary.....	81
10. Irodalomjegyzék	82
11. Saját publikációk jegyzéke	100
13. Köszönetnyilvánítás	102

1. Rövidítésjegyzék

ABC	ATP-kötő kazetta transzporter
Akt	PKB = protein kinase B – protein kináz B
Ann	Annexin V-FLUOS
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
Bak	Bcl-2 homologous antagonist – Bcl-2 homológ antagonista
Bax	Bcl-2 associated x protein – Bcl-2 asszociált x fehérje
Bcl-2	B-cell lymphoma-2 – B-sejtes limfóma-2
BCL2	Bcl-2 fehérjét kódoló gén
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large – B-sejtes limfóma-extra nagy
BRCA1	breast cancer gene 1 – emlőrákra hajlamosító gén 1
BRAF	B-Raf fehérjét kódoló gén
CCND1	ciklin-D1 fehérjét kódoló gén
CDK4	cyclin-dependent kinase 4 – ciklinfüggő kináz 4
CDK6	cyclin-dependent kinase 6 – ciklinfüggő kináz 6
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A – ciklin-függő kináz inhibitor 2A; p16 ^{INK4A} fehérjét kódoló gén
CI	kombinációs index
c-Met	HGFR = hepatocyte growth factor receptor – hepatocita növekedési faktor receptor
Cx43	connexin 43
DAB	diamino-benzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM:F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12
DRAQ5	1,5-bis{[2-(dimetilamino)etil]amino}-4,8-dihidroxiantracén-9,10-dion
DTT	ditiotritol
E2F	E2F transzkripció faktor
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGFR	epidermal growth factor receptor – epidermális növekedési faktor receptor
EGFR	EGFR fehérjét kódoló gén
EGTA	etilénglikol-tetraecetsav

EMA	European Medicines Agency – Európai Gyógyszerügynökség
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
EMT	epithelial-mesenchymal transition – epiteliális-mezenchimális átmenet
EBV	Epstein-Barr-vírus
ERCC1	excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit
ERK	extracellular signal-regulated kinase – extracelluláris szignál által szabályozott kináz vagy MAPK = mitogen-activated protein kinase – mitogén aktivált protein kináz
FACS	fluorescence-activated cell sorting – fluoreszcensen aktivált sejtek szétválasztása (áramlási citometriás módszer)
FBS	fetal bovine serum – magzati borjúsérum
FDA	U.S. Food and Drug Administration – Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala
FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded – formalinnal fixált, paraffinba ágyazott
FOS	Fos fehérjét kódoló gén
GEPIA	Gene Expression Profiling Interactive Analysis
GFP	green fluorescent protein – zölden fluoreszkáló fehérje
GJA1	gap junction protein alpha-1 – a connexin 43 fehérjét kódoló gén
HER-2	human epidermal growth factor receptor 2 – humán epidermális növekedési faktor receptor 2
HER-3	human epidermal growth factor receptor 3 – humán epidermális növekedési faktor receptor 3
HER-4	human epidermal growth factor receptor 4 – humán epidermális növekedési faktor receptor 4
HIF1α	hypoxia-inducible factor 1 α – hipoxiaindukálható faktor 1 α
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma – fej-nyaki laphámrák
HPV	human papillomavirus – humán papillomavírus
HRAS	H-Ras fehérjét kódoló gén
IC₅₀	half maximal inhibitory concentration – 50%-os gátló hatást okozó koncentráció
JUN	Jun transzkripciós faktor fehérjét kódoló gén

<i>KRAS</i>	K-Ras fehérjét kódoló gén
LB	Laemmli-puffer
mAb	monoclonal antibody – monoklonális ellenanyag
Mcl-1	myeloid cell leukemia 1 – mieloid sejtes leukémia 1
MDR	ABC-transzporter fehérjét kódoló (multidrogrezisztencia) gén
MEK	MAP2K = mitogen-activated protein kinase kinase – mitogén aktivált protein kináz kináz
<i>MET</i>	c-Met fehérjét kódoló gén
<i>MLH1</i>	MutL homológ 1 fehérjét kódoló gén
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid
<i>MYC</i>	Myc fehérjét kódoló gén
NF-κB	nukleáris faktor-kappa B
NGS	újgenerációs szekvenálás
NOTCH	neurogenic locus notch homolog protein
NP-40	nonil-fenoxi-polietoxi-etanol
PBS	foszfátpufferelt sóoldat
PD-1	programmed death 1 – programozott sejthalál 1 receptor
PDL-1	programmed death-ligand 1 – programozott halálligand 1
PLCγ	phospholipase C gamma – foszfolipáz C gamma
PI	propídium-jodid
PI3K	phosphoinositide 3-kinases – foszfatidil-inozitol-3-kináz
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha – foszfatidil-inozitol-3-kináz katalitikus alegysége
<i>PIK3CA</i>	PIK3CA fehérjét kódoló gén
pRb	retinoblastoma protein – retinoblasztóma fehérje
PVDF	polivinilidén-difluorid
Raf	MAP3K = mitogen-activated protein kinase kinase kinase – mitogén aktivált protein kináz kináz kináz
Ras	rat sarcoma protein
<i>RB1</i>	pRb fehérjét kódoló gén
SCC	squamous cell carcinoma – laphámrák

SDS	sodium dodecyl sulfate – nátrium-lauril-szulfát
siRNS	small/short interfering RNA, silencing RNA – kis interferáló RNS
<i>SMAD4</i>	SMAD4 fehérjét kódoló gén
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBST	Tris-buffered saline with Tween® 20 – Tris-pufferelt sóoldat Tween 20-szal
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMA	Tissue Microarray – szöveti mikrochip
TNM	tumor, node, metastasis – tumor, regionális nyirokcsomó, távoli metasztázis
<i>TP53</i>	p53 fehérjét kódoló gén
TPF	docetaxel, cisplatin és 5-fluorouracil
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometán
VEGFR	vascular endothelial growth factor – vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor

2. Bevezetés – Irodalmi háttér

Az emberi szervezet több milliárd összehangoltan működő sejtből áll, és a közöttük kialakult együttműködés alapja a kommunikáció. Ha ez a bonyolult rendszer valahol hibát szenved, akkor betegség alakul ki. Az emberi test ilyen, máig számos rejtéllyel övezett, magas halálozással járó megbetegedése a rák [1].

Daganatos elváltozások gyakorlatilag bármely sejtből kialakulhatnak, és ezek molekuláris háttere még azonos szöveti eredet esetén is jelentősen eltérhet. Napjainkban a daganatkutatások a daganatellenes molekuláris célpontok keresésére, olyan célzott terápiák kidolgozására koncentrálnak, amelyek a hagyományos kemoterápiával szemben nem a szerkezetet, hanem a zavart okozó molekuláris hibákat támadják. A célzott terápia azért is jelentős, mert megalapozza a személyre szabott gyógyítást, vagyis a páciens tumortípusának, molekuláris hátterének megfelelő kezelés kidolgozását [2].

A daganatot kiváltó okok és a megfelelő kezelőszerek megtalálásához modellekre van szükség. Gyakran alkalmazott modellek a betegekből származó minták és a daganatos sejtvonalak. A betegekből származó tumorszövetek jól tükrözik az egyes daganattípusok tulajdonságait, és a fenntartott sejtvonalakkal ellentétben egy éppen aktuális, a tumor előrehaladottságának megfelelő állapotot mutatnak. Sok ilyen minta vizsgálatával adott tumortípusra általános megállapításokat tehetünk. Azonban ezek az egyedi szövetminták nem alkalmasak gyógyszerek fejlesztésére, tesztelésére. Ehhez stabil, jól karakterizált modellekre van szükség, és ezen elvárásnak a daganatos sejtvonalak tudnak megfelelni. Leginkább ezek elemzésével találhatunk új terápiás lehetőségeket [3].

Az utóbbi években változást figyelhetünk meg a klinikai vizsgálatok tervezésében. A szövettani besoroláson alapuló kutatások mellett egyre elterjedtebbek a molekuláris marker alapú, genotípushoz illesztett klinikai vizsgálatok. Ezek a vizsgálatok már a molekuláris háttér (mutációk, expressziós mintázat) alapján gyűjtik össze a betegeket egy-egy daganatellenes kezelőszert tesztelésére. A genotípushoz illesztett klinikai vizsgálatokról kimutatták, hogy az ezekben részt vevő betegek túlélése szignifikánsan kedvezőbb, mint a hagyományos alapon besorolt társaiké. A lokalizáción, szövettanon alapuló besorolás továbbra is a klinikai vizsgálatok fontos részét képezi, ugyanakkor a prognosztikus (azaz a betegség előrehaladását mutató és a diagnózis szempontjából hasznos) és prediktív (vagyis az adott kezelés hatékonyságát előre jelző) markerek meghatározásához biomarker alapú kutatásra van szükség [4].

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

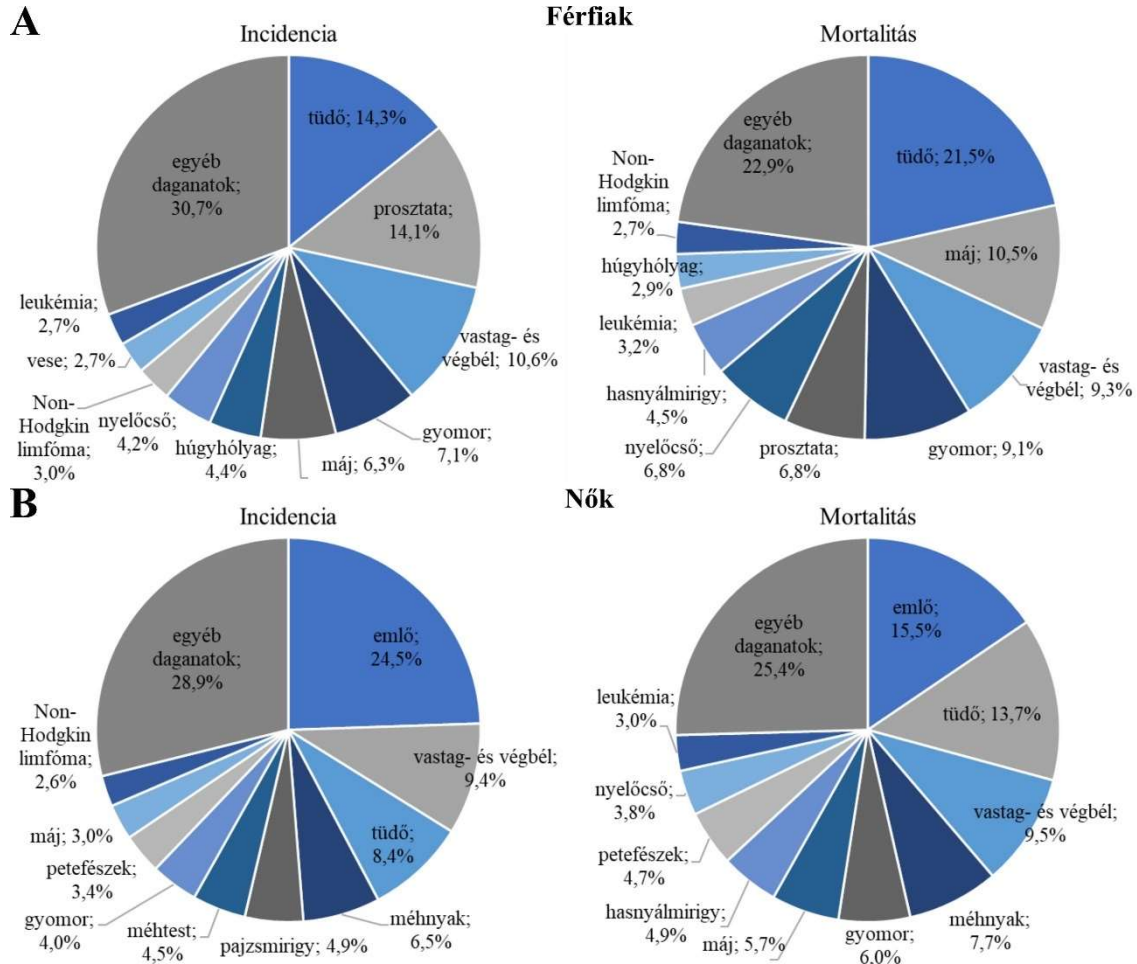
2.1. Rosszindulatú daganatok

A tumor (daganat, neoplázia) egy szervezet valamely megváltozott sejtjeinek agresszív burjánzásából kialakuló szövetszaporulat. A daganat növekedése már nem feltétlenül függ a szabályozó mechanizmusoktól és a kiváltó tényezőktől. A tumoros betegségeknek a várható klinikai viselkedés szerint két csoportja van: a jóindulatú (benignus) és a rosszindulatú (malignus) daganatok – utóbbit nevezik a köznyelvben ráknak. A benignus tumor expanszív növekedéssel lokalizált marad, és rendszerint sebészi úton eltávolítható. A beteg életét, hacsak nincs rendkívül kedvezőtlen helyen, általában nem fenyegeti. A malignus tumor ezzel szemben infiltratív növekedése miatt a szomszédos és távoli struktúrákra is áttérjedhet (invázió, metasztázisképzés), és minden esetben veszélyezteti a beteg életét. A rosszindulatú daganatoknak két nagy csoportját különböztetjük meg: a karcinómák a hámszövetekből, míg a szarkómák a kötőszövetekből indulnak ki [1].

A világon egyre többen szenvednek daganatos betegségben, és ezzel együtt a halálozás is folyamatosan nő. A legfrissebb globális adatok szerint 2020-ban 19,3 millió új megbetegedést jelentettek, és 10 millió ember halt meg tumor következtében. Az előrejelzések szerint 2040-re 28,4 millióra fog nőni az új megbetegedések száma világszinten [5]. E növekedés hátterében állhat, hogy a fejlett társadalmakban demográfiai eltolódás figyelhető meg: a 65 év feletti populáció aránya jelentősen növekszik. Az életkor előrehaladtával pedig lényegesen nagyobb arányban fordulnak elő daganatos betegségek. A lakosság elöregedése mellett, a fejlődő országok népességének rohamos növekedése is hozzájárul a daganatos esetek számának gyarapodásához. A demográfiai változásoktól független, környezeti tényezők hatásának erősödése, például a kémiai karcinogének mennyiségének növekedése is hozzátesz az új daganatos megbetegedések számának folyamatos emelkedéséhez [6, 7].

Az 1. ábra a tíz leggyakoribb tumortípust mutatja az incidencia és a mortalitás tekintetében férfiakra és nőkre külön lebontva. A férfiak körében a leggyakoribb daganattípusok a tüdő-, a prosztata-, a vastag- és végbél-, a gyomor- és a májtumороk. Ehhez képest a halálozásért legnagyobb mértékben felelős daganatok a tüdő-, a máj-, a vastag- és végbél-, a gyomor- és a prosztatatumороk. A nők esetében a leggyakoribb

daganattípusok az emlő-, a vastag- és végbél-, a tüdő-, a méhnyak- és a pajzsmirigy-tumörök. A halálozásért leginkább felelős daganatok viszont az emlő-, a tüdő-, a vastag- és végbél-, a méhnyak- és a gyomortumörök [5].



1. ábra: A tíz leggyakoribb tumortípus incidencia és mortalitás tekintetében (A) férfiaknál és (B) nőknél. A kördiagram területe az új esetek vagy a halálos esetek számának arányát tükrözi [5]

Magyarországon a daganatos betegek lakossághoz viszonyított aránya meghaladja a világszámot, és hazánk a mortalitás tekintetében is rossz helyen szerepel, ugyanis az Európai Unióban itt a legmagasabb a halálozási arány. 2020-ban közel 67 000 új esetet regisztráltak és közel 33 000 halálos eset történt. A magyar férfiak körében a prosztata-, a tüdő-, a vastag- és végbél-, a húgyhólyag- és a vesetumörök fordulnak elő a leggyakrabban, míg a legmagasabb mortalitással járó daganattípusok a tüdő-, a vastag- és végbél-, a prosztata-, az ajak- és szájüreg- és a hasnyálmirigy-tumörök. A magyar nők esetében a legnagyobb incidenciája az emlő-, a tüdő-, a vastag- és végbél-, a méhtest- és

a hasnyálmirigy-tumoroknak van, míg a legmagasabb halálozási aránnyal járó daganatok a tüdő-, az emlő-, a vastag- és végbél-, a hasnyálmirigy-, valamint a nyirok- és vérképzőrendszeri tumorok. A tüdő- és a húgyhólyagdaganatok gyakorisága Magyarországon a nők körében kiemelkedően magas, az országspecifikus ráta világszinten itt a legrosszabb. A vastag- és végbéltumorok a vizsgált országok közül Magyarországon és Norvégiában a leggyakoribbak [5, 8].

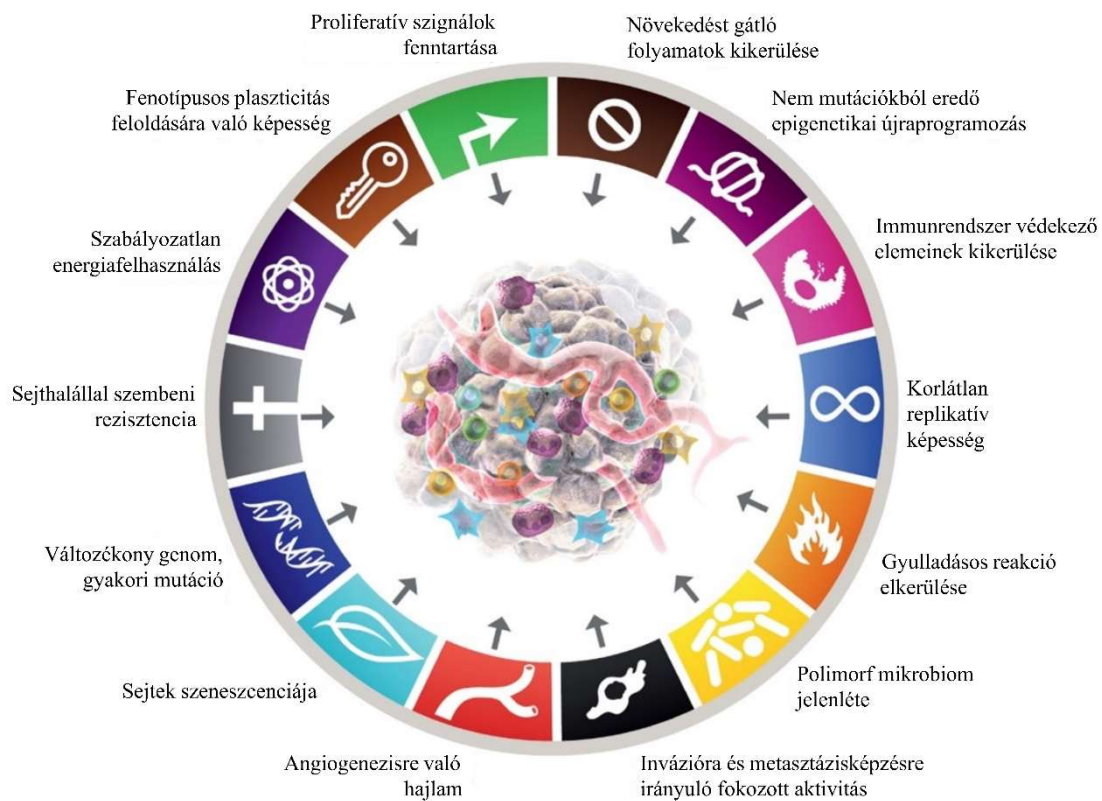
2.1.1. A rosszindulatú daganatok biológiai jellemzői

A XX. század végéig hat olyan biológiai tulajdonságot azonosítottak, amelyek szerepet játszanak a malignus daganatok kialakulásában. Ezek a proliferatív szignálok fenntartása külső jel megszűnése ellenére, a növekedést gátló folyamatok kikerülése, a sejthalállal szembeni rezisztencia kialakulása, a korlátlan replikatív képesség, az angiogenezisre való hajlam, valamint az invázióra és a metasztázisképzésre irányuló fokozott aktivitás. Az elsőként megjelenő tulajdonság rendszerint a növekedést gátló folyamatok kikerülése és a gyors szaporodás, amelyek általában a jelátviteli útvonalak hibájából eredeztethetők. A felsorolt hat tulajdonság megjelenésének sorrendje ugyan változatos, de a rosszindulatú daganatokban végül valamennyi megfigyelhető lesz [9].

A 2000-es évek elején megfigyeltek további két tulajdonságot, amelyekkel gyakran rendelkeznek a rákos sejtek. Ezek egyike a szabályozatlan energiafelhasználás, a másik pedig az immunrendszer védekező elemeinek kikerülése. Azonosítottak továbbá két jellegzetes „előnyt”, amellyel a daganatok az egészséges sejtekkel szemben rendelkeznek, egyrészt a genomjuk változékonyság, gyakori a mutáció, másrészt nem váltanak ki gyulladásos reakciót a szervezetben [10].

Az utóbbi évek eredményei rávilágítottak a tumorokkal kapcsolatos négy további alapvető tulajdonságra, illetve számukra előnyt biztosító tényezőre. Ezek a fenotípusos plaszticitás feloldására való képesség, a nem mutációkból eredő epigenetikai újraprogramozás, a polimorf mikrobiom jelenléte és a sejtek szeneszcenciája [11].

A 2. ábrán együtt szereplő tulajdonságok és előnyök, amelyekre kialakulásuk során a tumorsejtek szert tesznek, mind fontos szegmensei a jelenleg folyó kutatásoknak. Valamennyi terület jobb megismerésére, a folyamatok működésének részletes feltárására van szükség ahhoz, hogy a daganatos betegségek kialakulását megelőzzük, vagy épp eredményesen kezelni tudjuk a tumoros pácienseket.



2. ábra: Rosszindulatú daganatok kialakulásában szerepet játszó biológiai tulajdonságok és a tumorsejtek számára előnyt biztosító tényezők [11]

2.1.2. A rosszindulatú daganatok genetikai és epigenetikai jellemzői

Számos genetikai és epigenetikai változás jellemző a daganatos betegségek progressziójára, amelyek egyben identifikálják is az adott tumort. A génexpressziós profilalkotás, az újgenerációs szekvenálás (NGS) és számos egyéb nagy áteresztőképességű technológia kifejlesztése lehetővé tette a különféle daganatok részletes és átfogó molekuláris jellemzését, ezáltal genetikai és epigenetikai sajátosságuk pontos meghatározását [12].

A szabályozás alatt álló, elsősorban a sejtek túlélését, növekedését és szaporodását elősegítő fehérjéket protoonkogéneknek, illetve -géntermékeknek hívjuk. Ha ezek valamilyen módon, a termelés vagy a szabályozás hibája miatt túlműködnek, akkor onkogénekké, illetve -géntermékekké válnak. A humán daganatokban számos onkogént írtak már le, előfordulásuk és gyakoriságuk daganattípusonként eltérő. A protoonkogénekben fellépő génhibák, funkciónyerő mutációk támogatják a sejt túlélését és proliferációját, csökkentik a differenciálódási készséget. A növekedést és proliferációt

gátló fehérjék ezzel szemben tumorszupresszorok. A tumorszupresszor gének elsősorban azáltal töltnek be daganatgátló funkciót, hogy öröködnék a genetikai információ állandósága felett és szükség esetén akadályozzák a sejtosztódást vagy akár elősegítik a programozott sejthalált. Daganatképződéshez tehát a tumorszupresszor gének funkcióvesztő mutációi vezethetnek [13].

A rákos sejtek DNS-szekvenciája számos eltérést mutat a normál sejtekhez képest. Ezek a változások – a pontmutációk mellett – kisebb-nagyobb fragmensek szubsztitúcióját, inszercióját vagy delécióját, illetve nagyobb szakaszok amplifikációját és átrendeződését is jelenthetik. Ezek közül néhánynak szerepe van a daganatok kialakulásában, progressziójában, a malignus fenotípus egyes elemeinek létrejöttében, míg mások csak kísérő aberrációként jelennek meg. Azokat a szomatikus mutációkat, amelyek növekedési előnyt biztosítanak a daganatos sejteknek és pozitív szelekciót tesznek lehetővé a tumorfejlődés során, „driver mutációknak” nevezzük. Azokat a géneket pedig, amelyek ilyen elváltozást hordoznak, így kulcsszerepet játszanak a daganat kialakulásában és progressziójában, „driver géneknek” hívjuk. A legtöbb tumorban több driver mutáció is megfigyelhető, emlő-, vastagbél- és prosztata tumorokban például jellemzően 5-7 driver mutáció fordul elő, hematológiai daganatokban ennél általában kevesebb. Számos daganattípus jellemző driver génjei a *TP53*, az *RBI*, az *EGFR* és a *KRAS* mutáns változatai [14, 15].

A daganatképződés során a szűkebb értelemben vett genetikai elváltozások mellett gyakori a nukleotidok és a hisztonok kémiai módosulása (DNS-metiláció, hisztonok poszttranszlációs modifikációi) is. Ezek az epigenetikai módosulások függetlenek az elsődleges DNS-szekvencia megváltozásától, azonban a tumorsejtekben ily módon kialakult epigenom döntő szerepet játszik a gének kifejeződésének szabályozásában. A hisztonkód változása jellemző a daganatsejtekre: a H3 és a H2 hisztonok kitüntetett helyen történő foszforilációja például serkenti a *MYC*, a *JUN* és a *FOS* protoonkogének expresszióját. A tumorszupresszor gének, mint a *CDKN2A* (ciklin-dependens kináz inhibitor 2A), az *MLH1* (MutL homológ 1) és a *BRCA1* (breast cancer 1) CpG szigeteinek hipermetilációja is gyakori jelenség daganatokban, amely a tumorszupresszorok transzkripciójának gátlásához vezet, ezáltal elősegítve a tumorprogressziót [12].

2.1.3. A rosszindulatú daganatok kezelése

Az emberi szervezetben nagyon sok különbözőféle tumor rengeteg módon alakulhat ki, ami nagyon megnehezíti ezek gyógyítását. A kezelések elsődleges célja a beteg sejtek eliminálása a test egészéből, azonban előrehaladott stádiumban lévő pácienseknél ez nem mindig lehetséges, és ilyenkor inkább a betegek panaszmentes életének meghosszabbítása válik fontossá.

Régóta és a mai napig gyakran alkalmazott hagyományos eljárás a tumorok sebészi úton való eltávolítása. Ezt a módszert különösen korai felismerés esetén, míg előrehaladott betegségeknél más terápiákkal kombinálva alkalmazzák a szervezet tehermentesítése érdekében (palliatív terápia). A hagyományos daganatterápiás lehetőségek közé tartozik a sugárkezelés (sugárterápia, radioterápia). Ennek során nagy energiájú, radioaktív sugárzást vagy sugárzó részecskéket alkalmaznak a tumorsejtek elpusztítására. Szintén gyakran alkalmazott, klasszikus módszer a kemoterápia, amely a rákos sejtek gyógyszeres elpusztítását jelenti. A kemoterápia előnye, hogy az előrehaladott stádiumban a szervezetben szóródó tumorsejteket is elpusztítja, így lehetőséget ad a metasztázisok (áttétek) kialakulásának megelőzésére. A radio- és a kemoterápia az egészséges sejteket is károsítja, ezért csak akkor használják ezeket, ha a várható eredmény meghaladja a mellékhatásokkal járó hátrányokat [3].

Napjainkban számos új lehetőség adódik a tumoros betegségek kezelésében, ilyen a hormonterápia, az őssejt- és csontvelőtranszplantáció, a fotodinámiás terápia, a célzott terápia vagy az immunterápia. Célzott (targeted) terápiáról akkor beszélünk, amikor tumorspecifikus molekuláris célpontok ellen készült daganatellenes szereket alkalmazunk, amelyek a rákos sejtműködés szabályozási zavaraira, a molekuláris hibákra vannak elsősorban hatással. Ezzel magyarázható, hogy a célzott terápia elvileg csak a daganatos sejtekre hat, az egészséges szöveteket nem vagy kevésbé érinti az ilyen gyógyszerek hatása. Mechanizmusuk nagyon sokféle, függ a daganat típusától, illetve az adott molekuláris hiba jellegétől. A daganatos betegek ellátásában az egyik legdinamikusabban fejlődő terület az immunterápia, melynek célja az immunrendszer megerősítése, hogy képes legyen felismerni és elpusztítani a daganatsejteket. Ez az eljárás tehát nem közvetlenül a daganatra, hanem az immunrendszer működésére hat. Bizonyos immunterápiás anyagok egyben célzott gyógyszerek is (pl. pembrolizumab, nivolumab) [2, 16-18].

Mind a klasszikus, mind az újabb terápiás lehetőségeket önmagukban és kombinálva is alkalmazzák az adott helyzettől függően. A korai szűrésnek és a terápiák fejlődésének köszönhetően a betegek kilátásai jelentősen javultak az utóbbi években, a legtöbb terápia azonban előbb-utóbb hatástalanná válik a kialakuló rezisztencia miatt. A terápiarezisztencia valamennyi ráktípusban, az összes ismert gyógyszerrel szemben kialakulhat, és ennek okai legalább olyan komplexek, mint amennyire összetett az a folyamat, amely a tumorsejt kialakulásához vezet [19].

2.1.4. A daganatok kemorezisztenciájának leggyakoribb mechanizmusai

A gyógyszerrezisztencia leküzdése nagy kihívást jelent a rákos betegek kezelésében, mivel megjelenése a tumor kiújulását vagy tovább terjedését eredményezi. A terápiával szembeni rezisztencia kialakulására számos lehetőség van, melyek közül kiemelhető egyes transzporterek, onkogének, tumorszupresszorok, az epiteliális-mezenchimális átmenet (EMT) és bizonyos DNS-hibajavítási mechanizmusok szerepe [20].

Az ABC-transzporterek (ATP-kötő kazetta transzporterek) olyan transzmembrán fehérjék, amelyek nagyszámú, változatos típusú molekula membránokon való átjutását teszik lehetővé. Az ABC-transzporterek szerepét a kemorezisztencia kialakulásában sok daganattípus (pl. emlő-, prosztata-, tüdőtumor) és sokféle kezelőszer (pl. cisplatin, paclitaxel) esetén leírták már. Ennek molekuláris magyarázata, hogy az *MDR* (multidrogrezisztencia) génekről átíródó fehérjék efflux pumpa aktivitásuk révén képesek a sejtek intracelluláris hatóanyagkoncentrációját nagy mértékben csökkenteni [21-23].

Az onkogének közül az EGFR-nek, az Akt-nak, az ERK-nek és az NF- κ B-nek van kitüntetett szerepe a kemorezisztencia kialakulásában. Az EGFR génjének mutációja és a fehérje túltermelődése tüdő- és petefészekdaganatokban docetaxellel és 5-fluorouracillal szembeni rezisztenciát okoz az Akt, az ERK és az NF- κ B útvonalak aktiválása révén [24, 25]. Az Akt hiperaktivitása a Bad apoptotikus fehérje foszforilálása révén gátolja az apoptózist és aktiválja az NF- κ B-t, amely hozzájárul a cisplatinnal szembeni rezisztencia kialakulásához tüdő- és petefészekdaganatokban [26]. Az ERK túlműködése is hozzájárul a rezisztencia kialakításához, és ezt többnyire a *RAS* géneket érintő mutációk váltják ki. Petefészekdaganatokban a *HRAS* mutáció ilyen mechanizmussal okozhat cisplatinnal szembeni rezisztenciát [27]. Az aktivált NF- κ B serkenti többek között a Bcl-2, a survivin és az Akt transzkripcióját, így hozzájárulva a cisplatinnal szembeni rezisztencia kialakulásához például húgyhólyagrákban [28]. A tumorszupresszorok közül a p53

funkcióvesztésének van szerepe a cisplatinnal szembeni rezisztencia kialakulásában tüdődaganatok esetén [29].

Az epiteliális-mezenchimális átmenet (EMT) ismert jelenség a daganatokban. A mezenchimális fenotípusúvá alakuló tumorok agresszívabbak, motilitásuk fokozódik, és ennek következtében nő az áttétképző képességük, így rosszabb prognózissal társulnak. Az EMT prosztatatumorokban hozzájárul a docetaxellel szembeni rezisztencia kialakulásához [30].

A DNS-hibajavításban részt vevő fehérjék közül az ERCC1-nek (excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit) van jelentős szerepe a rezisztencia kialakulásában. Melanómában kimutatták, hogy az ERCC1 túltermelődése növeli a cisplatinnal szembeni rezisztenciát [31].

2.1.4.1. A taxánrezisztencia leggyakoribb mechanizmusai

A taxánapalapú kemoterápiás szerekkel szemben, mint a paclitaxel és a docetaxel, sokféle módon alakulhat ki rezisztencia. A taxánlebontó enzimek közül kiemelkednek a citokróm P450 monooxygenázok 3A és 2C alcsaládjai, így érthető, hogy ezek magas expressziója és emelkedett aktivitása taxánrezisztencia megjelenését eredményezheti [32]. A kemorezisztencia kialakulásának leggyakoribb okozói, az ABC-transzporterek fontos szerepet játszanak a taxánrezisztenciában is, melynek legjellemzőbb kiváltója a P-glikoprotein túltermelődése [33]. A taxánok a tubulinhoz kapcsolódva fejtik ki hatásukat, és a különböző tubulin-izoformákhoz eltérő erősséggel kötődnek. Ha a sejtekben olyan izoforma válik dominánssá, amely iránt a taxánok kis affinitással rendelkeznek, akkor szintén rezisztencia alakulhat ki. Ugyanezt a hatást váltják ki a tubulin génjében bekövetkező mutációk, amelyek megváltoztatják a fehérje térszerkezetét [34]. A taxánrezisztencia kialakulásában továbbá szerepet játszhat a HIF1 α és az antiapoptotikus multidomén Bcl-2 fehérjék (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) hibás működése, illetve bizonyos nem kódoló RNS-ek jelenléte is [34].

2.2. Fej-nyaki tumorok

A fej-nyaki tumorok a kulcscsont és a koponyaalap között elhelyezkedő területről (az orrüreg, az orrmelléküregek, a nyálmirigyek, a szájüreg, a garat és a gége) kiinduló daganatok. A fej-nyaki tumorok 90%-a laphámrák (squamous cell carcinoma, SCC). A fej-nyaki laphámrák (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) gyűjtőfogalom, amely magába foglalja a szájüreg, a garat, a gége, az orr- és orrmelléküregek, valamint a

nyálmirigyek ilyen típusú megbetegedéseit. A fej-nyaki tumorok említésekor általánosan a laphám típusú daganatokra gondolunk. A fej-nyaki tumorok lokalizáció alapú megkülönböztetése a mai napig fontos, mivel eredetük szerint igen eltérően viselkednek. A tumor kiindulási helyén kívül a daganat malignitásának, prognózisának és a kezelési protokoll meghatározásának döntő tényezői a stádium, a TNM (tumor, regionális nyirokcsomó, távoli metasztázis) státusz és a hisztológiai differenciáltsági fok (grade) [2, 35]. Bár az elmúlt években világszinten csökkent e tumorok incidenciája, és mortalitás tekintetében is kiszorultak a tíz leggyakoribb tumortípusból, Magyarországon a férfiak körében továbbra is a hatodik leggyakoribb daganatos betegségcsoport, amely negyedik helyen szerepel a halálozást tekintve [5, 8].

2.2.1. Fej-nyaki tumorok kialakulásában szerepet játszó faktorok

Sokáig úgy vélték, hogy a fej-nyaki tumorok kialakulásában a fő kockázatot az alkoholfogyasztás és a dohányzás jelenti. Mára beigazolódott, hogy e két kiváltó tényező mellett a human papillomavírus (HPV) is jelentős kockázati tényező, amely a méhnyakrák mellett a fej-nyaki tumorok közel felében járul hozzá a daganatos elváltozáshoz. A HPV-pozitív daganatok viselkedése jelentősen eltér a HPV-negatív daganatokétól, ezért megkülönböztetésük minden esetben lényeges. A HPV-negatív tumorok esetén az elváltozás kialakulását a jelátviteli útvonalakban fontos fehérjék valamelyikét kódoló gén mutációja vagy amplifikációja okozhatja. A fej-nyaki tumorokban legtöbbször előfordul ilyen elváltozások a p16^{INK4A}, a ciklin D1, a PIK3CA (foszfatidil-inozitol-3-kináz katalitikus alegysége), a c-Met (hepatocita növekedési faktor receptor) és a p53 génjeiben jelentkeznek. Azonban nem minden elváltozásnak van patológiai vagy klinikai jelentősége. A genom elváltozásai mellett, és gyakran attól függetlenül, okoznak problémát a transzkriptomban és a proteomban jelentkező eltérések is [36-38].

2.2.1.1. Környezeti tényezők

A **dohányzás**, mint etiológiai tényező szerepe régóta ismert a daganatok patogenezisében. A dohányfüstben számos karcinogén ágens található, amelyek a daganatképződésben szerepet játszó jelátviteli útvonalak közül többet is aktiválnak. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a fej-nyaki tumorok kialakulása és a dohányzás között is fennállnak ezek az összefüggések [39, 40]. Az **alkoholfogyasztás** gyakran a dohányzással együttesen fennálló jelenség a daganat kialakulása során, azonban az

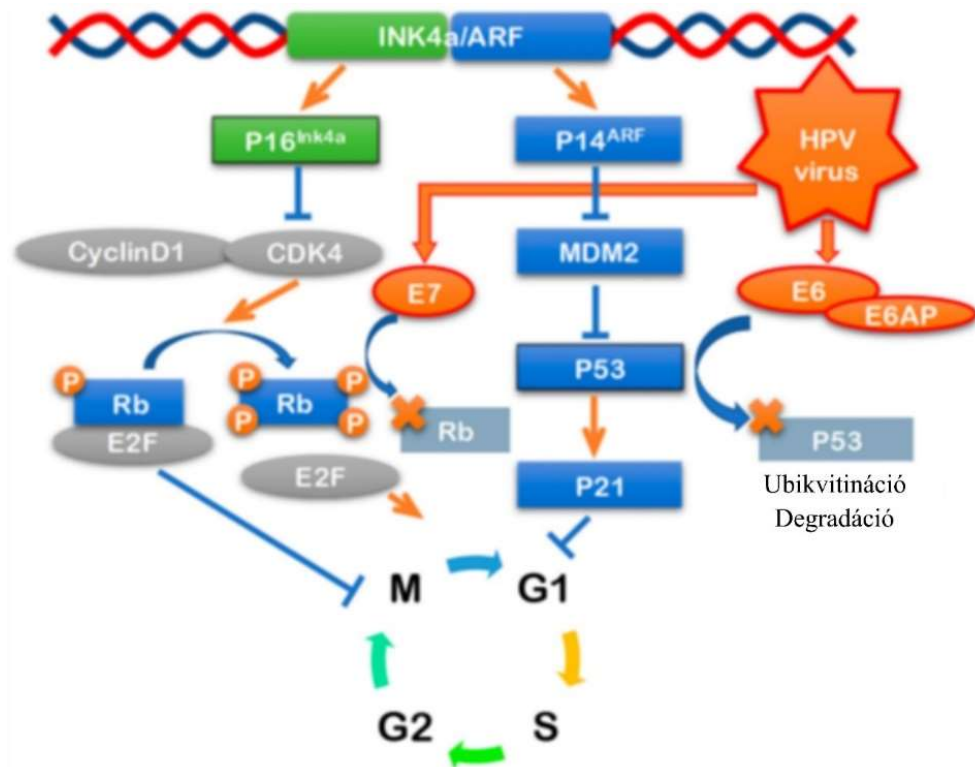
alkoholfogyasztás már önmagában is megnöveli a fej-nyaki rákok kialakulásának esélyét [41]. Mind a dohányzás, mind az alkoholfogyasztás daganatképző hatása a megfelelő életmóddal kiküszöbölhető lenne.

A **HPV** a világ egyik legelterjedtebb, szexuális és nem szexuális úton egyaránt terjedő vírusa, amely a bőrön és a nyálkahártyákon okoz elváltozásokat. A duplaszálú DNS-sel rendelkező humán papillomavírusok csoportja közel 200 ismert vírust foglal magába, azonban ezek közül csak néhány törzs (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 és 82) tartozik a magas rákrisikójú kategóriába, és a HPV-pozitív fej-nyaki daganatok 90%-ában a víruscsalád HPV 16 tagja fordul elő. A vírusinfekció többnyire a szájgaratban lokalizálódik [36].

A *CDKN2A* gén két fehérjét, a p14^{ARF}-et és a p16^{INK4A}-t kódol. A p14^{ARF} részt vesz a p53 tumorszupresszor fehérje aktiválásában, míg a p16^{INK4A} a ciklin-D1 és ciklin-függő kináz 4/6 (CDK4/6) komplexet gátolja, így a pRb (retinoblasztóma fehérje) gátló hiperfoszforilációjának gátlásával még a restrikciós pont előtt megállítja a sejtciklust. A HPV transzformáló géntermékei, amelyek a sejt malignus transzformálásához vezetnek, az E6 és az E7 fehérjék. A vírus E6 fehérjéje a gazdasejt endogén p53 fehérjéjének poliubikvitinálódását és proteasomális lebontását segíti elő a hozzá kapcsolt ubikvitin-ligáz által. Ez számos mechanizmus révén csökkenti az apoptóziskészséget és (elsősorban a p21 fehérje hiánya által) deregulálja a sejtciklust. Ezzel párhuzamosan a vírus E7 fehérjéje a pRb gátlásával fejt ki transzformáló hatását. A pRb gátlása a sejtciklus első elkötelező lépésének megtételét, vagyis a restrikciós pont átlépését serkenti, ugyanis ennek kulcslépése az E2F transzkripció faktor felszabadulása a pRb moduláló hatása alól (3. ábra). Számos gén között a p16^{INK4A} tumorszupresszor kifejeződése is a pRb-E2F komplex szabályozása alatt áll: a pRb-E2F komplex gátolja, a szabad E2F pedig serkenti a p16^{INK4A} expresszióját. Végeredményben a pRb inaktivációja a p16^{INK4A} fokozott expressziójához vezet [42, 43].

A HPV jelenléte a betegek túlélését és a kezelésekre adott választ egyaránt befolyásolja, ezért a HPV státusz meghatározása a diagnosztikai eljárás fontos részét képezi. A HPV kimutatásának gyakori módja a vírus DNS-ének PCR-rel való sokszorosítása megfelelő primerekkel. Ezen kívül a p16^{INK4A} overexpressziója szignifikáns összefüggést mutat a HPV jelenlétével, így alacsony költsége miatt a p16^{INK4A} detektálását (*in situ* hibridizáció, immunhisztokémia) is gyakran alkalmazzák a HPV jelenlétének igazolására [37].

A HPV-infekció és ennél fogva a szájgarati régió rákos megbetegedése szignifikánsan összefügg a szexuális partnerek számával. A mára sok országban kötelezővé tett HPV elleni oltások megelőzik a HPV-infekciót, és az ezzel összefüggő méhnyakrák mellett a szájgarati daganatok előfordulásának csökkenéséhez is vezetnek. A HPV-indukálta daganatok megelőzését elősegítené, ha a nők mellett a férfiak számára is kötelezővé tennék a HPV elleni védőoltást [44, 45].



3. ábra: A HPV által befolyásolt és tumorképződésben jelentős szerepet betöltő jelátviteli útvonalak. A vírus E6 génje a p53, míg E7 génje a pRb működését gátolja [42]

A HPV mellett az **Epstein-Barr-vírus (EBV)** infekció is vezethet fej-nyaki tumorok kialakulásához. Az EBV különösen a nazofaringealis karcinómák esetén jellemző kiváltó tényező, és az ilyen megbetegedés Ázsia délkeleti részén gyakori. Az EBV a herpesz vírusok családjába tartozik, amely elsősorban a B-sejteket és a hámsejteket képes megfertőzni. A termelt vírusfehérjék onkogenezist váltanak ki, gátolják az apoptózist, fokozzák a genom instabilitását, valamint kontrollálatlan sejtosztódást és migrációt váltanak ki [46].

2.2.1.2. Molekuláris tényezők

Az előző pontban is említett **p16^{INK4A}** tumorszupresszor protein alapvető feladata a sejtciklus szabályozása a pRb útvonal gátlásán keresztül. A p16^{INK4A} fehérje HPV-indukálta daganatokban mindig emelkedett mennyiségben van jelen, de HPV-negatív tumorokban is túltermelődhet. Vagyis a p16^{INK4A} túltermelése nem feltétlenül jelzi HPV jelenlétét. A p16^{INK4A} fehérje szintje ugyan hatással van a klinikai prognózisra, a túltermelés oka azonban ebből a szempontból nem lényeges, így az alkalmazandó terápia kiválasztását sem befolyásolja. A p16^{INK4A} fehérjét kódoló gén, a *CDKN2A* inaktiváló mutációja a fej-nyaki tumorok 15-20%-ban fordul elő, és ez jellemzően a dohányzók körében vezet daganatképződéshez [37, 47, 48].

A **ciklin-D1** egy sejtciklusszabályozó elem, túltermelése rövidebb G1 fázist, és ezáltal felgyorsult proliferációt eredményez. A ciklin-D1-et kódoló *CCND1* gén mutációja a HNSCC-k 40%-ban fordul elő. Ezzel szemben a ciklin-D1 túltermelődése a fej-nyaki daganatok 75%-ára jellemző, de ennek klinikai relevanciája még vitatott [49-51].

A **PI3K** (foszfatidil-inozitol-3-kináz) egy katalitikus és egy szabályozó alegységből felépülő fehérje. A katalitikus P110 α (PIK3CA) alegységet a *PIK3CA* gén kódolja. Számos jelátviteli útvonal aktiválásában részt vesz, ezáltal szerepe van a sejtek proliferációjának, adhéziójának, túlélésének és motilitásának szabályozásában. Egyik legfontosabb feladata az Akt protein aktiválása. A *PIK3CA* mutációja a HNSCC-k 5-15%-ában fordul elő [52, 53].

A **c-Met** tirozin-kináz receptor fehérjét a *MET* gén kódolja. Számos jelátviteli útvonal (pl. MEK/ERK, PI3K/Akt, STAT, NOTCH) aktiválása révén szinte valamennyi, a sejt működése szempontjából fontos funkció szabályozásában részt vesz. A c-Met génjének mutációja és a fehérje túltermelése sokféle daganatban jellemző. A fej-nyaki tumorok nagyjából 5%-a *MET*-mutáns és kb. 70%-a túlermelíti a fehérjét [54, 55].

Daganatokban gyakran szenved mutációt a *TP53* gén, amely a **p53** fehérjét kódolja. A p53 fehérje elsőszámú tumorszupresszor fehérje, amely kiemelt szerepet játszik a sejtkárosodások tovább örökítésének megakadályozásában, ugyanis a sejtciklus gátlása, a programozott sejthalál elősegítése, valamint az antioxidáns védekezés fokozása és a vaszkularizáció akadályozása mellett a DNS-hibajavító mechanizmusok aktiválásában is közreműködik. A fej-nyaki rákokban az esetek több mint 80%-ában fordul elő valamilyen elváltozása [56, 57].

2.2.2. Prognosztikai markerek fej-nyaki tumorokban

A HPV, a c-Met, a PIK3CA és a p53 mellett, hogy szerepet játszanak a fej-nyaki tumorok kialakulásában, prognosztikai markerek is egyben.

A HPV-státusz prognosztikai szerepe fej-nyaki daganatokban a szakirodalomban igen ellentmondásos. Egyes klinikai vizsgálatok kedvezőbb túlélést mutattak ki HPV-pozitív tumorral rendelkező betegek esetében [58], míg mások nem találtak hasonló összefüggést [59]. A szájgarati régióban viszont, ahol a leggyakoribb a HPV infekció, egyértelműen jobb túlélést mutatnak a HPV-pozitív esetek [60].

A c-Met esetén mind a gén mutációja, mind pedig a fehérje túltermelődése összefüggést mutat a progresszióval. Mutáció jelenlétében és a fehérje túltermelődése esetén egyaránt rosszabb a páciensek túlélési esélye [61].

A PIK3CA gén mutációja vagy a fehérje túltermelődése a sejtekben egyértelmű összefüggést mutat a betegek túlélésével. Ezen elváltozások megléte esetén a betegek túlélése rosszabb, mint azok hiányában [62].

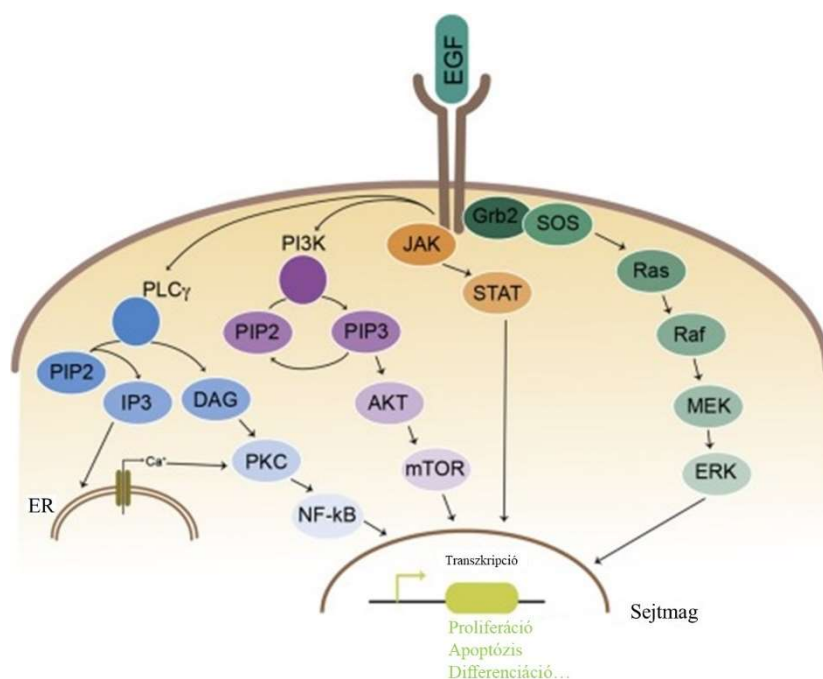
A p53 szerepe mint prognosztikai marker sem teljesen egyértelmű. Soland és munkatársai összefoglaló cikkükben 11 tanulmányból 6 esetben találtak összefüggést a p53-expresszió és a túlélés között, míg további 5 esetben ezt a kapcsolatot nem sikerült igazolni. Azokban a tanulmányokban, amelyekben szignifikáns összefüggést tártak fel, a p53 fokozott expressziója minden esetben rosszabb kimenetellel járt. Ennek egyik oka lehet, hogy a tumorsejtekben a túltermelődött p53 fehérje többnyire abnormális aktivitást vagy funkcionális sérülést mutat [63].

2.2.2.1. Az epidermális növekedési faktor receptorcsalád

Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) család a tirozin-kináz receptorok csoportjába tartozik. A PI3K/Akt, MEK/ERK, a PLC γ és a STAT jeltávíteli útvonalak aktiválásán keresztül szerepe van a sejtek proliferációjában, túlélésében, migrációjában és differenciációjában (4. ábra). A családba négy fehérje (EGFR, HER-2, HER-3 és HER-4) tartozik, amelyek a plazmamembránba vannak ágyazva. Ligandkötés hatására az EGFR család tagjai hetero- vagy homodimert képeznek. A HER-2 fehérjéhez nem képes ligand kötődni, dimerizáció révén tirozin-autofoszforilációval válik aktívvá. A HER-3 nem rendelkezik önálló tirozin-kináz aktivitással, de transzfoszforilációra képes, vagyis csak heterodimer formájában aktiválja a jelátviteli útvonalakat. A különböző dimerek eltérő enzimeket képesek aktiválni a ligandtól és a foszforilációs helytől függően [64].

Az EGFR hat autofoszforilációs hellyel rendelkezik (Y992, Y1045, Y1068, Y1086, Y1148 és Y1173), amelyek közül a Y1068, Y1148 és Y1173 a jelentősebbek [65] és az Y1068 vesz részt leggyakrabban a MEK/ERK útvonal aktiválásában [66].

Az EGFR-t a fej-nyaki tumorok kb. 90%-a termeli túl. Az EGFR család fehérjéit kódoló gének közül az EGFR és a HER-2 amplifikációja fordul elő – jellemzően HPV-negatív – fej-nyaki tumorokban [37]. Számos korábbi vizsgálat igazolta, hogy az EGFR magas szintje szignifikánsan rosszabb túlélést eredményez HNSCC-kben [67], míg más kutatások során ezt az összefüggést nem sikerült igazolni [68, 69].

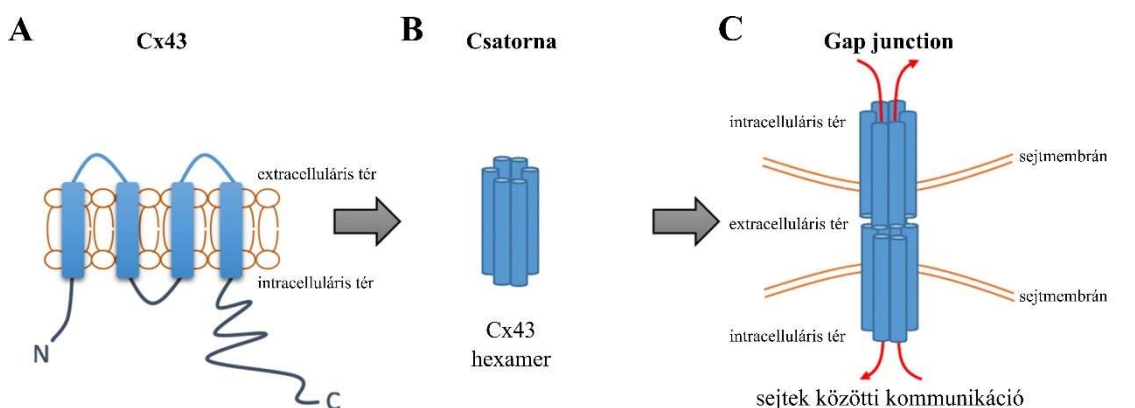


4. ábra: Az EGFR-család által aktivált jelátviteli útvonalak: a PLC γ , a PI3K/Akt, a STAT és a MEK/ERK útvonal [70]

A fehérjecsalád másik három tagja is fontos marker lehet fej-nyaki daganatos betegségek esetén. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a HER-2 és a HER-3 fehérjék overexpressziója vagy a gégeik amplifikációja önmagában is összefüggésben van a betegek túlélésével. Erősebb összefüggést kaptak, ha a két fehérje együttes fokozott jelenlétét vagy a gének szimultán amplifikációját vizsgálták. Ezekben az esetekben volt a legrosszabb a betegek túlélése. A HER-4-gyel kapcsolatban nem mutattak ki ilyen jellegű összefüggést, amelynek egyik oka lehet, hogy viszonylag kis mennyiségben termelődik ezekben a tumorokban [71].

2.2.2.2. A connexin 43

A connexin 43 (Cx43) a connexinek családjába tartozó fehérje, amely sejtkapcsoló struktúrák (gap junction) kialakításában vesz részt. Ezeknek a sejtkapcsoló struktúráknak a szomszédos sejtek közötti mechanikai kapcsolat és kommunikáció kialakításában van szerepük. A Cx43 részt vesz a proliferáció, az apoptózis és a differenciáció szabályozásában. A Cx43 fehérje expressziója szignifikáns összefüggést mutat a fej-nyaki tumoros betegek túlélésével, azaz a fehérje magasabb expressziója jobb prognózissal társul [72, 73]. A Cx43 mennyiségének csökkenése a tumorsejtekben összefüggésbe hozható a fokozott invázióval és metasztázisképzéssel [74].



5. ábra: A Cx43 fehérje felépítése: (A) a Cx43 monomer szerkezete, (B) a Cx43 hexamer által kialakított csatorna és (C) a Cx43 csatornák által kialakított sejtkapcsoló struktúra (gap junction) [75]

A Cx43 szerkezetét tekintve egy hosszú C-terminális farokból, négy transzmembrán doménből és egy rövidebb N-terminális farokból áll (5. ábra). Hat alegység transzmembrán doménjei összeállva képeznek egy csatornát. A kialakult csatornák összekötik a szomszédos sejteket és lehetővé teszik a kisméretű molekulák cseréjét. A C-terminális régió tartalmazza a szabályozó részeket, úgymint poszttranszlációs módosító helyek, illetve transzkripciós faktorok, citoszkeleton elemek és egyéb fehérjék kötőhelyei. Az N-terminális doménnek pedig a csatorna nyitásban és zárásban van szerepe. A Cx43 egyik legfontosabb poszttranszlációs módosulása a foszforiláció, amely módosítást összefüggésbe hozták a fehérjemolekulák membránba helyeződésével és funkcionális változásával. A fehérje defoszforilációja gátolja a csatornák funkcióját, és akadályozza kihelyeződésüket a sejtmembránba. Számos jelátviteli fehérjéről kimutatták már, hogy közvetlenül képes kapcsolódni a Cx43-hoz. Ilyen fontos fehérjék például az

EGFR, az ERK és az Akt. Egyásra gyakorolt hatásuk révén a sejtek közötti kommunikációban és a jelátviteli kaszkádok aktivitásában történik változás [76-78].

2.2.3. Fej-nyaki tumorok kezelése

A fej-nyaki tumorok kezelése összetett feladat, több fontos változó figyelembevételét igényli. Az egyik fontos tényező a daganat stádiuma, amely alapján megkülönböztetünk lokoregionális és metasztatikus tumorokat, melyeknek hagyományos terápiája eltérő. Lokoregionális daganatok esetében operáció, sugárkezelés vagy kemoterápia (cisplatin) lehetséges, míg metasztatikus tumorok esetén kemoterápiát (cisplatin, carboplatin, docetaxel, paclitaxel, methotrexate és/vagy 5-fluorouracil) szoktak alkalmazni. A cisplatin és a carboplatin *in vivo* képesek keresztkötést kialakítani a DNS-sel. Ezt a DNS-hibajavító mechanizmusok nem tudják kezelni, emiatt beindulhat az apoptózis. A docetaxel és a paclitaxel taxánapú gyógyszerek. A taxán a már beépült tubulinhoz kapcsolódik, ezáltal gátolja a mikrotubulusok depolimerizációját, és így a sejtek normális osztódását. A methotrexate gátolja a dihidrofolát reduktáz működését, ezáltal akadályozza a DNS- és az RNS-szintézist. Az 5-fluorouracil pedig egy pirimidinanalóg, amely gátolja a timidilát szintézisét, vagyis ez is a nukleinsavsintézisre van negatív hatással, amely végül timinmentes sejthalálhoz (thymineless cell death) vezet [79].

Abban az esetben, ha társbetegségek akadályozzák a citotoxikus kemoterápia használatát, EGFR-ellenes célzott terápiával (cetuximab) kombinált radioterápiát alkalmazhatnak. Mindezek mellett az FDA (Food and Drug Administration) az immunellenőrzési pont fehérjének kölcsönhatását befolyásoló és így a T-sejtes immunválasz kialakulását elősegítő immunterápiás lehetőségeket is jóváhagyott: visszatérő és metasztatikus HNSCC-k esetén a pembrolizumabot és a nivolumabot, nem reszekálható HNSCC-k esetén pedig a pembrolizumabot mint elsődleges terápiát. Ennek alapja, hogy a tumorsejtek gyakran túltermelik a Programmed death-ligand 1 (PDL-1) fehérjét, amely az aktivált T-sejtek Programmed death 1 (PD-1) receptorához kötődve képes deaktiválni a T-sejteket a tumor mikro környezetében [18, 80]. A pembrolizumab és a nivolumab PD-1 ellenes antitestek, amelyek blokkolják a kapcsolatot a PD-1 és ligandja, a PDL-1 között, ezáltal javítva a betegek túlélését a standard terápiához képest.

2.2.3.1. Kemoterápia és prediktív markerei fej-nyaki tumorokban

A kemoterápia sikerességének előrejelzésére igen kevés molekuláris markerrel rendelkezünk. Fej-nyaki tumorokban cisplatin és 5-fluorouracil kezelés tekintetében az

ERCC1-et azonosították mint prediktív molekuláris markert. A kezelési stratégiát tekintve fej-nyaki tumoroknál nagyon gyakran alkalmaznak indukciós kemoterápiát, amely docetaxel, cisplatin és 5-fluorouracil (TPF) egyidejű alkalmazását jelenti. Boguszewicz egy átfogó tanulmányban összegyűjtötte azokat a géneket és fehérjéket, amelyek fej-nyaki tumorokban potenciális prediktív markerek lehetnek indukciós kemoterápia esetén. A teljesség igénye nélkül ilyen gének lehetnek az EGFR, a HER-2, a VEGFR (vascular endothelial growth factor), a Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), az ERCC1 és a p53 fehérjéket kódoló gének. Az indukciós kemoterápia sikerességét előre jelző fehérje pedig lehet többek között a p16^{INK4A} és a p53 [81, 82]. Ezeken kívül a Cx43 paclitaxel alkalmazása során merül fel mint lehetséges prediktív marker [83]. Korábbi kutatás során glioblasztomákat vizsgálva kimutatták, hogy magasabb Cx43-expresszió érzékenyíti a tumorsejtvonalakat paclitaxellel szemben. Ezt a jelenséget azzal magyarázták, hogy a magasabb Cx43-expresszióval együtt alacsony Bcl-2-expresszió figyelhető meg. A Bcl-2 antiapoptotikus fehérje, amelynek hiányában könnyebben következik be sejthalál [84].

2.2.3.2. Lehetséges terápiás célpontok fej-nyaki tumorokban

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

2.2.3.2.1. Az epidermális növekedési faktor receptorcsalád

A klinikai gyakorlatban több EGFR-gátlószer is elérhető a betegek számára, amelyek lehetnek monoklonális antitestek (cetuximab és panitumumab), vagy kismolekulás tirozin-kináz-inhibitorok (erlotinib, gefitinib, lapatinib, afatinib) [85]. Az antitestek az eddigi klinikai vizsgálatok szerint fej-nyaki tumorokban javítják a progressziómentes túlélést, de a teljes túlélést nem. Az erlotinib és a gefitinib a fej-nyaki tumoros betegeken végzett klinikai vizsgálatok szerint nem fejtettek ki jelentős hatást, messze nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, a lapatinib pedig nem okozott szignifikáns javulást. Az

eddig vizsgálatok alapján az afatinib lehet hatásos kezelőszer, amely egy irreverzibilis, az EGFR-család gyakorlatilag összes tagjára ható vegyület [79]. Összességében elmondhatjuk, hogy az anti-EGFR terápiák csak bizonyos pácienseknél működnek. A terápia sikerességének előrejelzése nehézkes, mivel az EGFR génjének mutációja, valamint a fehérje expressziója és az anti-EGFR terápiák hatékonysága gyakran nem korrelál egymással. Mégis a tapasztalat azt mutatja, hogy bizonyos esetekben az EGFR gátlása fej-nyaki tumorokban sikeres terápiás stratégia, illetve más kezelésekkel kombinálva is hatásos lehet. Az anti-EGFR terápiák sikerességének előrejelzéséhez elengedhetetlen annak felderítése, hogy milyen molekuláris háttérű betegeknél működnek ezek és mely esetekben nem [37].

2.2.3.2.2. A MEK/ERK jelátviteli útvonal

A MEK/ERK jelutat az EGFR aktiválhatja. A jelút első tagja a Ras fehérje (Rat sarcoma protein), amely egy több mint 100 taggal rendelkező fehérjecsalád valamelyik képviselőjét jelenti. Leggyakrabban előforduló és daganatokban leginkább érintett tagjai a K-Ras, az N-Ras és a H-Ras. A *RAS* gén a humán daganatok jelentős részében mutáns. Az útvonal második állomása a Raf protein (MAP3K, mitogen-activated protein kinase kinase), amely egy szerin-treonin kináz. A Raf név szintén egy fehérjecsaládra utal, amelynek tagjai az A-, a B- és a C-Raf. Ezeket a fehérjéket kódoló génszakaszok is gyakran szenvednek mutációt tumorsejtekben. A legjellemzőbb képviselőjük a B-Raf, amely közvetlenül aktiválja a MEK (MAP2K, mitogen-activated protein kinase kinase) fehérjét. A MEK egy szerin-treonin kináz, amely három gyakori homológgaal rendelkezik: MEK-1, -2 és -3. A fehérjefoszforylációban legaktívabban a MEK-1 vesz részt. Feladata az ERK (extracellular signal regulated protein kinase, MAPK, mitogen-activated protein kinase) aktiválása, amely két izoformával (ERK1 és ERK2) rendelkező szerin-treonin kináz. Transzkripciós faktorokat, foszfatázokat, kinázokat és sejtvézelemeket aktiválhat az érkező jeltől függően [86-89]. A MEK/ERK jelátviteli útvonal tehát a sejtek proliferációjának, túlélésének, migrációjának és differenciációjának szabályozásában vesz részt. Klinikai relevanciája fej-nyaki tumorokban a *HRAS*, a *KRAS G12C* és a *BRAF G464R/G469R* mutációknak lehet, bár egyik sem túl gyakori. Vizsgálatuk mégis fontos lehet, mivel jelenlétük EGFR-inhibitorokkal (pl. cetuximabbal) szembeni rezisztenciát okoz [47, 90].

Mivel a MEK/ERK útvonal tagjai közül az első kettő génjei gyakran mutálódnak, azonban gátlásuk nem mindig bizonyul sikeresnek és jelenlétük EGFR-gátlókkal szembeni rezisztenciát okoz, logikus stratégia, hogy az útvonalat az ezek után szereplő fehérjék gátlásával inaktiválják. Ezt általában MEK-inhibitorokkal teszik. Ezek többnyire kisméretű molekulák, amelyek irreverzibilisen kötődnek a fehérje aktív centrumának közelében, ezzel akadályozva a MEK működését. Az utóbbi években különböző daganattípusoknál több MEK-gátlót is sikeresen alkalmaztak, amelyek közül kiemelkedően teljesít a trametinib, a selumetinib (AZD6244) és a PD-0325901 [91-94].

2.2.3.2.3. *A PI3K/Akt jelátviteli útvonal*

A PI3K/Akt útvonalra is közvetlen hatást gyakorol az EGFR. Az útvonal egyik tagja, az Akt egy szerin-treonin kináz, amely a PI3K-ről érkező jelek központi elosztója. Komoly szerepe van a sejt túlélésében és proliferációjában azzal, hogy gátolja a proapoptotikus fehérjéket. A jelút egy másik tagja pedig az mTOR, amely szintén egy protein-kináz család tagját jelenti, és nem csak az Akt-től, hanem más fehérjéktől is kaphat jelet, ezáltal nagyon sok molekulára van hatással. Ezzel irányítja a lipidbioszintézist, a sejtek táplálékellátását és energiahelyzetét, a stresszre adott választ, a sejtváz szerveződését, a transzlációt, valamint a túlélést is. Működése összetett és több fehérje egymásra gyakorolt hatásán alapszik. A PIK3CA fokozott aktivitását és a génjében jelentkező mutációkat összefüggésbe hozták daganatsejtek EGFR-gátlókkal szembeni rezisztenciájával [52, 95].

3. Célkitűzések

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

A bemutatásra kerülő munka konkrét célkitűzései a következők voltak:

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

4. Anyagok és módszerek

4.1. *In vitro* módszerek

4.1.1. Alkalmazott sejtvonalak

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

A Detroit 562 (ATCC® CCL-138™) egy felnőtt kaukázusi nőből származó pharynx daganatos sejtvonal, amely *CDKN2A*, *PIK3CA* és *TP53* génre nézve mutáns. A sejtvonal fenntartásához 10% FBS-t (Foetal Bovine Serum, borjú szérum; Cat. No. A5256801, GIBCO), 1 mM nátrium-piruvátot (Cat. No. BE13-115E, Lonza) és 1% MycoZap (Cat. No. VZA-2012, Lonza) antibiotikumot tartalmazó EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium; Cat. No. 12-611F, Lonza) médium szükséges [96].

A FaDu (ATCC® HTB-43™) egy 56 éves kaukázusi férfiból izolált hypopharynx rákos sejtvonal, amely *CDKN2A*, *SMAD4* és *TP53* génre nézve mutáns. A sejtvonal fenntartásához 10% FBS-t, 0,1% nátrium-piruvátot és 1% MycoZap antibiotikumot tartalmazó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Cat. No. 12-604F, Lonza) médiumot alkalmaztunk [97].

Az SCC25 (ATCC® CRL-1628™) egy 70 éves férfiből származó nyelvtumor-sejtvonal, amely *CDKN2A* és *TP53* génre nézve mutáns. A sejtvonal fenntartásához 10% FBS-t, 400 ng/ml hidrokortizont (Cat. No. 07925, STEMCELL) és 1% MycoZap antibiotikumot tartalmazó DMEM:F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12; Cat. No. 12-719F, Lonza) médiumot használtunk [98].

4.1.2. Alkalmazott kezelőszerek

Munkánk során az FDA által már engedélyezett, klinikai használatban lévő gátlószereket használtunk: afatinibet, erlotinibet, selumetinibet, trametinibet és paclitaxelt. Valamennyi kezelőszert a Selleckchemtől szereztük be.

Az afatinib (BIBW2992; Cat. No. S1011) az EGFR-család irreverzibilis gátlószere, amely alacsony koncentrációban gátolja az EGFR vad típusú és mutáns (L858R,

L858R/T790M) változatait, valamint a HER-2-t. Az erlotinib (CP-358774; Cat. No. S1023) egy EGFR-specifikus tirozin-kináz-inhibitor, amely a fehérje autofoszforylációját gátolja. Az afatinibet és az erlotinibet is nem-kissejtes tüdőrák kezelésére alkalmazzák. A selumetinib (AZD6244; Cat. No. S1008) egy szelektív, nem-ATP-kompetitív MEK-inhibitor, amely gátolja az ERK foszforylációját. A trametinib (GSK1120212; Cat. No. S1008) egy MEK inhibitor, amely a MEK gátlása mellett aktiválja az autofágiát és indukálja az apoptózist. A selumetinibet neurofibromatózis, a trametinibet pedig melanoma kezelésében használják.

A paclitaxel (NSC 125973; Cat. No. S1150) a mikrotubulusokat stabilizálja, ezáltal gátolja a sejtek osztódását. Széles körben alkalmazott kemoterápiás szer számos tumortípus esetén, például tüdő-, emlő- és hasnyálmirigy-daganatokban.

4.1.3. Géncsendesítés (siRNS-transzfekció)

A Cx43 fehérjét kódoló gén, a *GJA1* (gap junction protein alpha-1) expresszióját a rá specifikus siRNS molekula transzfektálásával csendesítettük mindhárom vizsgált sejtvonalban. A Dharmacontól beszerezett *GJA1* siRNS (ON-TARGETplus Human GJA1 (2697) siRNA–SMARTpool; Cat. No. L-011042-00-0005) célpontszekvenciáit az 1. táblázat tartalmazza. Negatív kontrollként a Thermo Fisher Scientific-től származó nem targetáló (NT) siRNS-t alkalmaztunk (Silencer®Select Negative Control #1 siRNA; Cat. No. 4390843), amely semmilyen ismert mRNS-szekvenciával nem mutat homológiát.

1. táblázat: A *GJA1* siRNS targetszekvenciái

siRNS száma	Célpontszekvencia
J-011042-05	CAGUCUGCCUUUCGUUGUA
J-011042-06	UGACAAGGUUCAAGCCUAC
J-011042-07	GUACAUCUAUGGAUUCAGC
J-011042-08	GAACCUACAUCAGUUAU

A méréshez a sejteket 6 lyukú steril sejtenyésző lemezre (Cat. No. 734-2798, VWR) raktuk ki oly módon, hogy minden pozícióban 200.000 sejt legyen 2 ml médiumban. A lemezt 24 órán át inkubáltuk, hogy a sejtek letapadhassanak. A transzfekciót Lipofectamine RNAiMAX (Cat. No. 13778075, Thermo Fisher Scientific) és OPTI-MEM médium (Cat. No. 31985070, GIBCO) jelenlétében végeztük el a gyártói protokollokban szereplő eljárás szerint. A 60-70%-os konfluenciájú sejteket transzfekciós

eleggyel kezeltük, amely reakciónként 240 nmol siRNS-t, 5 µl Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagenst és 500 µl Opti-MEM médiumot tartalmazott. Transzfectálás előtt az antibiotikumot tartalmazó komplett médiumot antibiotikummentesre cseréltük. A 2500 µl friss (antibiotikummentes) tenyésztőmédiumot tartalmazó lyukakhoz 500-500 µl transzfekciós elegyet adtunk hozzá. A sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk a transzfekciós eleggyel, ezután a médiumot komplett tápoldatra cseréltük. További 24 órás inkubációt követően a transzfectált sejteket egyéb mérésekhez (tripánkékkizárásos sejtszámolás, Western blot és fluoreszcens áramlási citometria) használtuk fel.

4.1.4. Fehérjetútermeltetés (plazmidtranszfekció)

A Cx43 fehérje tútermeltetéséhez plazmidtranszfekciót alkalmaztunk valamennyi vizsgált fej-nyaki tumorsejtvonal esetén. A vektor a pIRES2-Cx43 plazmid volt, amely a vad típusú Cx43-at kódolta. Kontroll vektorként a GFP-t (green fluorescent protein) termelő pEGFP-C1 plazmidot használtuk. A vektorokat David Laurence Becker professzor (Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University, Singapore) bocsátotta rendelkezésünkre.

A méréshez a sejteket 12 lyukú steril sejttenyésztő lemezre (Cat. No. 734-2324, VWR) raktuk ki oly módon, hogy minden pozícióban 150.000 sejt legyen 1 ml médiumban. A lemezt 24 órán át inkubáltuk, hogy a sejtek letapadhassanak. A transzfekciót Lipofectamine®LTX & PLUS™ Reagent (Cat. No. 15338100, Thermo Fisher Scientific) jelenlétében végeztük el a gyártói protokollokban megadott eljárás szerint. A transzfekciós elegy reakciónként 1 µg plazmidot, 2 µl Lipofectamine®LTX transzfekciós reagenst, 2 µl PLUS™ reagenst és 200 µl Opti-MEM médiumot tartalmazott. Transzfectálás előtt az antibiotikumot tartalmazó komplett médiumot antibiotikummentesre cseréltük. A 800 µl friss (antibiotikummentes) tenyésztőmédiumot tartalmazó lyukakhoz 200-200 µl transzfekciós elegyet adtunk hozzá. A sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk a transzfekciós eleggyel, ezután a médiumot komplett tápoldatra cseréltük. Ezt követően a transzfectált sejteket egyéb mérésekhez (tripánkékkizárásos sejtszámolás, Western blot és fluoreszcens áramlási citometria) használtuk fel.

4.1.5. A sejtek életképességének vizsgálata MTT méréssel

Az MTT az élő sejtek mennyiségének, illetve a sejtek életképességének vizsgálatára szolgáló módszer. A mérés alapja, hogy a metabolikusan aktív sejtek felveszik a 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromidot (MTT), amely jellegzetes

sárga színű oldatot képez. Ezt az anyagot az oxidoreduktáz enzimek lila formazán-kristályokká alakítják. A kristályok sósav- és Triton X-100-tartalmú izopropanolban oldhatók, és az így kapott oldat megfelelő hullámhossznál mért abszorbanciája arányos a mintában lévő élő sejtek mennyiségével [99].

A méréshez a sejteket 96 lyukú steril sejttenyésztő lemezre (Cat. No. 734-2327, VWR) raktuk ki oly módon, hogy minden pozícióban 4.000 sejt legyen 150 µl médiumban. A lemezt 24 órán át inkubáltuk, hogy a sejtek letapadhassanak. Ezt követően 5 µM-ról induló harmadoló hígítási sorral kezeltük a sejteket afatinibbel, erlotinibbel, selumetinibbel, trametinibbellel és afatinib+trametinib 1:1 arányú kombinációjával. 100 nM-ról induló harmadoló hígítási sort alkalmaztunk a paclitaxel kezelés esetén. A szereket 72 órán keresztül hagytuk hatni.

A kezelési idő letelte után a sejtekről leszívtuk a médiumot, majd a lyukakba 50 µl/lyuk PBS-ben (Cat. No. 10010-023, GIBCO) oldott 1 mg/ml koncentrációjú MTT-t (Cat. No. M5655, Sigma) mértünk. A sejteket a formazánkristályok megjelenéséig inkubáltuk, majd az oldat leszívását követően a kristályokat 200 µl/lyuk detergenses oldószerben (10% Triton X-100-at (Cat. No. T9284, Sigma) és 0,001 N sósavat tartalmazó izopropanolban (Cat. No. 20880.400, VWR) feloldottuk.

A lemezen lévő oldatokat BIOTEK Synergy 2 fluoreszcencia polarizáció olvasó segítségével 570 és 635 nm-es hullámhosszokon lemértük. A 635 nm-es hullámhossz értékek adják a háttérrel, ezt kivontuk az 570 nm-es hullámhosszúságon mért abszorbanciákból, ebből pedig kivontuk a vak minták átlagának az abszorbancia értékét. Utóbbi a sejtek abszorbanciájából származó hibát küszöböli ki. A kiértékelés Microsoft® Excel segítségével történt. A kezelt/kontroll (T/C) százalékokat ábrázoltuk a kezelési koncentráció logaritmusának függvényében. A gátlószerek IC₅₀ értékét GraphPad Prism® 8 program segítségével határoztuk meg, amely megmutatja, hogy mi az a hatóanyag-koncentráció, amely a sejtek vitalitásában 50%-os csökkenést okoz. A különböző kezelőszerekhez tartozó IC₅₀ értékeket t-próbával ($\alpha=0,05$) hasonlítottuk össze. A statisztikai teszteket a Statistica 13 programmal végeztük.

4.1.6. Gyógyszerszinergizmus vizsgálata Compusyn segítségével

A lehetséges gyógyszerszinergizmusokat és az 50%-os effektív dózisonál definiált kombinációs indexeket (CI) Compusyn programmal állapítottuk meg. A program a medián-effektus és a kombinációs index – isobologram elveken alapszik [100, 101].

A program által generált értékek $CI < 0,75$ esetén szinergizmust, $0,75 < CI < 1,25$ additív hatást, míg $CI > 1,25$ antagonizmust jelölnek [102]. Kísérleteinkben a kombinációs indexek kiszámítása állandó koncentrációarány használatával történt valamennyi alkalmazott kezelőszerpár esetén.

4.1.7. A sejtek életképességének vizsgálata tripánkékkizárásos sejtszámolással

A festékkizárási teszt a sejtszuspenzióban lévő életképes sejtek számának meghatározására szolgáló módszer. Azon az elven alapul, hogy – az elhalt sejtekkel szemben – a sértetlen sejtmembránnal rendelkező élő sejtek kizárnak bizonyos színezékeket, mint például a tripánkék vagy az eozin [103]. A tripánkékkizárásos sejtszámolás lehetővé teszi, hogy az életképesség meghatározása mellett egy mintát egyidőben többféle jellemző (fehérjeexpresszió, apoptózis) meghatározására is felhasználjunk.

Az siRNS és a plazmidtranszfekció után (4.1.3. és 4.1.4. fejezetek) a sejteket 100 nM-ról induló harmadoló hígítási sorban paclitaxellel kezeltük, amelyet 48 órán keresztül hagytunk hatni. A *GJAI* siRNS + paclitaxel és a nem targetáló siRNS + paclitaxel kezelést követően a Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejtek, valamint a Cx43 plazmid + paclitaxel és kontroll plazmid + paclitaxel kezelést követően a FaDu sejtek életképességét tripánkékkizárásos sejtszámolással határoztuk meg.

A méréshez a sejtekről leszívtuk a médiumot, majd PBS-sel óvatosan átöblítettük a sejteket az FBS eltávolítása érdekében. A sejtekre 500 µl tripszin-EDTA (Cat. No. 15400-054, GIBCO) oldatot mértünk, és addig inkubáltuk 37°C-on, amíg valamennyi sejt fel nem jött a lemez aljáról. A sejtes oldatot ezt követően 500 µl médiummal kihígítottuk, majd 150 x g-n 4 percig centrifugáltuk. A felülúszót kiöntöttük, a pelletet 800 µl médiumban felfuszpendáltuk. A sejtszuspenzióból 25 µl-t mértünk 25 µl 0,4%-os tripánkékkoldatot (Cat. No. 93590, Sigma) tartalmazó csőbe. Ezt alaposan összesuszpendáltuk, hogy a sejtek eloszlása egyenletes legyen. A mikroszkópos számlálást hemocitóméterrel (Bürker-kamra) végeztük el, amelyhez 10 µl tripánkékkal festett sejtszuspenziót használtunk.

A kiértékelés Microsoft® Excel segítségével történt. A kezelt/kontroll (T/C) százalékokat ábrázoltuk a kezelési koncentráció logaritmusának függvényében. Az IC_{50} értékeket GraphPad Prism® 8 program segítségével számítottuk ki nem-lineáris regresszióval. A különböző IC_{50} értékeket t-próbával ($\alpha=0,05$) hasonlítottuk össze. A statisztikai tesztek

a Statistica 13 programmal végeztük. A maradék 775 µl sejtszuspenziót további mérésekhez (Western blot és fluoreszcens áramlási citometria) használtuk fel.

4.1.8. Apoptózis vizsgálata fluoreszcens áramlási citometriával

A fluoreszcens áramlási citométer (FACS) berendezés szuszpendált, egyedi sejtek fluoreszcens és fényszórási paramétereit méri nagy sebességgel. Az apoptózis vizsgálatához a sejtek DNS-állományának és membránjainak minőségi meghatározása szükséges. A meghatározás során Annexin V-FLUOS és propídium-jodid (PI) kettős festést alkalmaznak. Apoptózis során a plazmamembrán citoplazmatikus felületén található foszfatidil-szerinek megjelennek a membrán külső oldalán, amelyeket Annexin V-FLUOS konjugátummal lehet megjelölni. A PI pedig egy DNS-jelölésre alkalmas interkalátor festék, amellyel az apoptózisra jellemző DNS-fragmentáció tehető láthatóvá [104].

A méréshez a sejteket 24 lyukú steril sejtenyésző lemezre raktuk ki oly módon, hogy minden pozícióban 30.000 sejt legyen 1 ml médiumban. A lemezt 48 órán át inkubáltuk, hogy a sejtek letapadhassanak. Ezt követően 100 nM-ról induló harmadoló hígítási sorral kezeltük a sejteket paclitaxellel, amit 48 órán keresztül hagytunk hatni. A kezelési idő letelte után a sejtekről a felülúszót kémcsövekbe gyűjtöttük, majd a sejteket 150 µl/lyuk PBS-sel mostuk. A sejtekre 135 µl tripszin-EDTA oldatot mértünk, és addig inkubáltuk 37 °C-on, amíg valamennyi sejt fel nem jött a lemez aljáról. A sejtes oldatot ezt követően 150 µl médiummal és 500 µl PBS-sel kihígítottuk, majd a szuszpenziót a megfelelő kémcsőbe pipettáztuk.

A tripánkékkizárásos sejtszámolás után megmaradt GJA1 siRNS + paclitaxellel és a nem targetáló siRNS + paclitaxellel kezelt Detroit 562, FaDu és SCC25 sejteken, valamint a Cx43 plazmid + paclitaxellel és kontroll plazmid + paclitaxellel kezelt FaDu sejteken is elvégeztük az apoptózis mérést, hogy lássuk, változott-e a transzfekciók következtében a paclitaxel apoptózisindukáló hatása. Ehhez a sejtszuspenziókból 200 µl-t használtunk fel.

Az apoptózis detektálásához a sejtszuspenziókat 250 x g-n 4 percig centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a pelletet 1 ml PBS-sel mostuk, majd ismét 250 x g-n 4 percig centrifugáltuk. Ezt követően a sejteket a gyártói protokollokban megadott eljárás szerint 100 µl binding bufferben (Annexin-V-FLUOS Staining Kit; Cat. No. 11988549001, Roche) szuszpendáltuk, amely 2 µl Annexin-V-FLUOS (Cat. No. 11828681001, Roche)

reagenst tartalmazott. A sejteket 20 percig, szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk. Az inkubáció után minden csőhöz 1 ml PBS-t adtunk, majd ismét 250 x g-n 4 percig centrifugáltuk. A pelletet 300 µl térfogatú 3 µl PI-tartalmú (10 ng/ml; Cat. No. P4170, Sigma) PBS-ben szuszpendáltuk.

A fluoreszcens sejtpopulációk arányát FACSCalibur áramlási citométerrel detektáltuk, az adatokat CellQuest Pro és Microsoft® Excel szoftverrel értékeltük. A különböző kezeléseknél kapott frakciókat t-próbával ($\alpha=0,05$) hasonlítottuk össze. A statisztikai teszteket a Statistica 13 programmal végeztük.

4.1.9. Fehérjeexpresszió és -foszforiláció vizsgálata Western blottal

A Western blot a nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) segítségével elválasztott fehérjék kimutatására szolgáló módszer. Ez az eljárás tulajdonképpen egy immunoblot, mely során az elválasztott fehérjéket membránra kötjük, majd mennyiségüket specifikus antitestekkel detektáljuk [105].

A méréshez a sejteket 6 lyukú steril sejtenyésző lemezre raktuk ki oly módon, hogy minden pozícióban 400.000 sejt legyen 2 ml médiumban. A lemezt 48 órán át inkubáltuk, hogy a sejtek letapadhassanak. A Cx43, a Bcl-2, az EGFR, az Akt és az ERK1/2 fehérjék expressziós szintjének és az EGFR, az Akt és az ERK1/2 aktivitásának meghatározásához kezeletlen sejtizátumokat használtunk mindhárom fej-nyaki tumorsejtvonal esetén. A MEK-gátlás fehérjeexpresszióra és foszforilációra gyakorolt hatásának vizsgálatához a Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejteket 1 µM trametinibbel és DMSO-val (Cat. No. D2650, Sigma) kezeltük 4 órán keresztül.

A lemezeket jégre tettük, leszívtuk a médiumot, a sejteket pedig hideg PBS-sel mostuk, majd 100 µl lízispuffert pipettáztunk minden lyukba. A lízispuffer 50 mM Tris (pH=7,4; Cat. No. BP151-1, Fisher), 150 mM NaCl-ot (Cat. No. S3014, Sigma), 1% NP-40-et (nonil-fenoxi-polietoxi-etanol; Cat. No. 74385, Fluka), 2 mM EDTA-t (etilén-diamin-tetraecetsav; Cat. No. E5134, Sigma), 2 mM EGTA-t (etilénglikol-tetraecetsav, Cat. No. 20308.156, VWR), 1 mM DTT-t (ditiotreitol; Cat. No. R0861, Thermo Scientific), foszfatáz inhibitor koktélt (Cat. No. 524629, Merck) és proteázinhibitor koktélt (Cat. No. 535140, Calbiochem) tartalmazott. Ezt követően eltávolítottuk a sejteket a lemez aljáról egy erre a célra kialakított speciális kaparóval (Cell Scraper). A kapott szuszpenziót 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe (Cat. No. 0030123.328, Eppendorf) pipettáztuk.

A tripánkékkizárásos sejtszámolás és fluoreszcens áramlási citometria mérés után megmaradt *GJAI* siRNS + paclitaxellel és a nem targetáló siRNS + paclitaxellel kezelt Detroit 562, FaDu és SCC25 sejteket, valamint a Cx43 plazmid + paclitaxellel és kontroll plazmid + paclitaxellel kezelt FaDu sejteket is lizáltuk azért, hogy igazolhassuk a transzfekció sikerességét és vizsgálhassuk a fehérjeexpresszióra gyakorolt hatást. Ehhez a maradék 575 µl térfogatú sejtszuszpenziókat 150 x g-n 4 percig centrifugáltuk, majd a pelleteteket 100 µl lízispufferben szuszpendáltuk.

2. táblázat: Western blot során alkalmazott elsődleges ellenanyagok jellemzői

Elsődleges ellenanyag	Hígítás	Másodlagos ellenanyag	Gyártó
Bcl-2 (124) Mouse mAb #15071	1:1.000	anti-egér	Cell Signaling Technology
Connexin 43 Antibody #3512	1:1.000	anti-nyúl	Cell Signaling Technology
GFP (4B10) Mouse mAb #2955	1:1.000	anti-egér	Cell Signaling Technology
Akt (pan) (40D4) Mouse mAb #2920	1:4.000	anti-egér	Cell Signaling Technology
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb #4060	1:2.000	anti-nyúl	Cell Signaling Technology
EGF Receptor (D38B1) XP® Rabbit mAb #4267	1:2.000	anti-nyúl	Cell Signaling Technology
Phospho-EGF Receptor (Tyr1068) (D7A5) XP® Rabbit mAb #3777	1:1.000	anti-nyúl	Cell Signaling Technology
p44/42 MAPK (Erk1/2) (3A7) Mouse mAb #9107	1:4.000	anti-egér	Cell Signaling Technology
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb #4370	1:2.000	anti-nyúl	Cell Signaling Technology
α-tubulin (DM1A) mAb #T9026	1:40.000	anti-egér	Merck Millipore

A szuszpenziókat 30 percig jégen állni hagytuk, közben a mintákat szonikáltuk (VEB Elektromat vízfürdős szonikáló, 50 Hz). Ezt követően 4 °C-on 13.000 x g-n 15 percig centrifugáltuk a csöveket. A felülúszót átöntöttük egy új 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe. Az össz-fehérjekoncentrációt Bradford módszerrel határoztuk meg, a maradék mintához pedig 5x töménységű Laemmli puffert adtunk és a fehérjéket 97 °C-on 5 percig denaturáltuk. A mintákból 10 µg-ot vittünk fel a 10% vagy 14%-os SDS-tartalmú poliakrilamid gélek zsebeibe, majd állandó 130 V feszültség mellett futtattuk.

A fehérjék polivinilidén-difluorid (PVDF; Cat. No. 1620177, Bio-Rad) membránra juttatását elektrotranszfer módszerrel végeztük 400 mA áramerősség mellett, jégben hűtve. A transzferálás után a PVDF membrán szabadon maradt kötőhelyeit 5% tejpor-tartalmú TBST-ben (Tris-buffered saline with 0,1% Tween® 20) blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az elsődleges ellenanyagokat 1% BSA- (Cat. No. A7906, Sigma) és 0,1% Na-azid-tartalmú (Cat. No. S2002, Sigma) TBST-ben hígítottuk ki és ebben a membránokat egy éjszakán keresztül 4 °C-on inkubáltuk. Az alkalmazott ellenanyagok jellemzőit a 2. táblázat tartalmazza.

A következő napon a membránokat háromszor 5 percig mostuk TBST-ben, majd 1% tejpört tartalmazó TBST-ben kihígított másodlagos ellenanyag oldatban inkubáltuk egy órán keresztül szobahőmérsékleten. A másodlagos ellenanyagok jellemzőit a 3. táblázat tartalmazza. Végül háromszor 5 percig mostuk a membránokat TBST-vel és az eredményt ECL-módszer segítségével detektáltuk.

3. táblázat: Western blot során alkalmazott másodlagos ellenanyagok jellemzői

Másodlagos ellenanyag	Hígítás	Gyártó
anti-nyúl (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074)	1:2.000	Cell Signaling Technology
anti-egér (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076)	1:8.000	Cell Signaling Technology

Az ECL-módszer során kapott film digitalizálás után az ImageJ programmal kiértékelhető. A program a kijelölt részekben számítja az intenzitást, majd a megrajzolt görbe alapján a görbe alatti területet, amely arányos a fehérje mennyiséggel. Minél nagyobb a kapott jel területe, annál több van az adott fehérjéből a mintában. A sejtvonalak fehérje expressziójának és aktivitásának eltérést, valamint a kontroll és a kezelt minták

különbözöségét t-próba ($\alpha=0,05$) segítségével vizsgáltuk. A statisztikai teszteket a Statistica 13 programmal végeztük.

4.1.10. Fehérjeexpresszió és -lokalizáció vizsgálata fluoreszcens immuncitokémiával

Az immuncitokémia célja egy bizonyos fehérje specifikus kimutatása, amellyel az egyes proteinek szemikvantitatív expressziós szintje mellett a sejten belüli helyzete is megállapítható. A vizsgálandó fehérjét az immunhisztokémiához hasonló eljárással jelöljük meg. Az elsődleges ellenanyag után a rendszerhez egy másodlagos ellenanyagot adunk, amely fluoreszcens jelöléssel van ellátva. A detektálás fluoreszcens mikroszkóppal valósul meg. Ezzel a módszerrel vizsgáltuk a Cx43 és a Bcl-2 fehérjék sejten belüli elhelyezkedését a Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejtekben.

A méréshez a sejteket μ -Slide 8 lyukú mikroszkópos lemezre (Cat. No. 80826, Ibidi) raktuk ki oly módon, hogy minden pozícióban 20.000 sejt legyen 250 μ l médiumban. A lemezt 48 órán át inkubáltuk, hogy a sejtek letapadhassanak és a mikroszkópos vizsgálathoz szükséges megfelelő telepképződés is megtörténhessen. Ezt követően a sejtekről leszívtuk a médiumot, majd 5 perces PBS-sel való mosás után 10 perig 100 μ l 4%-os pufferezt formaldehiddel (Cat. No. 01V60P, Bio-Optica) fixáltuk a sejteket. A fixálás után a formalint kétszer 5 perces PBS-sel való mosással távolítottuk el. A mosáshoz minden esetben lyukanként 200 μ l oldatot használtunk. Ahhoz, hogy a sejtben lévő fehérjéket meg tudjuk festeni, a membránt detergenssel átjárhatóvá kell tenni, amit jelen esetben Triton X-100 alkalmazásával végeztünk. Ehhez PBS-ben oldottunk Triton X-100-at úgy, hogy 0,1%-os oldatot kapjunk. A sejteket 15 percig 100 μ l Triton X-100 oldatban inkubáltuk, majd kétszer 5 percig mostuk PBS-sel. A Western blothoz hasonlóan proteinblokkolást végeztünk, hogy minél kevesebb nem specifikus fehérje-antitest kölcsönhatás jöjjön létre. A blokkolást 100 μ l 10% FBS-tartalmú PBS-sel valósítottuk meg, amely egy óráig tartott. Ezalatt előkészítettük az elsődleges antitesteket. Ehhez 10% FBS-tartalmú PBS oldatba 1:100 arányban hígítottuk az elsődleges ellenanyagokat. Az alkalmazott ellenanyagok jellemzőit a 4. táblázat tartalmazza. A primer antitestekből 100 μ l-t mértünk a megfelelő lyukakba, végül egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk a lemezeket.

4. táblázat: Immuncitokémia során alkalmazott elsődleges ellenanyagok jellemzői

Elsődleges ellenanyag	Másodlagos ellenanyag	Gyártó
Connexin 43 Antibody #3512	anti-nyúl	Cell Signaling Technology
Bcl-2 Monoclonal Antibody (100/D5) #MA5-11757	anti-nyúl	Thermo Fisher Scientific.

Másnap az elsődleges antitesteket leszívtuk a sejtekről, a nem specifikusan kötődő antitesteket háromszor 5 percig tartó PBS-es mosással távolítottuk el. Közben előkészítettük a másodlagos ellenanyagot. A fluoreszcensen jelölt szekunder antitestet, amely az Alexa Fluor 488 konjugált anti-rabbit IgG (Cat. No. A11001, Jackson Immuno Research) volt, 10%-os FBS tartalmú PBS-ben oldottuk 1:500 arányban hígítva. Ebből 100 µl-t mértünk minden lyukba, és egy órán át szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk. Az inkubáció után a nem kötődött antitesteket háromszor 5 percig tartó PBS-es mosással távolítottuk el. Ezt követően a sejtmagokat Draq5™-val (Cat. No. 62251, Thermo Scientific) festettük meg, ami nagy affinitással kötődik a kettősszálú DNS-hez. Ehhez 100 µl 10 µM Draq5™-tartalmú PBS oldatot mértünk a sejtekre, amelyet 10 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltunk. Ezután a felesleges festéket háromszor 5 percig tartó PBS-es mosással távolítottuk el Végül a sejtekre néhány csepp fedőmédiumot (Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium; Cat. No. F4680-25ML, Merck Millipore) csepegtettünk.

A sejteket konfokális lézermikroszkóp (Zeiss Confocal LSM 710,) segítségével vizsgáltuk 63x-os nagyítású olaj-immersiós objektívvel. A sejtekről különböző hullámhosszokon készült felvételeket a Zen lite 2.5 szoftver segítségével rétegeztük és illesztettük össze.

4.2. Szövettani mintákon alkalmazott módszerek

4.2.1. Felhasznált minták

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

Bizottság hagyta jóvá (etikai engedély száma: 105/2014). A betegcsoport legfontosabb jellemzőit az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: Vizsgálatban résztvevő betegek jellemzői a diagnóziskor

Jellemző	Páciensek száma	Jellemző	Páciensek száma
Nem		TNM ¹ M paraméter	
férfi	79	0	92
nő	18	1	5
Kor (év)		TNM ¹ stádium	
átlag	61 (43-81)	1	26
Lokalizáció		2	66
oropharynx	36	3	5
hypopharynx	25	Grade	
supraglottis	24	1	6
glottis	2	2	43
TNM ¹ T paraméter		3	34
1	14	nincs adat	14
2	29	Dohányzás	
3	27	soha	10
4a	18	korábban igen	28
4b	9	jelenleg is	57
TNM ¹ N paraméter		nincs adat	2
0	46	Alkoholfogyasztás	
1	16	soha	23
2a	6	korábban igen	32
2b	12	jelenleg is	42
2c	14		
3	3		

¹ TNM: tumor, regionális nyirokcsomó, távoli metasztázis, Union for International Cancer Control TNM 7. kiadás

4.2.2. Szöveti mikrochip (TMA-blokk) készítése

A szövetminták paraffinba ágyazva, szöveti blokkok formájában álltak rendelkezésünkre a Semmelweis Egyetem II. Sz. Patológiai Intézetében. A blokkokból 70 db szövethenger került szúrással egy TMA blokkba (Tissue Microarray). A tumoros régiót, így a mintavétel helyét haematoxylin-eosinnal festett metszetek segítségével állapítottuk meg. Amennyiben a szövetminta mérete és tumortartalma lehetővé tette, egy mintából több helyről is történt szúrással. A TMA blokkokból több, 4 µm vastagságú TMA metszet készült, amelyek szilanizált tárgylemezre lettek rögzítve az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz.

4.2.3. Fehérjeexpresszió értékelése manuális immunhisztokémiával

A paraffinban fixált TMA metszeteket 3x3 percig xilolban áztatva deparaffináltuk. Ezt követően a mintákat 100%-os alkoholban öblítettük, majd 96%-os etanolban 2x3 percig

áztattuk, végül 3x3 percig desztillált vízzel mosva rehidratáltuk. Az endogén peroxidázok blokkolása érdekében a lemezeket 3% hidrogén-peroxid-tartalmú metanollal 20 percig inkubáltuk. Az antigénfeltáráshoz Tris-EDTA (tris-(hidroximetil)-aminometán, etiléndiamin-tetraecetsav és sósav elegye, pH=9) feltárópuffert alkalmaztunk. A tárgylemezeket megfelelő tartóba helyeztük, majd a feltárópufferrel leöntöttük úgy, hogy az biztosan minden mintát befedjen, majd az optimalizált időnek megfelelően 58 percig forraltuk. A Western blothoz hasonlóan proteinblokkolást végeztünk, hogy minél kevesebb nem specifikus fehérje-antitest kölcsönhatás jöjjön létre. A blokkolást 3% BSA-tartalmú TBST-vel végeztük 15 percig. Ezalatt elkészítettük az elsődleges antitesteket. Ehhez 5% BSA-tartalmú TBST oldatban 1:400 arányban hígítottuk a Western blot során alkalmazott EGFR és pY1068-EGFR ellenanyagokat. A primer antitestekből 100 µl-t mértünk minden tárgylemezre, végül egy éjszakán át szobahőmérsékleten, párasító állványon inkubáltuk a lemezeket.

Az előző nap elkészített tárgylemezeket az inkubációs lépések között 10 percig TBST-vel mostuk. Másodlagos ellenanyagként HISTOLS-MR-T HRP polymer reagenst alkalmaztunk, amelyet a gyártói protokoll szerint használtunk. A mintákat 40 percig inkubáltuk a szekunder antitesttel. A mintákat DAB Quanto (diamino-benzidin) kromogénnel festettük. A DAB a másodlagos antitestben lévő peroxidáz-enzim és hidrogén-peroxid hatására barna csapadékot képez. A reakció lejátszódását mikroszkóp alatt kísértük figyelemmel. Az oldatot addig hagytuk a mintákon, amíg a barna szín elég erőssé nem vált (minimum 5 perc), de aspecifikus festődés (háttér) még nem jelent meg. A reakciót a tárgylemezek TBST-be helyezésével állítottuk le. A fehérjék jelölése után a sejteket haematoxylin-eosinnal festettük meg. Felszálló alkoholsoros dehidrálat követően xilolból kiemelve a lemezeket Surgipath fedőmédiummal fedtük. 24 órás száradás után a minták digitalizálásra készek voltak. A tárgylemezen lévő minták festését 3DHistech Panoramic Midi készülék segítségével digitalizáltuk, majd Panoramic Viewer program alkalmazásával értékeltük ki.

Az EGFR és a pY1068-EGFR mennyiségének meghatározásához alternatív három fokozatú pontozási rendszert használtunk [106, 107]. A festődött sejtek százalékos arányát megszoroztuk a festődés intenzitásával. A festődés intenzitásának jellemzésére négy fokozatot használtunk: 1: negatív, 2: gyenge, 3: mérsékelt, 4: intenzív. Így egy 0-400 közötti skálát kaptunk, amelyben a 0 érték jelentette a negatív (0), 1-200-ig az

alacsony (1), 201-300-ig a közepes (2), míg 301-400-ig a magas (3) fehérjeexpressziót. A statisztikai elemzéshez ezeket a pontszámokat különböző küszöbértékek mentén dichotomizáltuk. Az EGFR esetében ennek megfelelően az 1-es kategóriát tekintettük alacsony/negatív fehérjeexpressziónak, míg a 2-es és 3-as csoportokat magas/pozitív kifejeződésnek. A pY1068-EGFR esetén a 0-ás, 1-es és 2-es kategória adódott az alacsony/negatív megjelenésnek, míg a 3-as a magas/pozitív foszforilációnak.

4.2.4. Fehérjeexpresszió értékelése gépi immunhisztokémiával

A Bcl-2 és a Cx43 fehérjék esetében gépi festés is rendelkezésünkre állt, így ezeknél ezt az eljárást alkalmaztuk. A felhasznált elsődleges ellenanyagok ugyanazok voltak, mint a Western blot során alkalmazottak.

Az immunhisztokémiai jelölést Benchmark ULTRA IHC/ISH (Ventana Medical Systems) festőautomatával végeztük. A deparaffinálás EZ Prep (Ventana) oldattal történt, melyet az epitópfeltárás követett először 8 percig 95 °C-on, majd 76 percig 97 °C-on Cell Conditioning Solution pH 9 (Ventana) oldattal. Az endogén peroxidázok blokkolására UV inhibitor (Ventana) oldatot használtunk 4 percig 36 °C-on. Az elsődleges antitesteket 120 percig alkalmaztuk 36 °C-on 1:100 hígításban. A másodlagos antitest, UV HRP UNIV MULT (Ventana) oldatot 8 percig használtuk szintén 36 °C-on.

A színreakció előhívása DAB kromogénnel történt (U ultraView DAB v1.02.0018 kit) a megfestéshez pedig hematoxylin II (Ventana) oldatot használtunk. A folyamat egyes lépései között mosásokat alkalmaztunk, melyeket Reaction Buffer Concentrate (Ventana) megfelelően hígított oldatával végeztünk. A folyamat végén a lemezeket fedőmédiummal fedtük le és 3DHistech Panoramic Midi készülék segítségével digitalizáltuk, majd Panoramic Viewer program alkalmazásával értékeltük ki.

A Bcl-2 és a Cx43 mennyiségének meghatározásához a diagnosztikában és a korábbi kutatásaink során kialakított pontozási rendszert használtuk [73, 108, 109]. A Bcl-2-re vonatkozó kategóriák a következők voltak: 1: <10% pozitív tumorsejt, 2: 11-30% pozitív tumorsejt, 3: 31-60% pozitív tumorsejt, 4: >60% pozitív tumorsejt. A Cx43-ra vonatkozóan az alábbi kategóriákat különítettük el: 1: <5% pozitív tumorsejt, 2: 6-20% pozitív tumorsejt, 3: 21-60% pozitív tumorsejt, 4: >60% pozitív tumorsejt. A statisztikai elemzéshez ezeket a pontszámokat adott küszöbérték mentén dichotomizáltuk. A Bcl-2 és a Cx43 esetében is az 1-es és 2-es kategóriákat tekintettük alacsony/negatív fehérjeexpressziónak, míg a 3-as és 4-es csoportokat a magas/pozitív kifejeződésnek.

4.2.5. Statisztikai analízis

A különböző paraméterek túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálatához Kaplan-Meier-féle túlélési analízist végeztünk. A Kaplan-Meier-féle túlélési analízis célja a túlélési görbe meghatározása. Az eljárás során az adott betegcsoportra vonatkozóan meghatározzuk a halandósági arányt és a túlélési valószínűséget minden olyan időpontban, amelyben legalább egy halálozás történt. A túlélési valószínűségeket a követési idő függvényében ábrázolva kapjuk a túlélési görbét. A követési idő a páciens diagnosztizálása és a vizsgálat befejezése között eltelt idő hónapokban megadva. A Kaplan-Meier-görbén tehát az x tengelyen a túlélési idő van ábrázolva, az y tengelyen pedig a túlélők aránya az összes esethez viszonyítva. A „complete” kategória jelöli, ha a páciens a daganatos betegségének következtében elhunyt. A „censored” kategória pedig azt jelöli, ha a követés lezárásának pillanatában a beteg életben volt. Ide tartoznak azok az esetek is, amikor a páciens nem a tumor következtében hunyt el, hanem pl. balesetben. A túlélési görbe formáját tekintve lépcsős függvény, melynek függőleges szakaszai azokban a pontokban vannak, ahol ténylegesen bekövetkezett halálozás.

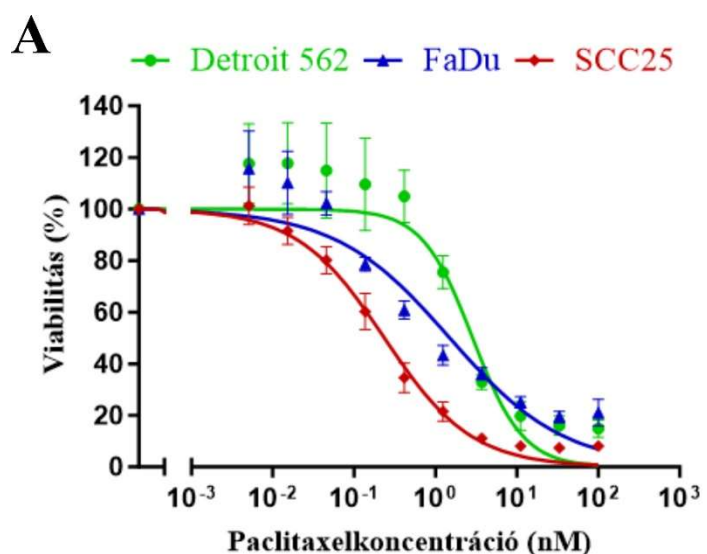
A paraméterek túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálatakor minden paraméternél több csoport is van. Annak megállapítására, hogy szignifikáns-e a különbség az eltérő csoportba tartozó betegek túlélési görbéje között, Pearson χ^2 próbát használtunk $\alpha=0,05$ szignifikanciaszinttel. Annak megállapításához, hogy a különböző paraméterek között van-e összefüggés, Fisher-féle χ^2 próbát alkalmaztunk ($\alpha=0,05$). Az elemzést Statistica 13 programmal végeztük.

5. Eredmények

5.1. Tumorprogressziós markerek vizsgálata fej-nyaki tumorokban

5.1.1. Paclitaxel hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére

A sejtek paclitaxelérzékenységét MTT módszer segítségével vizsgáltuk. Több párhuzamos kísérletet végeztünk, amelyek során több koncentrációban (100 nM-ról induló tízpontos harmadoló hígítás) kezeltük a sejteket paclitaxellel 72 órán keresztül.



B

	Detroit 562	FaDu	SCC25
IC ₅₀ (nM)	2,9 ± 0,6*	1,5 ± 0,2*	0,2 ± 0,1*

6. ábra: Paclitaxel hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére.

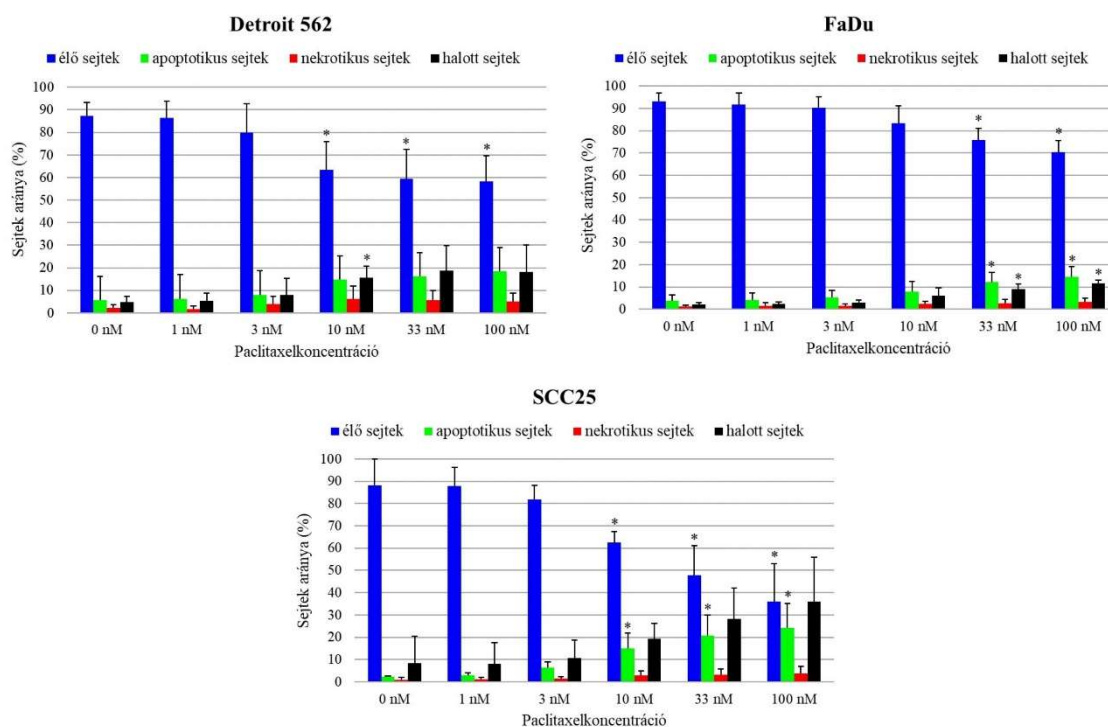
Három párhuzamos kísérletet végeztünk, amelyek során több koncentrációban (100 nM-ról induló tízpontos harmadoló hígítás) kezeltük a Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejteket paclitaxellel 72 órán keresztül. **(A)** IC₅₀ görbék paclitaxelkezelés esetén Detroit 562, FaDu és SCC25 sejtvonalakon. A görbék három független kísérlet eredményeinek átlagait és szórásait ábrázolják. **(B)** IC₅₀ értékek paclitaxelkezelés esetén Detroit 562, FaDu és SCC25 sejtvonalakon. Az IC₅₀ értékeket három független mérés átlagaként határoztuk meg. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, *p<0,05.

A paclitaxel mindhárom fej-nyaki tumorsejtvonal esetében jelentősen csökkentette a sejtek életképességét, az IC₅₀ érték minden esetben 10 nM-nál kisebbnek bizonyult (6A. ábra). Bár a paclitaxel mindegyik sejtvonalra kiemelkedő hatást gyakorolt, mégis mutatkoznak számottevő különbségek. Az SCC25 esetén szignifikánsan alacsonyabb

IC₅₀ érték figyelhető meg, mint a másik két sejtvonalnál (Detroit 562: $p=0,002$, FaDu: $p=5 \times 10^{-4}$). Vagyis az SCC25 paclitaxelre érzékeny, míg a Detroit 562 és a FaDu kevésbé érzékeny sejtvonalnak tekinthető. Kicsi, de szignifikáns különbség van a Detroit 562 és a FaDu IC₅₀ értékei között is ($p=0,02$) (6B. ábra).

5.1.2. Paclitaxel által indukált apoptózis fej-nyaki tumorsejtvonalakban

A paclitaxel által okozott sejthalál mechanizmusának feltárására áramlási citometriás (FACS) kísérleteket végeztünk Annexin V-FLUOS és propídium-jodid kettős festéssel egy kezelési idővel (48 óra) és öt paclitaxelkoncentrációval (1 nM, 3 nM, 10 nM, 33 nM és 100 nM). Az Annexin- (Ann) és a propídium-jodid- (PI) pozitivitás alapján négy populációt különítettünk el: élő, apoptotikus, nekrotikus és halott sejtek.



7. ábra: Paclitaxel által indukált apoptózis fej-nyaki tumorsejtvonalakban.

A Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejteket három független kísérletben több koncentrációban (100 nM-ról induló ötpontos harmadoló hígítás) kezeltük paclitaxellel 48 órán keresztül. A kezelést követően az Annexin V-FLUOS/propídium-jodiddal (Ann/PI) festett sejteket FACS eljárással elemeztük. Az élő sejtek az Ann⁻/PI⁻, az apoptotikus sejtek az Ann⁺/PI⁻, a nekrotikus sejtek az Ann⁻/PI⁺, míg a halott sejtek az Ann⁺/PI⁺ frakciókat jelentik. A grafikonokon három független kísérlet eredményeinek átlagai és szórásai szerepelnek. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, * $p < 0,05$.

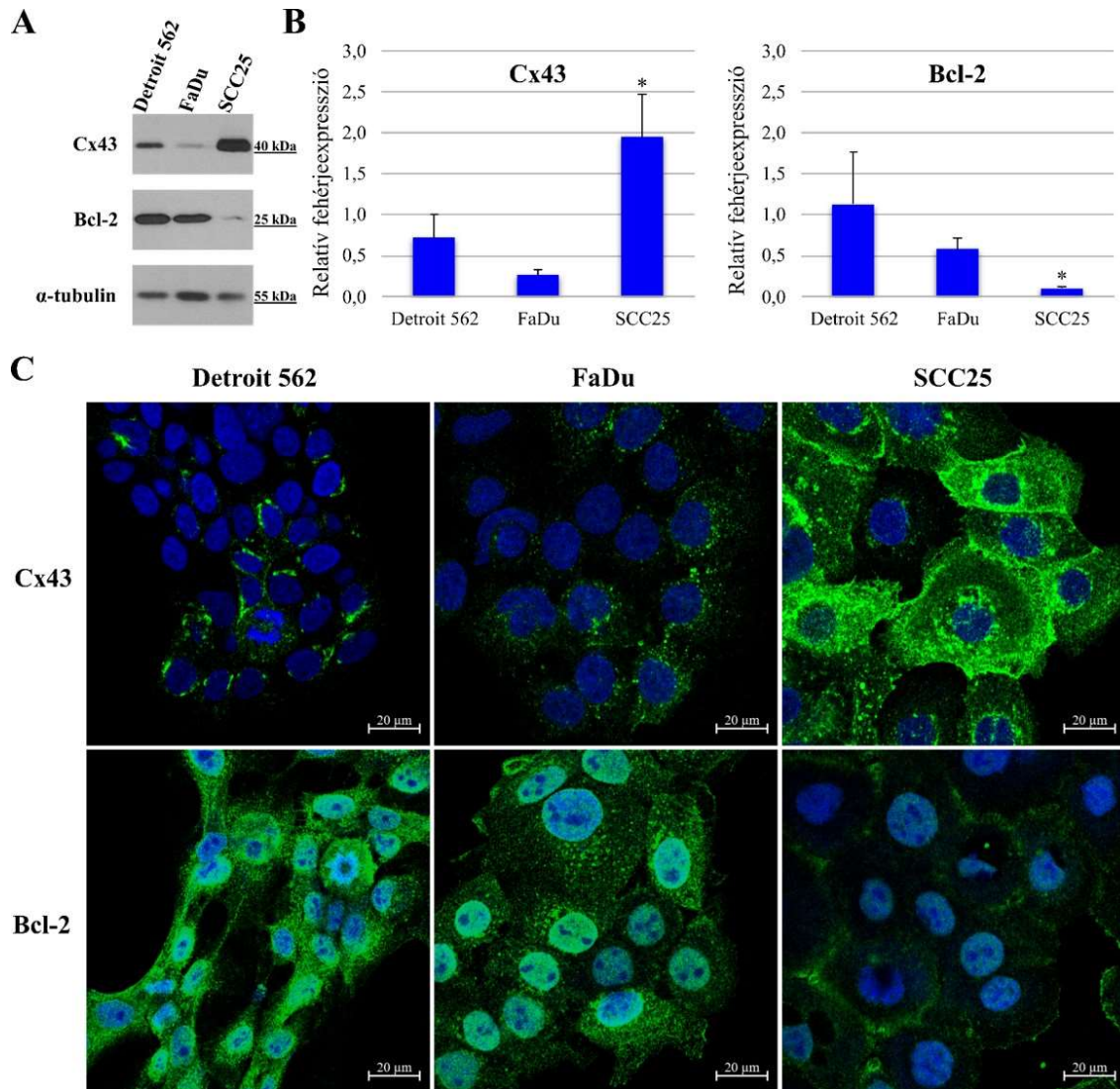
A Detroit 562 sejtvonal esetében az apoptózis arányának csak kismértékű emelkedése figyelhető meg növekvő paclitaxelkoncentráció hatására. Ez a növekedés a legmagasabb koncentrációnál sem szignifikáns ($p>0,05$). Az apoptózis arányának csekély mértékű növekedését figyeltük meg a FaDu sejtvonal esetén is. Az apoptotikus sejtek aránya a paclitaxelkoncentráció emelésével növekedett, ami 33 nM ($p=0,045$) és 100 nM ($p=0,022$) paclitaxelkoncentrációnál szignifikánsnak bizonyult a kontroll frakcióhoz képest. Az SCC25 sejtvonal esetében az apoptózis arányának jelentős növekedése látható. Az apoptotikus sejtek aránya a paclitaxelkoncentráció emelkedésével együtt nőtt. Szignifikáns különbségeket lehetett észlelni a kontroll és a paclitaxellel kezelt minták között már 10 nM-os koncentrációnál is (10 nM: $p=0,033$, 33 nM: $p=0,025$, 100 nM: $p=0,027$). Ez alapján az SCC25 érzékenyebb a paclitaxellel szemben, mint a másik két sejtvonal (7. ábra).

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

A Cx43 és a Bcl-2 fehérjék expresszióját fej-nyaki tumorsejtvonalakban Western blot és immuncitokémiai módszerek segítségével vizsgáltuk.

Az elvégzett kísérleteink eredménye alapján a Detroit 562-ben közepes mennyiségű Cx43 van jelen a másik két vizsgált sejtvonalhoz képest. A FaDu-ban megközelítőleg feleannyi, míg az SCC25-ben közel kétszerannyi Cx43 expresszálódik, mint a Detroit 562-ben (8A. ábra). A kvantitatív elemzés alapján az SCC25-ben kifejeződő fehérje mennyisége szignifikánsan eltér a másik két sejtvonalban tapasztalttól (Detroit 562: $p=0,02$, FaDu: $p=0,005$) (8B. ábra). Ez alapján a Detroit 562 és a FaDu alacsony, míg az SCC25 magas Cx43-expresszióval rendelkezik.

A Bcl-2 fehérje a Detroit 562 sejtvonalban található meg a legnagyobb mennyiségben, és ehhez hasonlóan magas szint tapasztalható a FaDu-ban is. Legkisebb mennyiségben az SCC25 termeli a Bcl-2-t, tizedannyit, mint a Detroit 562 (8A. ábra). Az észlelhető különbségek az SCC25 esetében szignifikánsak a másik két sejtvonalhoz viszonyítva (Detroit 562: $p=0,05$, FaDu: $p=0,004$) (8B. ábra). Ez alapján a Detroit 562 és a FaDu magas, míg az SCC25 alacsony Bcl-2-expressziót mutat.



8. ábra: Cx43- és Bcl-2-expresszió fej-nyaki tumorsejtvonalakban.

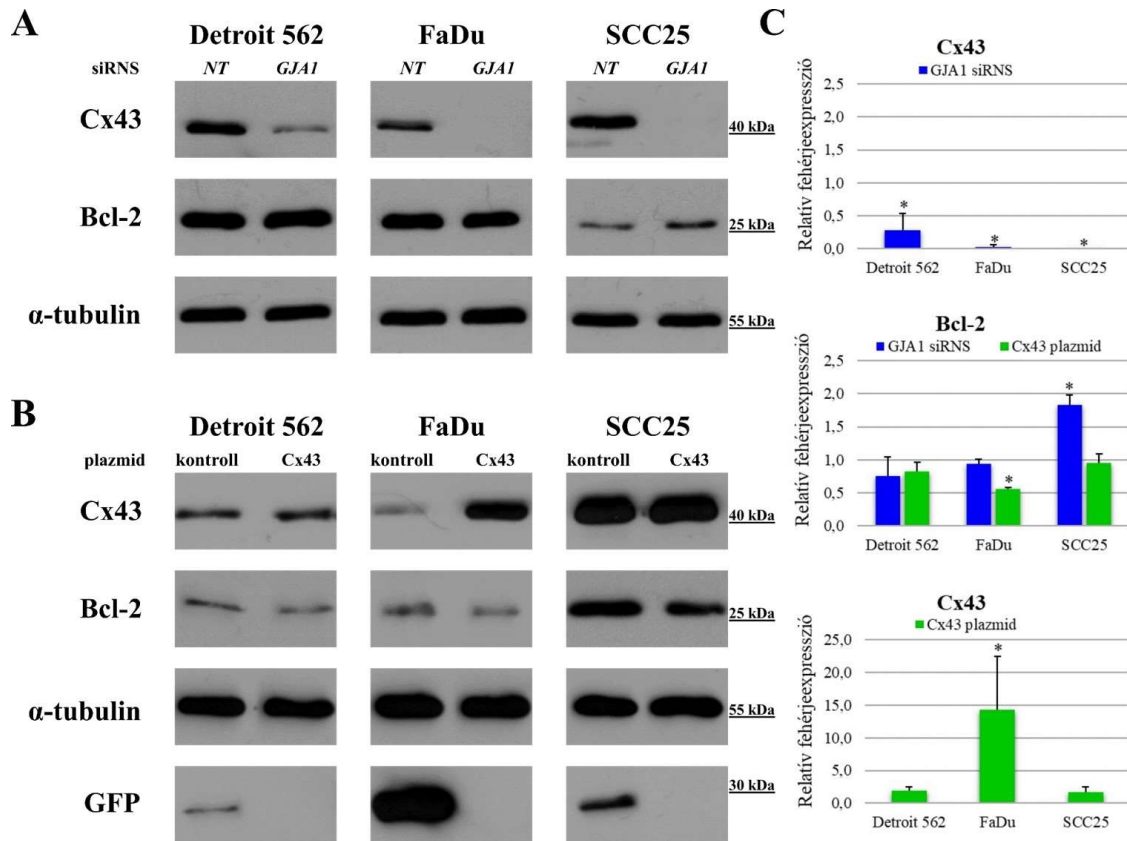
(A) A Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejtek fehérjeexpresszióját Western blot módszerrel határoztuk meg, kontroll fehérjeként α -tubulint alkalmaztunk. (B) A Cx43 és a Bcl-2 fehérjék mennyiségét denzitometrálassal elemeztük. Mindhárom sejtvonalnál valamennyi fehérje szintjét az α -tubulin mennyiségével normalizáltuk. A grafikonokon három független kísérlet eredményeinek átlagai és szórásai szerepelnek. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, $*p < 0,05$. (C) A Cx43 és a Bcl-2 fehérjék expressziójának fluoreszcens mikroszkóppal készült reprezentatív képei a Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejtvonalakban. A Cx43-at és a Bcl-2-t Alexa Fluor 488-cal (zöld) jelöltük, míg a sejtmagokat DRAQ5-tel (kék) festettük meg (nagyítás: 63x).

A sejtvonalak fehérjeexpressziójának tanulmányozása alapján tehát a Detroit 562 és a FaDu sejtvonalak alacsony Cx43- és magas Bcl-2-expresszióval bírnak, míg az SCC25 magas Cx43- és alacsony Bcl-2-expresszióval rendelkezik. Ezeket az eredményeket támasztják alá az immuncitokémiai módszerrel készült felvételek is, amelyeken megfigyelhető a Cx43 és a Bcl-2 sejten belüli lokalizációja is. A Cx43 a Detroit 562 és a FaDu sejtekben a citoplazmában, míg az SCC25 esetében a sejtmagban és a plazmamembránban is megjelenik. A Bcl-2 mindegyik vizsgált sejtvonal esetében a sejtmagban és a citoplazmában helyezkedik el (8C. ábra).

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

Annak megállapítására, hogy a Cx43 és a Bcl-2 fehérjék expressziója között van-e kapcsolat, vagy a megfigyelt fordított kifejeződés egymástól független jelenség, a Cx43 génjét (*GJAI*, gap junction protein alpha-1) siRNS-sel csendesítettük, valamint a fehérjét plazmidtranszfekcióval túltermeltettük Detroit 562, FaDu és SCC25 sejtekben.

A *GJAI* siRNS hatására mindhárom sejtvonalban szignifikánsan csökkent a Cx43 fehérje mennyisége (Detroit 562: $p=0,01$, FaDu: $p=3 \cdot 10^{-7}$, SCC25: $p=10^{-11}$), vagyis a géncsökkentés minden esetben sikeres volt. A Cx43 mennyiségének csökkenése nem okozott változást a Bcl-2-expresszióban a Detroit 562 és a FaDu sejtekben, azonban az SCC25 sejtekben jelentősen megemelkedett, közel duplájára nőtt a Bcl-2 mennyisége ($p=6 \cdot 10^{-4}$) (9A. és 9C. ábra). A transzfekció hatására a Detroit 562 és az SCC25 sejtekben nem történt szignifikáns változás. A Detroit 562 sejtek a kontroll plazmidot is csak kis mértékben vették fel, míg az SCC25 sejtekben az eleve magas Cx43-szint nem emelkedett meg jelentős mértékben a Cx43 plazmid hatására. Ezzel szemben a FaDu mind a kontroll, mind a Cx43 plazmidot felvette, előbbiről nagy mennyiségű GFP-t (Green Fluorescent Protein), utóbbiról pedig a kontrollhoz képest tizenötször több Cx43-at expresszált ($p=0,047$). Ez alapján a transzfekció egyedül a FaDu esetén volt eredményes. A FaDu sejtekben a megemelkedett Cx43-expresszió felére csökkentette a Bcl-2 mennyiségét, amely változás szignifikánsnak mutatkozott ($p=8 \cdot 10^{-6}$) (9B. és 9C. ábra).

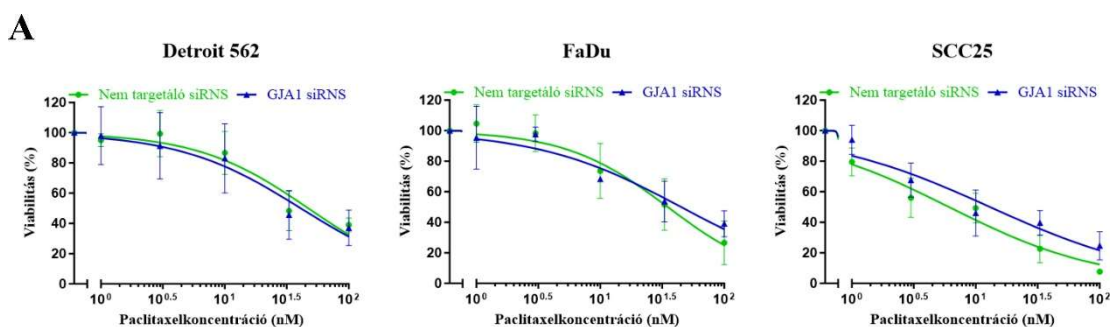


9. ábra: A Cx43- és a Bcl-2-expresszió változása GJA1 siRNS géncsendesítés és Cx43 plazmidtranszfekció hatására fej-nyaki tumorsejtvonalakban.

(A) A Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejtekben a GJA1 siRNS hatására bekövetkező Cx43-expressziócsökkenés következményét a Bcl-2 fehérjére Western blot módszerrel határoztuk meg, kontroll fehérjeként α -tubulint alkalmaztunk. NT: nem targetáló siRNS (B) A Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejtekben a Cx43 plazmid hatására bekövetkező Cx43-expressziónövekedés következményét a Bcl-2 fehérjére Western blot módszerrel határoztuk meg, kontroll fehérjeként α -tubulint alkalmaztunk. A transzfekció sikerességének megállapítására GFP-t használtunk. (C) A Cx43 és a Bcl-2 mennyiségét denzitometrálással elemeztük. Mindhárom sejtvonalnál valamennyi fehérje szintjét az α -tubulin mennyiségével normalizáltuk, és a saját kontrolljához viszonyítottuk. A grafikonokon három független kísérlet eredményeinek átlagai és szórásai szerepelnek. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, * $p < 0,05$.

5.1.5. A Cx43-expresszió csökkentésének hatása a paclitaxelérzékenységre fej-nyaki tumorsejtvonalakban

A Cx43-expresszió csökkentésének következményét az életképességre tripánkékkizárásos módszerrel vizsgáltuk, míg az apoptózisra gyakorolt hatásának megállapítására áramlási citometriás (FACS) kísérleteket végeztünk. A nem targetáló és a *GJA1* siRNS-sel géncsendesített Detroit 562, FaDu és SCC25 sejteket három független kísérletben, több koncentrációban (100 nM-ról induló ötpontos harmadoló hígítás) kezeltük paclitaxellel 48 órán keresztül. A kezelést követően tripánkékkizárásos módszerrel meghatároztuk az élősejtszámot. Majd ugyanezen mintákat Annexin V-FLUOS és propídium-jodid kettős festéssel FACS segítségével vizsgáltuk tovább. Az Annexin- (Ann) és a propídium-jodid- (PI) pozitivitás alapján négy populációt különítettünk el: élő, apoptotikus, nekrotikus és halott sejtek.

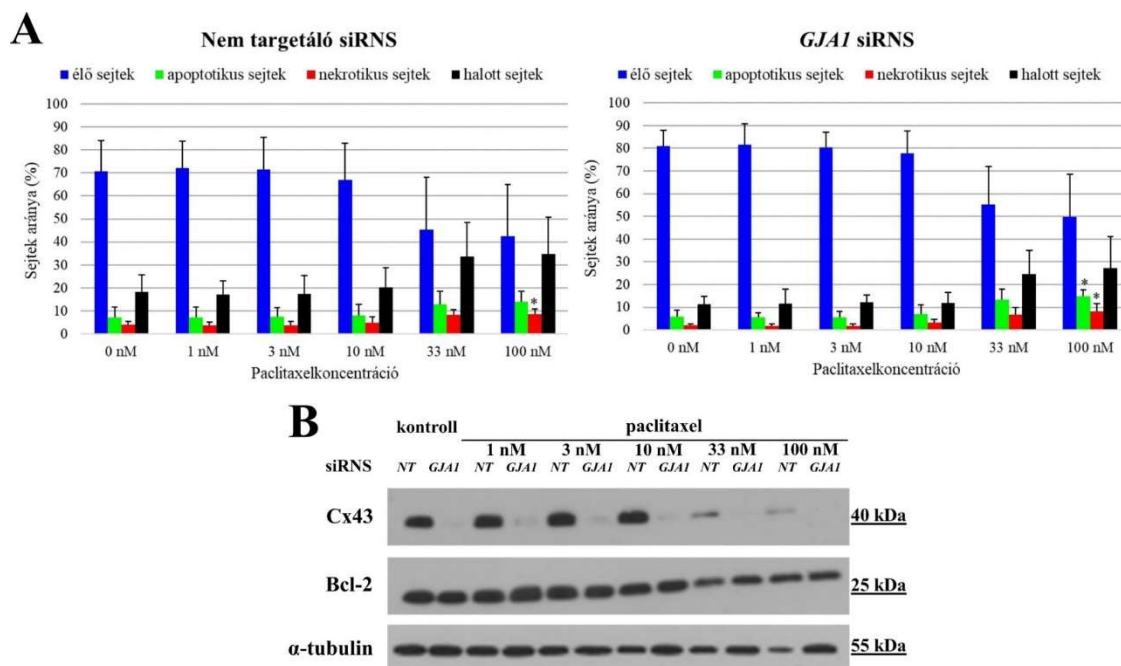


B

	Detroit 562		FaDu		SCC25	
Nem targetáló siRNS	+	-	+	-	+	-
<i>GJA1</i> siRNS	-	+	-	+	-	+
<i>paclitaxel</i>	47,04 nM	41,01 nM	36,73 nM	45,11 nM	10,84 nM	18,93 nM

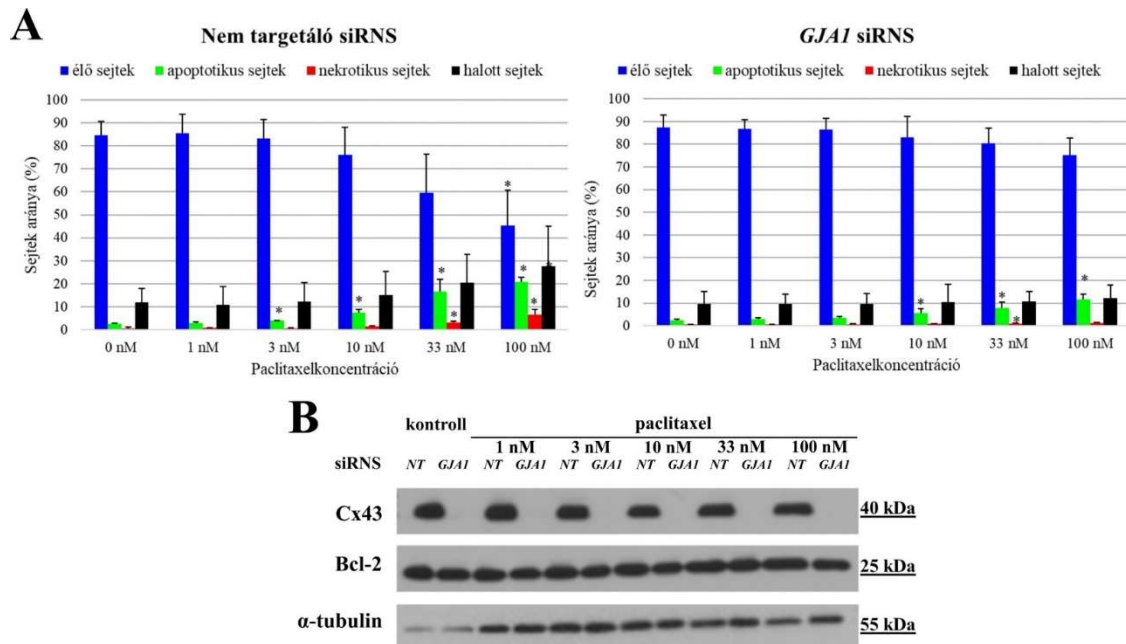
10. ábra: Paclitaxel hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére *GJA1* géncsendesítést követően. A nem targetáló siRNS-t termelő és a *GJA1* siRNS-sel géncsendesített Detroit 562, FaDu és SCC25 sejteket három független kísérletben, több koncentrációban (100 nM-ról induló ötpontos harmadoló hígítás) kezeltük paclitaxellel 48 órán keresztül. A kezelést követően tripánkékkizárásos módszerrel meghatároztuk az élősejtszámot. **(A)** IC₅₀ görbék paclitaxelkezelés esetén Detroit 562, FaDu és SCC25 sejtvonalakon. A görbék három független kísérlet eredményének átlagait és szórásait ábrázolják. **(B)** IC₅₀ értékek paclitaxelkezelés esetén Detroit 562, FaDu és SCC25 sejtvonalakon. Az IC₅₀ értékeket három független mérés átlagaként határoztuk meg. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, *p<0,05.

A tripánkékkizárásos sejtszámolás alapján a *GJAI* siRNS alkalmazása nem változtatta meg szignifikánsan a paclitaxel életképességre gyakorolt hatását egyik sejtvonal esetében sem. A Detroit 562 esetén nem tapasztaltunk különbséget a nem targetáló és a *GJAI* siRNS-sel kezelt sejtek között, a FaDu és az SCC25 esetén azonban az IC₅₀ koncentráció enyhe növekedése figyelhető meg. Vagyis a *GJAI* géncsendesítés hatására kissé romlik a paclitaxel hatása (10. ábra).



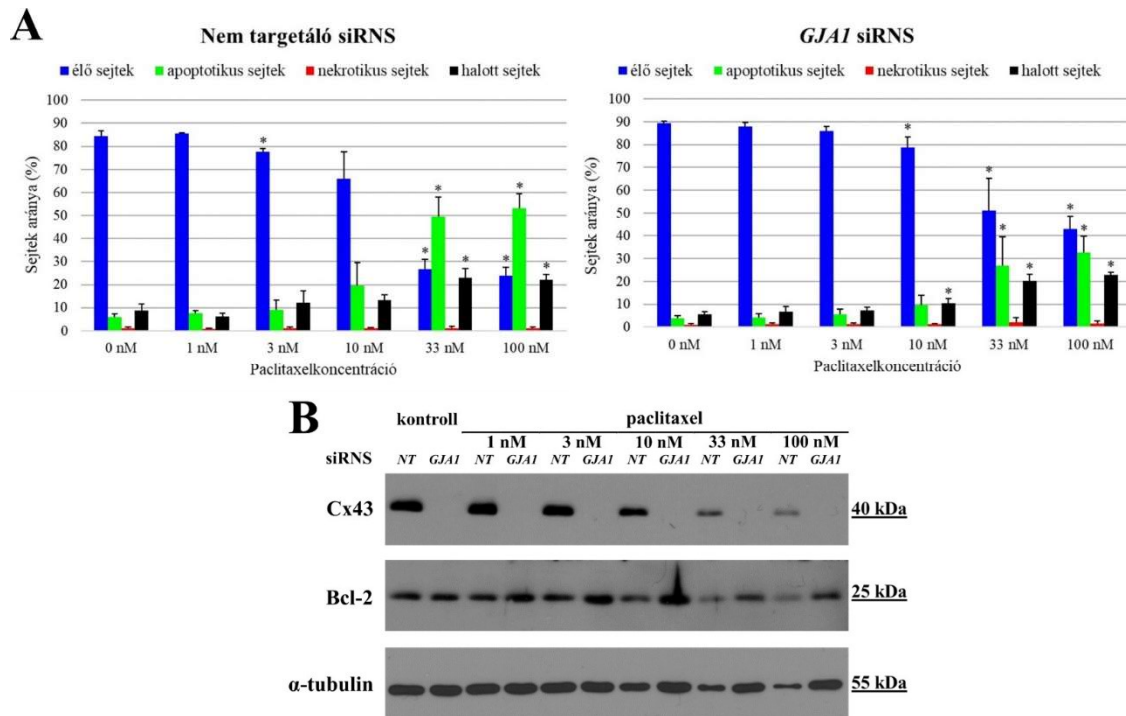
11. ábra: A *GJAI* géncsendesítés hatása a paclitaxel által indukált apoptózisra Detroit 562 sejtvonalban. (A) A nem targetáló és a *GJAI* siRNS-sel géncsendesített Detroit 562 sejteket három független kísérletben, több koncentrációban (100 nM-ról induló ötponthoz harmadoló hígítással) kezeltük paclitaxellel 48 órán keresztül. A kezelést követően az Annexin V-FLUOS/ propídium-jodiddal (Ann/PI) festett sejteket FACS segítségével elemeztük. Az élő sejtek az Ann⁻/PI⁻, az apoptotikus sejtek az Ann⁺/PI⁻, a nekrotikus sejtek az Ann⁻/PI⁺, míg a halott sejtek az Ann⁺/PI⁺ frakciókat jelentik. A grafikonokon három független kísérlet eredményeinek átlagai és szórásai szerepelnek. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, *p<0,05. (B) A Detroit 562 sejtekben a *GJAI* siRNS hatására bekövetkező fehérjeexpressziós változásokat Western blot módszerrel határoztuk meg, kontroll fehérjeként α -tubulint alkalmaztunk. NT: nem targetáló siRNS.

A Detroit 562 sejtvonal esetében nem targetáló siRNS-sel végzett kezelést követően az apoptózis arányának csak kismértékű emelkedése figyelhető meg növekvő paclitaxelkoncentráció hatására. Ez a növekedés a legmagasabb koncentrációnál sem szignifikáns ($p > 0,05$). Ezek az eredmények megegyeznek a csak paclitaxelkezelésen átesett sejtek adataival. A *GJAI* siRNS-kezelés hatására nem tapasztaltunk eltérést (11. ábra).



12. ábra: A *GJAI* géncsendesítés hatása a paclitaxel által indukált apoptózisra *FaDu* sejtvonalban. (A) A nem targetáló és a *GJAI* siRNS-sel géncsendesített *FaDu* sejteket három független kísérletben, több koncentrációban (100 nM-ról induló ötpontos harmadoló hígítással) kezeltük paclitaxellel 48 órán keresztül. A kezelést követően az Annexin V-FLUOS/ propídium-jodiddal (Ann/PI) festett sejteket FACS segítségével elemeztük. Az élő sejtek az Ann⁻/PI⁻, az apoptotikus sejtek az Ann⁺/PI⁻, a nekrotikus sejtek az Ann⁺/PI⁺, míg a halott sejtek az Ann⁺/PI⁺ frakciókat jelentik. A grafikonokon három független kísérlet eredményeinek átlagai és szórásai szerepelnek. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, * $p < 0,05$. (B) A *FaDu* sejtekben a *GJAI* siRNS hatására bekövetkező fehérjeexpressziós változásokat Western blot módszerrel határoztuk meg, kontroll fehérjeként α -tubulint alkalmaztunk. NT: nem targetáló siRNS.

Az apoptózis arányának csekély mértékű növekedését figyeltük meg a FaDu sejtvonal esetén is. Az apoptotikus sejtek aránya a paclitaxelkoncentráció emelésével növekedett, hasonlóan a csak paclitaxelkezelésen átesett sejteknél mért értékekhez. A *GJAI* siRNS-kezelés hatására a nem targetáló siRNS-hez képest csökken az apoptotizáló sejtek aránya magasabb paclitaxelkoncentráció esetén, azonban ez a változás egyik esetben sem szignifikáns (12. ábra).



13. ábra: A *GJAI* géncsendesítés hatása a paclitaxel által indukált apoptózisra SCC25 sejtvonalban. (A) A nem targetáló és a *GJAI* siRNS-sel géncsendesített SCC25 sejteket három független kísérletben, több koncentrációban (100 nM-ról induló ötponthoz harmadoló hígítással) kezeltük paclitaxellel 48 órán keresztül. A kezelést követően az Annexin V-FLUOS/ propidium-jodiddal (Ann/PI) festett sejteket FACS segítségével elemeztük. Az élő sejtek az Ann⁻/PI⁻, az apoptotikus sejtek az Ann⁺/PI⁻, a nekrotikus sejtek az Ann⁻/PI⁺, míg a halott sejtek az Ann⁺/PI⁺ frakciókat jelentik. A grafikonokon három független kísérlet eredményeinek átlagai és szórásai szerepelnek. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, * $p < 0,05$. (B) Az SCC25 sejtekben a *GJAI* siRNS hatására bekövetkező fehérjeexpressziós változásokat Western blot módszerrel határoztuk meg, kontroll fehérjeként α -tubulint alkalmaztunk. NT: nem targetáló siRNS.

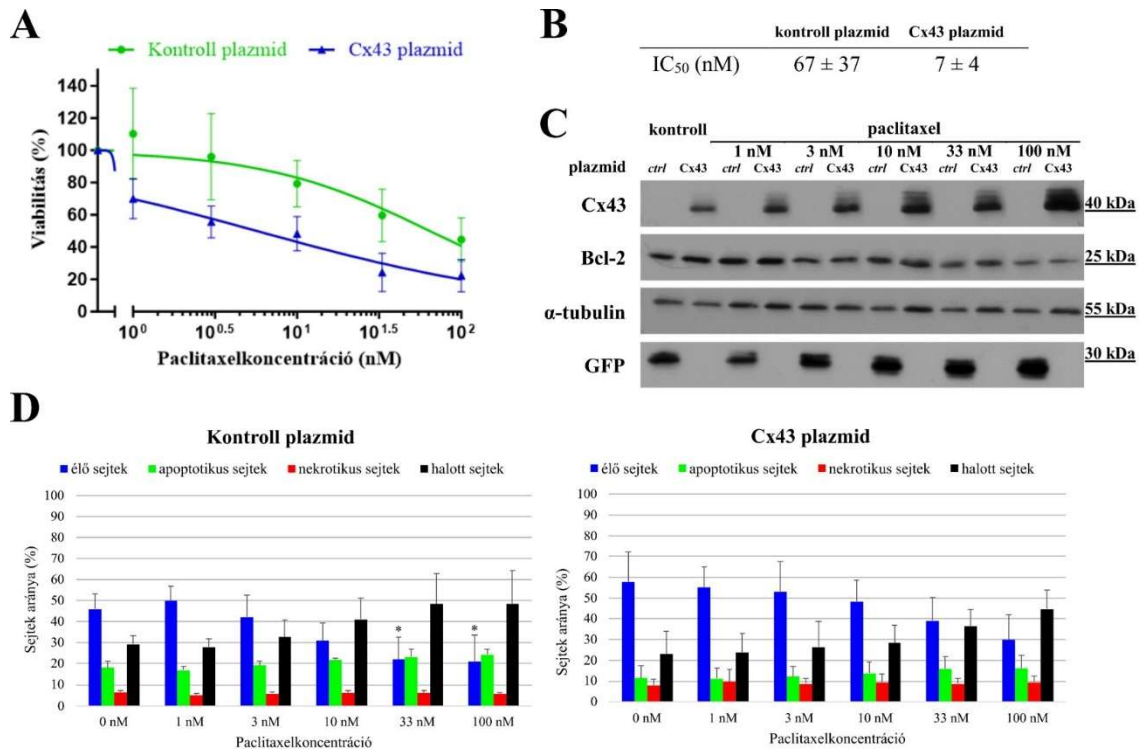
Az SCC25 sejtvonal esetében nem targetáló siRNS-kezelést követően az apoptózis arányának jelentős növekedése látható, ami szintén megegyezik a korábbi mérések tapasztalataival. A *GJAI* siRNS-sel kezelt mintákban az apoptotikus sejtek aránya számottevően csökkent a nem targetáló siRNS-sel kezelt mintákhoz képest valamennyi paclitaxelkoncentráció esetén. Ez a csökkenés szignifikáns volt a legmagasabb koncentrációban kezelt mintáknál ($p=0,02$). Vagyis a *GJAI* géncsendesítés csökkentette a paclitaxel apoptózisra gyakorolt hatását az SCC25 sejtvonalban. Ezzel együtt a Cx43 expressziója a *GJAI* siRNS hatására minden esetben csökkent, ami a Bcl-2-expresszió növekedését eredményezte (13. ábra).

5.1.6. A Cx43-expresszió növelésének hatása a paclitaxelérzékenységre FaDu sejtvonalban

A Cx43-expresszió növelésének következményét az életképességre tripánkékkizárásos módszerrel vizsgáltuk, míg az apoptózisra gyakorolt hatásának megállapítására áramlási citometriás (FACS) kísérleteket végeztünk. Mivel a transzfekció a Detroit 562 és az SCC25 sejteken sikertelen volt, a kísérleteket csak a FaDu sejtekkel hajtottuk végre.

A kontroll és a Cx43 plazmiddal transzfektált FaDu sejteket három független kísérletben, több koncentrációban (100 nM-ról induló öt pontos harmadoló hígítás) kezeltük paclitaxellel 48 órán keresztül. A kezelést követően tripánkékkizárásos módszerrel meghatároztuk az élősejtszámot. Majd ugyanezen mintákat Annexin V-FLUOS és propídium-jodid kettős festéssel FACS segítségével vizsgáltuk tovább. Az Annexin-(Ann) és a propídium-jodid-(PI) pozitivitás alapján négy populációt különítettünk el: élő, apoptotikus, nekrotikus és halott sejtek.

A tripánkékkizárásos sejtszámolás alapján a Cx43 plazmiddal végzett transzfekció érzékenyebbé tette a FaDu sejteket paclitaxellel szemben. Vagyis a kontroll plazmidhoz képest a Cx43 plazmid esetén kisebb volt az élő sejtszám valamennyi paclitaxelkoncentráció mellett. Ugyanez figyelhető meg az IC_{50} értékek esetén is, a Cx43 plazmid alkalmazásakor csökkent az IC_{50} érték. Az áramlási citometriás mérések alapján a Cx43 plazmiddal végzett transzfekció nem változtatta meg szignifikánsan a paclitaxel apoptózisra gyakorolt hatását a FaDu sejtvonalban (14. ábra).



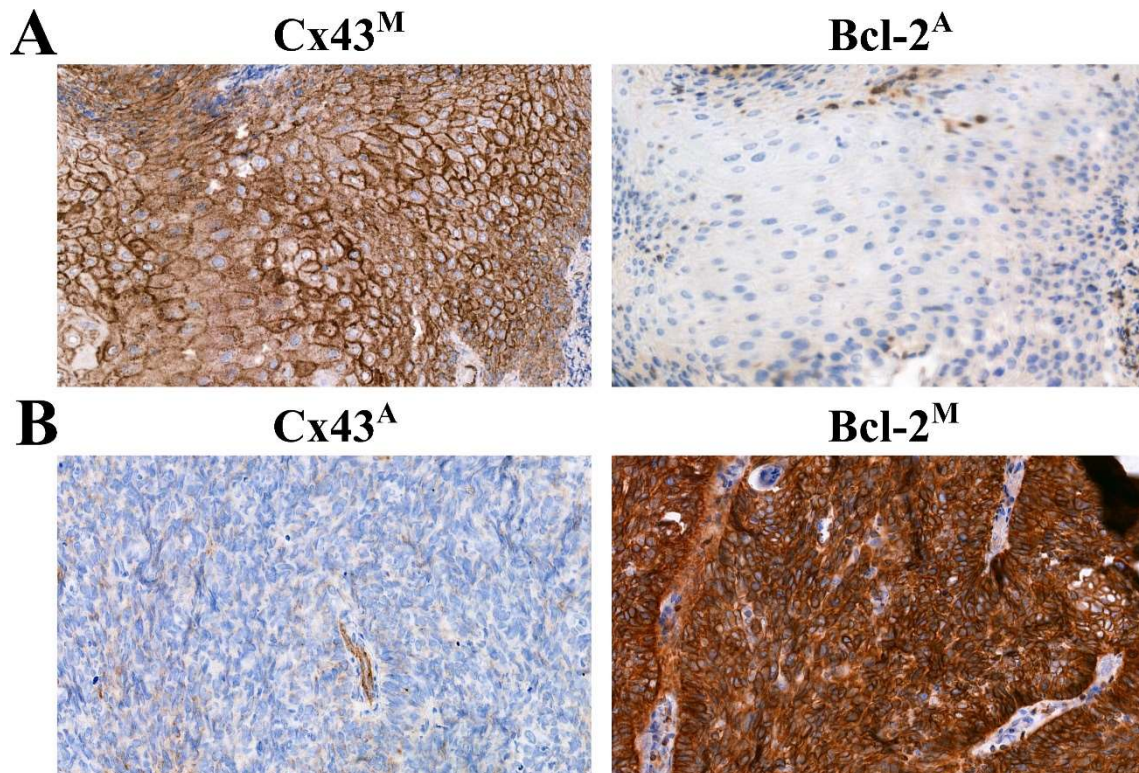
14. ábra: Paclitaxel hatása FaDu sejtvonal életképességére Cx43 transzfekciót követően, valamint a Cx43 transzfekció hatása a paclitaxel által indukált apoptózisra FaDu sejtvonalban. A kontroll és a Cx43 plazmiddal transzfektált FaDu sejteket három független kísérletben, több koncentrációban (100 nM-ról induló ötponthoz harmadoló hígítás) kezeltük paclitaxellel 48 órán keresztül. A kezelést követően tripánkékkizárási módszerrel meghatároztuk az élősejtszámot. **(A)** IC₅₀ görbék paclitaxelkezelés esetén FaDu sejtvonalon. A görbék három független kísérlet eredményeinek átlagait és szórásait ábrázolják. **(B)** IC₅₀ értékek paclitaxelkezelés esetén FaDu sejtvonalon. Az IC₅₀ értékeket három független mérés átlagaként határoztuk meg. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, *p<0,05. **(C)** A FaDu sejtekben a Cx43 plazmid hatására bekövetkező fehérjeexpressziós változásokat Western blot módszerrel határoztuk meg, kontroll fehérjeként α-tubulint alkalmaztunk. A transzfekció sikerességének megállapítására GFP-t használtunk. *ctrl*: kontroll plazmid. **(D)** A kezelést követően az Annexin V-FLUOS/propidium-jodiddal (Ann/PI) festett sejteket FACS segítségével elemeztük. Az élő sejtek az Ann⁻/PI⁻, az apoptotikus sejtek az Ann⁺/PI⁻, a nekrotikus sejtek az Ann⁻/PI⁺, míg a halott sejtek az Ann⁺/PI⁺ frakciókat jelentik. A grafikonokon három független kísérlet eredményeinek átlagai és szórásai szerepelnek. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, *p<0,05.

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

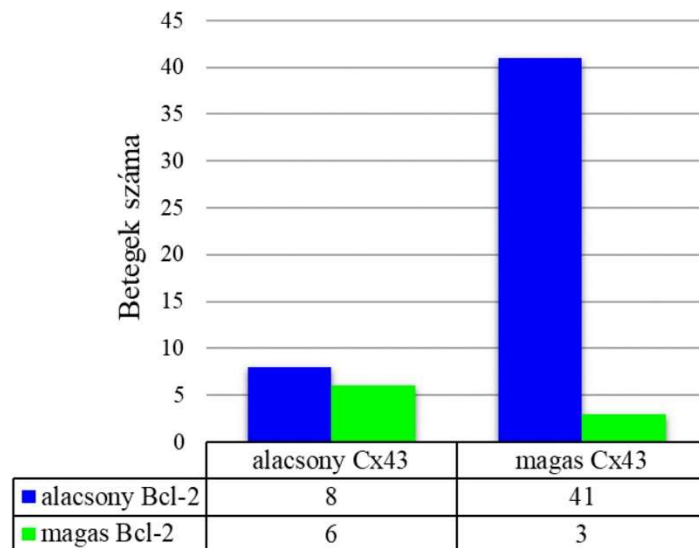
A Cx43 és a Bcl-2 fehérjék immunhisztokémiai vizsgálata 97 páciens szövettani mintája közül 58 esetében volt értékelhető. 44 (75,9%) esetben láttuk a Cx43 fehérje magas expresszióját (Cx43^M). A Cx43 státusz összefüggést mutatott a betegség-specifikus túléléssel (DSS, $p=0,024$), az alacsony Cx43-expresszió (Cx43^A) rosszabb túléléssel társult. Nem mutattunk ki összefüggést a Cx43-expresszió és a tumor lokalizációja ($p=0,779$), a tumor mérete ($p=0,824$), a stádium ($p=0,638$), a nyirokcsomóáttét ($p=0,351$) és a neoadjuváns kemoterápiára adott válasz ($p>0,05$) között.

A szövettani minták közül 9 (15,5%) esetben tapasztaltunk magas Bcl-2-expressziót (Bcl-2^M). Nem mutattunk ki összefüggést a Bcl-2-expresszió és a betegség-specifikus túlélés (DSS, $p=0,21$), a tumor lokalizációja ($p=0,531$), a tumor mérete ($p=0,136$), a stádium ($p=0,748$), a nyirokcsomóáttét ($p=0,111$) és a neoadjuváns kemoterápiára adott válasz ($p=0,544$) között. Megfigyeltük, hogy az alacsony Bcl-2-expresszió (Bcl-2^A) rosszabb túléléssel társul szájüregi lokalizáció esetén, azonban ez az összefüggés nem bizonyult szignifikánsnak ($p=0,056$). További érdekes észrevétel, hogy nyirokcsomóáttét gyakrabban fordult elő magas Bcl-2-expresszió esetén (9 Bcl-2^M esetből 7 betegnél volt nyirokcsomóáttét).

A Cx43- és Bcl-2-expresszió együttes jelenlétét is megvizsgáltuk. Cx43^A + Bcl-2^A 8 (13,8%), Cx43^M + Bcl-2^A 41 (70,7%), Cx43^A + Bcl-2^M 6 (10,3%), míg Cx43^M + Bcl-2^M 3 (5,2%) fordult elő. Egy-egy tipikus Cx43^M + Bcl-2^A és Cx43^A + Bcl-2^M szövettani minta immunhisztokémiai felvételei a 15. ábrán láthatók. A Cx43 és a Bcl-2 expressziója között szignifikáns összefüggést mutattunk ki: az alacsony Cx43-expresszió magas Bcl-2-expresszióval járt együtt ($p=0,013$). Ez a megállapítás arra utal, hogy a Cx43-negatív tumorok gyakrabban overexpresszálják a Bcl-2 fehérjét, mint a Cx43-pozitív daganatok (16. ábra). Nem mutattunk ki összefüggést a Cx43 és a Bcl-2 együttes expressziója és a betegség-specifikus túlélés (DSS, $p>0,05$), a tumor lokalizációja ($p=0,904$), a tumor mérete ($p=0,687$), a stádium ($p=0,924$), a nyirokcsomóáttét ($p=0,43$) és a neoadjuváns kemoterápiára adott válasz ($p>0,05$) között.



15. ábra: *Reprezentatív mikroszkópos felvétel a Cx43 és a Bcl-2 fehérjék immunhisztokémiai festéséről. (A) Magas Cx43 (Cx43^M) és alacsony Bcl-2 (Bcl-2^A) fehérjeexpressziót mutató szövettani minta. (B) Alacsony Cx43 (Cx43^A) és magas Bcl-2 (Bcl-2^M) fehérjeexpressziót mutató szövettani minta (nagyítás: 40x).*



16. ábra: *A betegek megoszlása a Cx43 és a Bcl-2 immunhisztokémia szerint. A csoportok összehasonlítását Fisher-féle χ^2 próbával végeztük (p=0,013).*

5.2. Potenciális terápiás célpontok azonosítása fej-nyaki tumorokban

5.2.1. EGFR-gátlók hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére

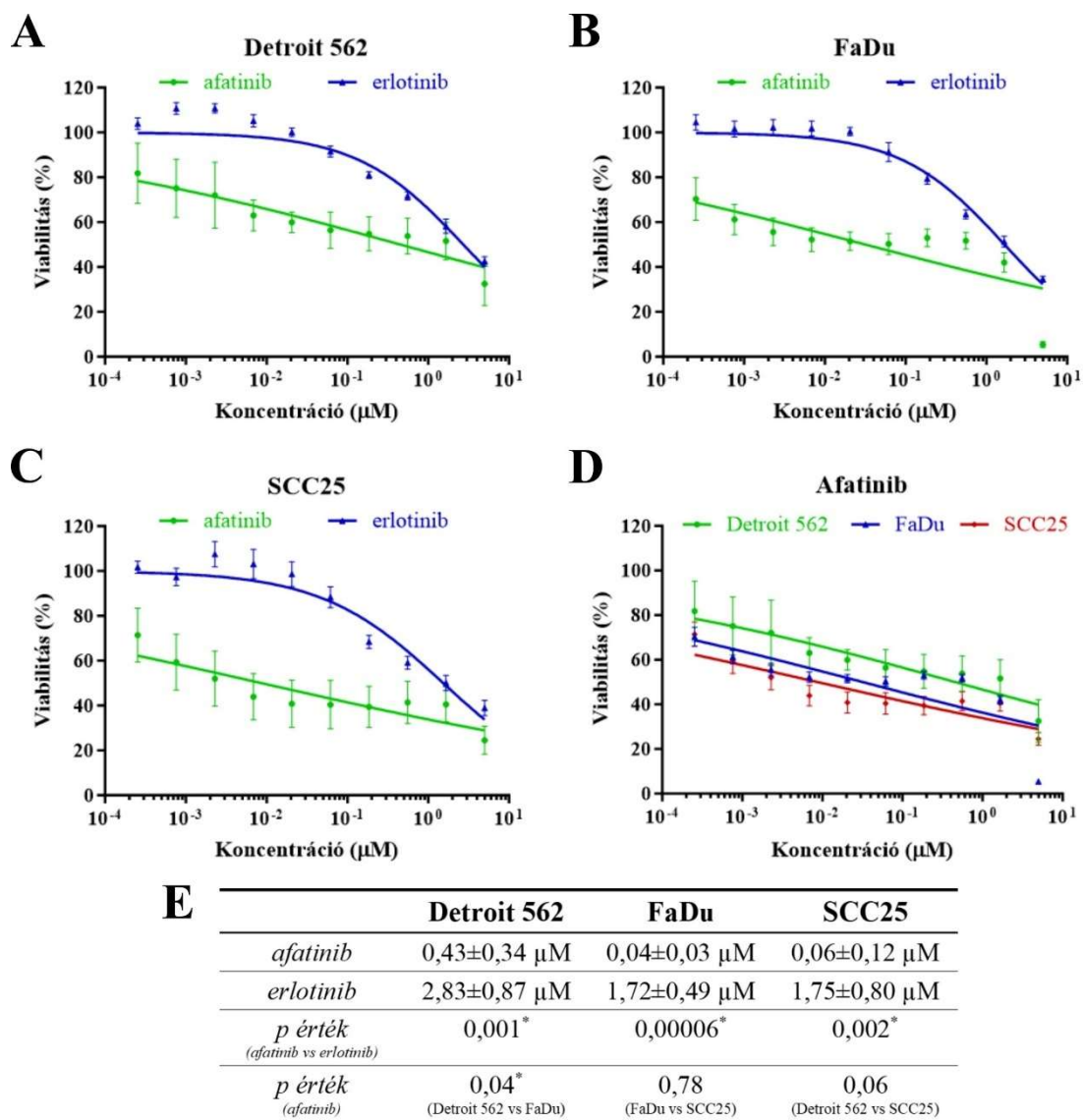
A sejtek erlotinib- és afatinibérzékenységét MTT módszer segítségével vizsgáltuk. Több párhuzamos kísérletet végeztünk, amelyek során különböző koncentrációkban (5 μ M-ról induló tízpontos harmadoló hígítás) kezeltük a sejteket erlotinibbel és afatinibbel 72 órán keresztül.

Eredményeink alapján mindkét EGFR-gátló dózisfüggő módon csökkentette a sejtek életképességét, azonban az afatinib erősebb gátló hatást fejtett ki, mint az erlotinib. Az afatinib már a legkisebb alkalmazott koncentrációban (0,25 nM) csökkentette a viabilitást, míg az erlotinib esetében ez 62 nM-nál történt meg mindhárom sejtvonalnál. Sem az erlotinib, sem az afatinib nem okozott teljes sejtpusztulást a legmagasabb koncentrációban sem a Detroit 562 és az SCC25 sejtvonalak esetében, azonban az afatinib 5 μ M-os koncentrációban szinte teljesen elpusztította a FaDu sejteket. Szignifikáns különbséget figyeltünk meg a két EGFR-gátló hatása között valamennyi sejtvonalnál. A FaDu és az SCC25 sejtek mindkét EGFR-gátlóra érzékenyebbek voltak, mint a Detroit 562 sejtek, ami arra utal, hogy a Detroit 562 sejtek kevésbé függenek az EGFR-jelátviteltől (17. ábra).

5.2.2. MEK-gátlók hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére

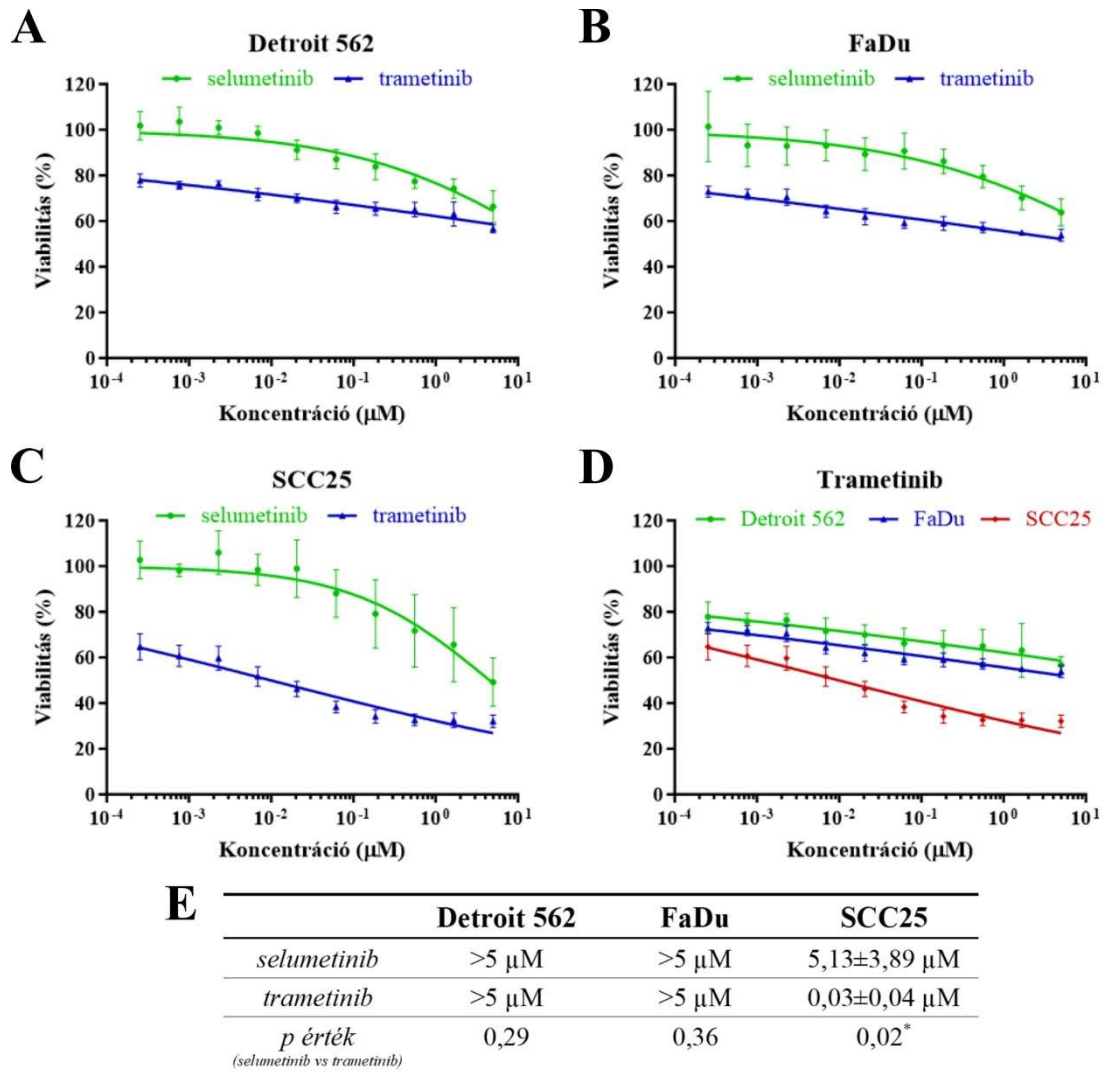
A sejtek selumetinib- és trametinibérzékenységét MTT módszer segítségével vizsgáltuk. Több párhuzamos kísérletet végeztünk, amelyek során különböző koncentrációkban (5 μ M-ról induló tízpontos harmadoló hígítás) kezeltük a sejteket selumetinibbel és trametinibbel 72 órán keresztül.

A selumetinib- vagy trametinibkezelés csak kis mértékben csökkentette a Detroit 562 és a FaDu sejtek életképességét. Ezzel szemben az SCC25 sejtek mindkét MEK-gátlóra meglehetősen érzékenyek voltak. A trametinib szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult SCC25 sejteken, mint a selumetinib, utóbbi csak magasabb koncentrációknál fejtett ki jelentős életképességgátló hatást. Bár az SCC25 sejtek érzékenyek bizonyultak MEK-gátlással szemben, egyik kezelőszer sem pusztította el az összes tumorsejtet a legmagasabb koncentrációban sem (18. ábra).



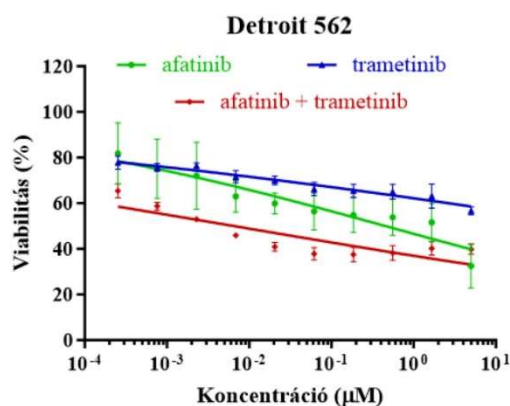
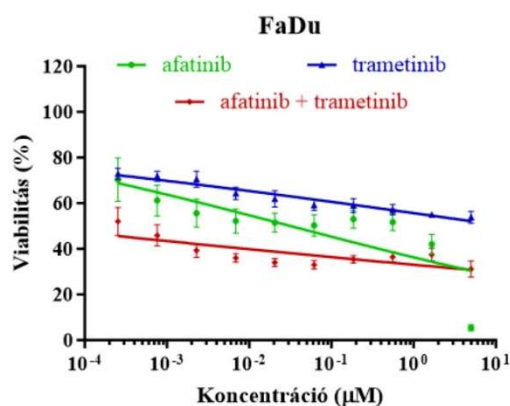
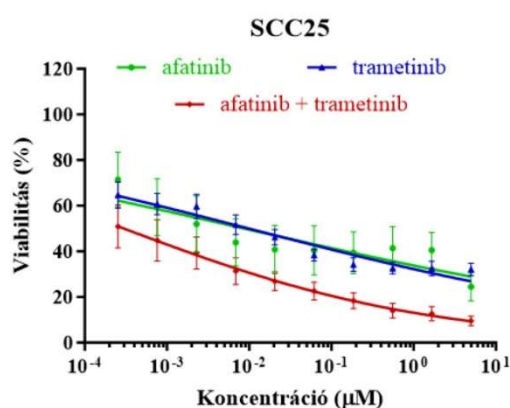
17. ábra: EGFR-gátlók hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére.

Öt párhuzamos kísérletet végeztünk, amelyek során több koncentrációban (5 μ M-ról induló tízpontos harmadoló hígítás) kezeltük a Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejteket afatinibbel és erlotinibbel 72 órán keresztül. IC₅₀ görbék afatinib- és erlotinibkezelések esetén **(A)** Detroit 562, **(B)** FaDu és **(C)** SCC25 sejtvonalakon. Az afatinibkezelés IC₅₀ görbéit mindhárom fej-nyaki tumorsejtvonal esetén a jobb összehasonlíthatóság érdekében egy diagramon **(D)** is ábrázoltuk. A görbék öt független kísérlet eredményeinek átlagait és szórásait ábrázolják. **(E)** IC₅₀ értékek afatinib- és erlotinibkezelések esetén Detroit 562, FaDu és SCC25 sejtvonalakon. Az IC₅₀ értékeket öt független mérés átlagaként határoztuk meg. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, * $p < 0,05$.



18. ábra: MEK-gátlók hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére.

Öt párhuzamos kísérletet végeztünk, amelyek során több koncentrációban (5 μM -ról induló tízpontos harmadoló hígítás) kezeltük a Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejteket selumetinibbel és trametinibbel 72 órán keresztül. IC₅₀ görbék selumetinib- és trametinibkezelések esetén **(A)** Detroit 562, **(B)** FaDu és **(C)** SCC25 sejtvonalakon. A trametinibkezelés IC₅₀ görbéit mindhárom fej-nyaki tumorsejtvonal esetén a jobb összehasonlíthatóság érdekében egy diagramon **(D)** is ábrázoltuk. A görbék öt független kísérlet eredményeinek átlagait és szórásait ábrázolják. **(E)** IC₅₀ értékek selumetinib- és trametinibkezelések esetén Detroit 562, FaDu és SCC25 sejtvonalakon. Az IC₅₀ értékeket öt független mérés átlagaként határoztuk meg. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, *p<0,05.

A**B****C****D**

Detroit 562			
IC ₅₀ érték (μM)			CI
afatinib	trametinib	afatinib + trametinib	afatinib + trametinib
0,43±0,34	>5,0	0,009±0,007	0,0082
FaDu			
IC ₅₀ érték (μM)			CI
afatinib	trametinib	afatinib + trametinib	afatinib + trametinib
0,04±0,03	>5,0	0,001±0,002	0,00029
SCC25			
IC ₅₀ érték (μM)			CI
afatinib	trametinib	afatinib + trametinib	afatinib + trametinib
0,06±0,12	0,03±0,04	0,003±0,006	0,045

19. ábra: EGFR-gátló (afatinib) és MEK-gátló (trametinib) kombinációjának hatása fej-nyaki tumorsejtvonalak életképességére. Öt párhuzamos kísérletet végeztünk, amelyek során több koncentrációban (5 μM-ról induló tízpontos harmadoló hígítás) kezeltük a Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejteket afatinib + trametinib 1:1 arányú kombinációjával 72 órán keresztül. IC₅₀ görbék afatinib, trametinib és afatinib + trametinib kombinációs kezelések esetén **(A)** Detroit 562, **(B)** FaDu és **(C)** SCC25 sejtvonalakon. **(D)** IC₅₀ értékek és kombinációs indexek (CI) afatinib, trametinib és afatinib + trametinib kezelések esetén Detroit 562, FaDu és SCC25 sejtvonalakon. Az IC₅₀ értékeket öt független mérés átlagaként határoztuk meg. A Compusyn programmal generált kombinációs indexek CI<0,75 esetén szinergizmust, 0,75<CI<1,25 additív hatást, míg CI>1,25 antagonizmust jelölnek.

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

A kombinációs kísérleteinkhez a hatásosabb EGFR- és MEK-gátlót, az afatinibet és a trametinibet választottuk ki. A sejtek afatinib + trametinibérzékenységét MTT módszer segítségével vizsgáltuk. Több párhuzamos kísérletet végeztünk, amelyek során különböző koncentrációkban (5 μM -ról induló tízpontos harmadoló hígítás) kezeltük a sejteket afatinib + trametinib 1:1 arányú kombinációjával 72 órán keresztül.

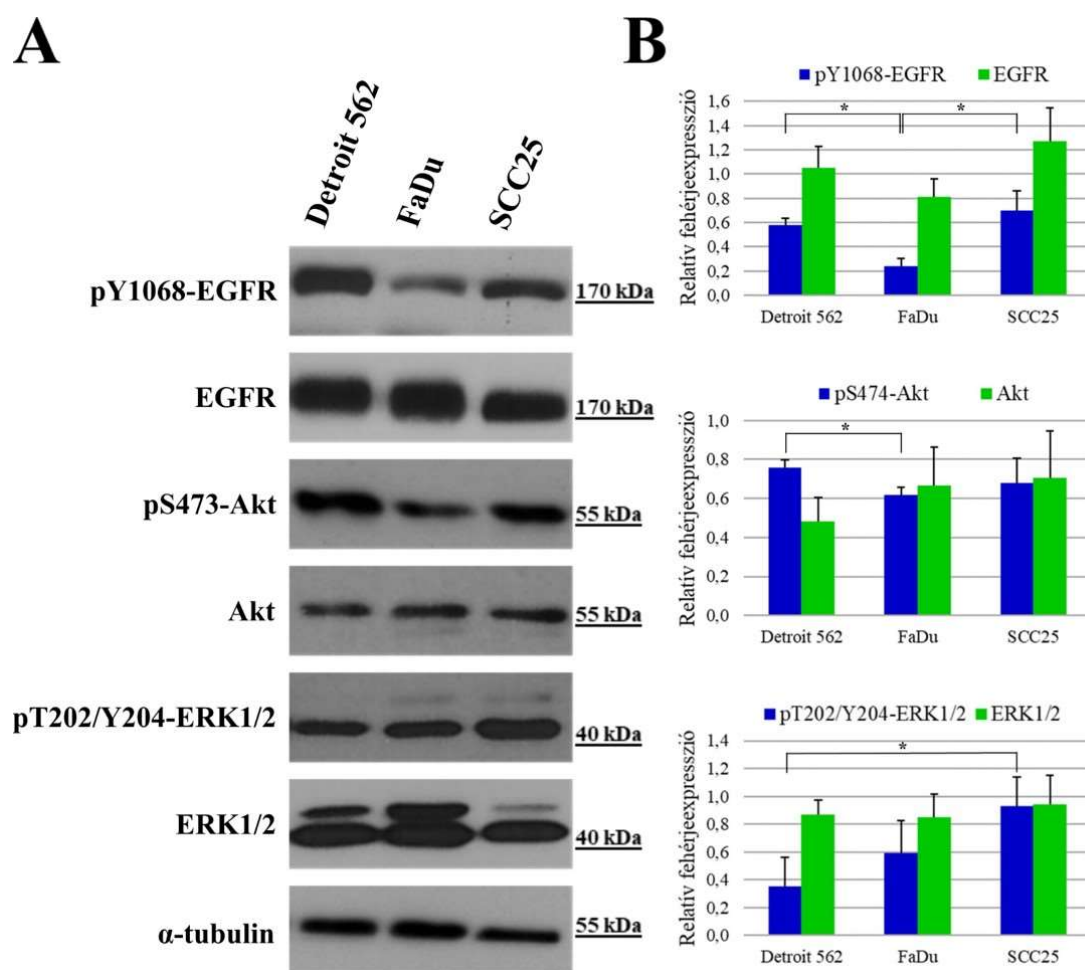
Erős szinergista hatást figyeltünk meg a kombinációs kezelés használatakor mindhárom sejtvonal esetén. A Detroit 562 sejtekre az afatinib + trametinib kombináció erősebb gátló hatást gyakorolt, mint a trametinib önmagában. Az afatinibbel összehasonlítva ugyanez a különbség csak szűk koncentrációtartományban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

5.2.4. Fehérjeexpresszió és -foszforiláció fej-nyaki tumorsejtvonalakban

A kiválasztott fej-nyaki tumorsejtvonalakban vizsgáltuk az EGFR, valamint két, az EGFR által aktivált fontos kináz, az Akt és az ERK1/2 expressziós és foszforilációs szintjét. A lehetséges foszforilálható oldalláncok közül az EGFR esetében az Y1068-as autofoszforilációs helyet választottuk, mivel a leggyakrabban ez felel a MEK/ERK útvonal aktiválásáért. Az ERK1/2 esetében a T202/Y204, az Akt fehérjénél pedig az S473 foszforilációs helyet választottuk, mert többnyire ezek vesznek részt az említett jelátviteli utak aktiválásában.

Nem találtunk szignifikáns eltérést a három sejtvonal EGFR-, Akt- és ERK1/2-expressziójában ($p > 0,05$). Jelentős eltéréseket tapasztaltunk azonban a foszforilációs szintek vizsgálatakor. A pY1068-EGFR szintje szignifikánsan kisebb volt a FaDu

sejtekben, mint a másik két sejtvonalban (Detroit 562: $p=0,002$ és SCC25: $p=0,011$). A pS473-Akt mennyisége a Detroit 562 sejtekben szignifikánsan nagyobbak bizonyult, mint a FaDu sejtekben ($p=0,013$). A pT202/Y204-ERK1/2 szintje pedig az SCC25 sejtekben szignifikánsan magasabb volt, mint a Detroit 562 sejtekben ($p=0,028$). Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a Detroit 562 sejtekben a PI3K/Akt útvonal aktívabb, míg az SCC25 sejtekben a MEK/ERK út az erősebb. Az eredmények azt is valószínűsítik, hogy a FaDu sejtekben ez a két jelátviteli út hasonló intenzitással működik (20. ábra).



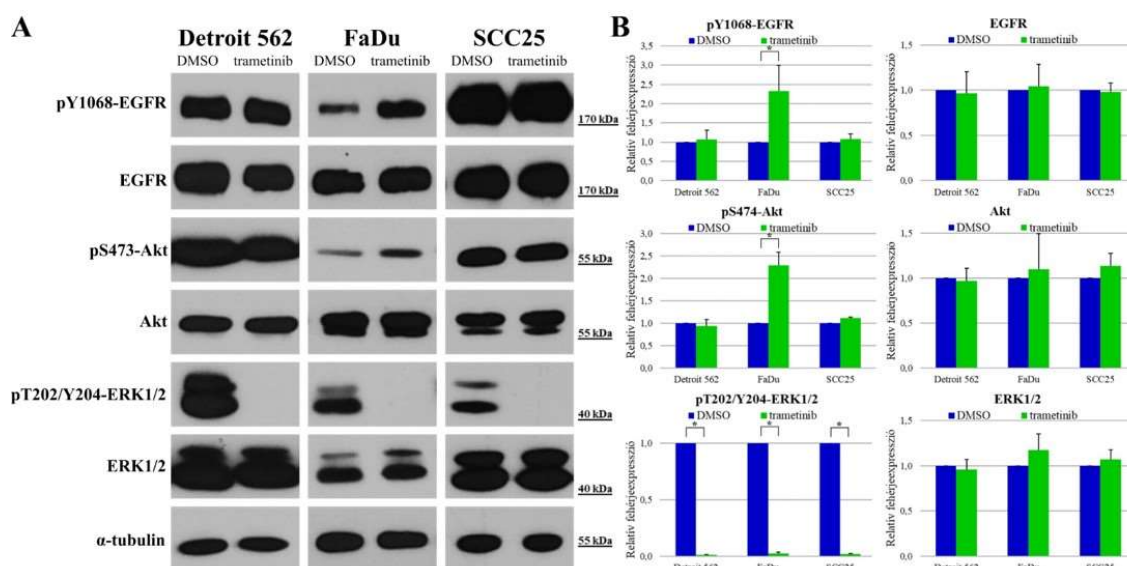
20. ábra: Fehérjeexpresszió és -foszforiláció fej-nyaki tumorsejtvonalakban.

(A) A Detroit 562, a FaDu és az SCC25 sejtekben a pY1068-EGFR, EGFR, pS473-Akt, Akt, pT202/Y204-ERK1/2 és ERK1/2 fehérjéket Western blot módszerrel vizsgáltuk, és kontroll fehérjeként α -tubulint alkalmaztunk. (B) A vizsgált fehérjék mennyiségét denzitometrálassal hasonlítottuk össze. Mindhárom sejtvonalnál valamennyi fehérje szintjét az α -tubulin mennyiségére normalizáltuk. A grafikonokon három független kísérlet eredményeinek átlagai és szórásai szerepelnek. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, * $p < 0,05$.

5.2.5. MEK-gátlás hatása a fehérjefoszforilációra fej-nyaki tumorsejtvonalakban

A sejtvonalak expressziós és foszforilációs profiljának meghatározása után megvizsgáltuk a trametinib hatását a fehérjék mennyiségére, valamint az EGFR, az Akt és az ERK1/2 releváns foszforilációs szintjére.

Trametinib hatására mindhárom sejtvonal esetén az ERK1/2-foszforiláció szignifikáns csökkenését figyeltük meg (Detroit 562: $p=9 \cdot 10^{-9}$, FaDu: $p=5 \cdot 10^{-8}$, SCC25: $p=9 \cdot 10^{-9}$). Érdekes módon a FaDu sejtekben az ERK1/2 aktivitásának csökkenésével a pY1068-EGFR ($p=0,03$) és a pS473-Akt ($p=0,003$) szintje jelentősen emelkedett, ami egy korábban vastagbél- és hasnyálmirigy-tumor sejtekben leírt visszacsatolási mechanizmus jelenlétére utal. Ezt a jelenséget a Detroit 562 és az SCC25 sejtekben nem észleltük (21. ábra).

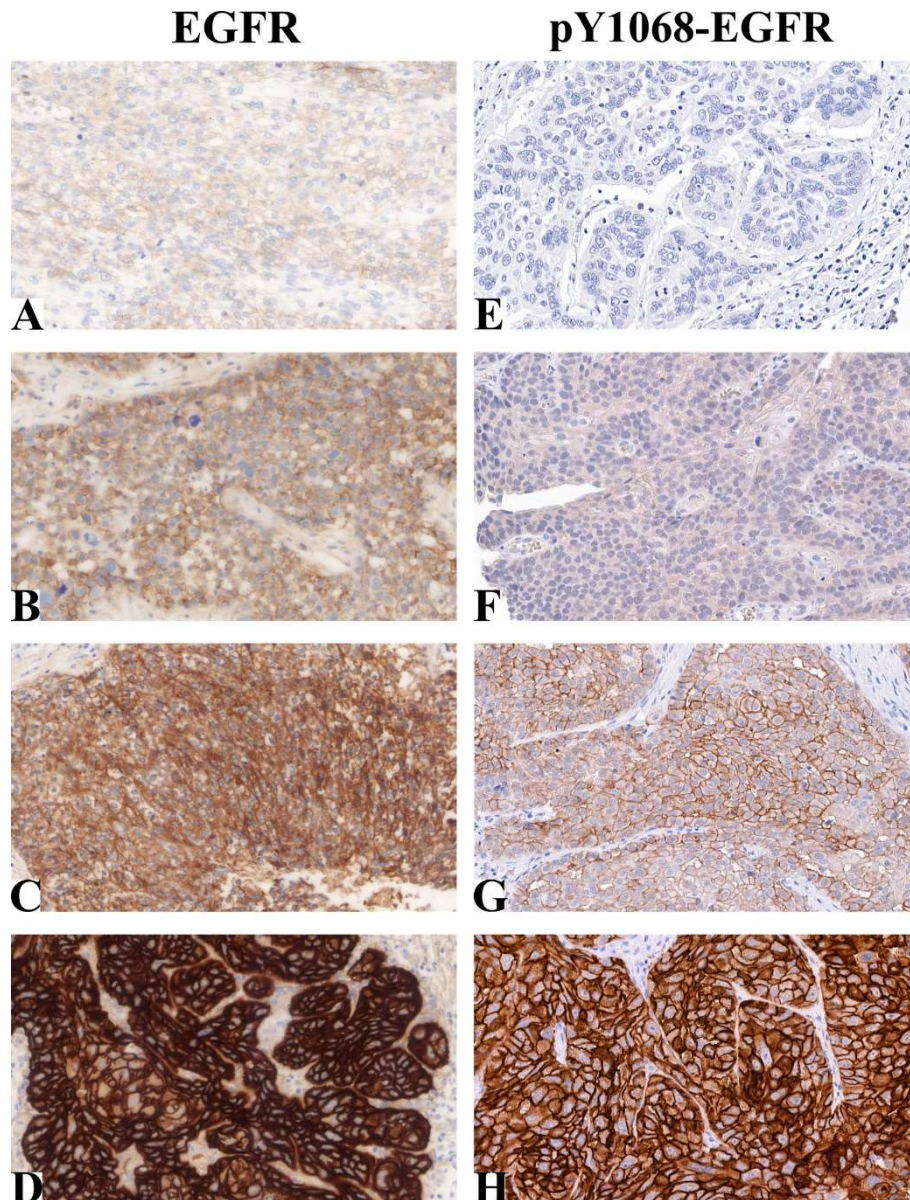


21. ábra: Trametinibkezelés hatására bekövetkező változások a fehérjék expressziójában és foszforilációjában fej-nyaki tumorsejtvonalakban.

(A) A kezelt sejtekben a pY1068-EGFR, EGFR, pS473-Akt, Akt, pT202/Y204-ERK1/2 és ERK1/2 fehérjéket Western blot módszerrel vizsgáltuk, és kontroll fehérjeként α -tubulint alkalmaztunk. (B) A vizsgált fehérjék Detroit 562, FaDu és SCC25 sejtekben trametinibkezelés hatására bekövetkező mennyiségi változását denzitometrával elemeztük. Mindhárom sejtvonalnál valamennyi fehérje szintjét az α -tubulin mennyiségére normalizáltuk, és a saját DMSO kontrolljához viszonyítottuk. A grafikonokon három független kísérlet eredményeinek átlagai és szórásai szerepelnek. A statisztikai vizsgálatot Student-féle t-próbával végeztük, $*p < 0,05$.

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

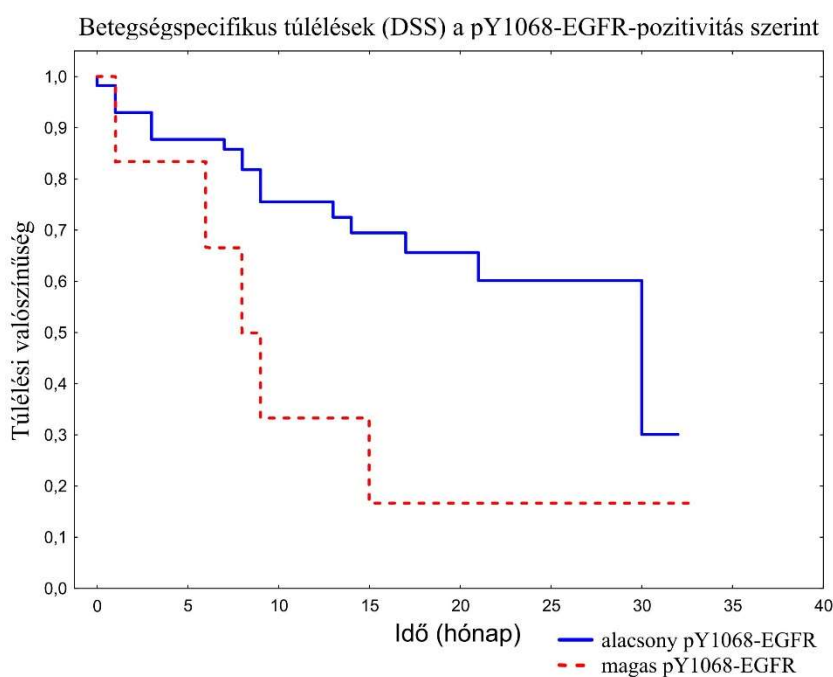
97 páciens szövettani mintája közül az EGFR immunhisztokémiai vizsgálata 84, a pY1068-EGFR-é pedig 63 esetében volt értékelhető. Tipikus alacsony és magas EGFR-expressziójú, valamint kis és nagy pY1068-EGFR-mennyiségű szövettani minták immunhisztokémiai felvételei láthatók a 22. ábrán.



22. ábra: *Reprezentatív mikroszkópos felvétel az EGFR és a pY1068-EGFR immunhisztokémiai festéséről. (A) Negatív, (B) alacsony, (C) közepes és (D) magas EGFR-expressziót mutató szövettani minták. (E) Negatív, (F) alacsony, (G) közepes és (H) magas pY1068-EGFR-szintet mutató szövettani minták (nagyítás: 40x).*

A minták közül 78 (92,3%) esetben tapasztaltunk magas EGFR-expressziót. Az EGFR státusz összefüggést mutatott a hisztológiai differenciáltsági fokkal ($p=0,031$): magas EGFR-expresszió magasabb grade-del társult. Nem mutattunk ki összefüggést az EGFR-expresszió és a betegségsspecifikus túlélés (DSS, $p=0,551$), a tumor lokalizációja ($p=0,369$), a tumor mérete ($p=0,690$), a nyirokcsomóáttét ($p=0,525$), a távoli áttét ($p=0,522$), a stádium ($p=0,182$), a dohányzás ($p=0,866$) és az alkoholfogyasztás ($p=0,707$) között.

A szövettani minták közül 6 (9,5%) esetben találtunk magas pY1068-EGFR-mennyiséget. A pY1068-EGFR státusz összefüggést mutatott a betegségsspecifikus túléléssel (DSS, $p=0,036$): a magasabb pY1068-EGFR-szint rosszabb túléléssel társult (23. ábra). Nem mutattunk ki összefüggést a pY1068-EGFR mennyisége és a tumor lokalizációja ($p=0,748$), a tumor mérete ($p=0,303$), a távoli áttét ($p=0,406$), a stádium ($p=0,273$), a grade ($p=0,745$), a dohányzás ($p=0,182$) és az alkoholfogyasztás ($p=0,951$) között. A nyirokcsomóáttét esetén statisztikailag szignifikáns összefüggést találtunk ($p=0,024$), azonban ezen kapcsolat biológiai relevanciáját nem tudtuk igazolni.



23. ábra: Betegségsspecifikus túlélések (DSS) a pY1068-EGFR-pozitivitás szerint.

A Kaplan-Meier diagram az alacsony (kék) és a magas (piros) pY1068-EGFR-mennyiségű daganattal rendelkező betegek túlélését mutatja ($p=0,036$).

6. Megbeszélés

A fej-nyaki laphámrák a hatodik leggyakrabban előforduló daganattípus világszerte, és a becslések szerint 2030-ra további 30%-kal növekedni fog az új esetek száma [110]. A betegség általában felnőtteknél fordul elő – a HPV-pozitív HNSCC-k diagnosztizálásakor az átlagéletkor 53 év, a HPV-negatív tumorok esetében 66 év, míg az Epstein-Barr-vírus-pozitív daganatok esetében 50 év –, és prevalenciája férfiakban magasabb, mint nőkben [111, 112]. A biotechnológia, a gyógyszerfejlesztés, a robotsebészet, a sugárterápia és az immunterápia területén megvalósult legújabb fejlesztések különösen a HPV-negatív fej-nyaki tumorok kezelésében vezettek jelentős előre lépésekhez. A taxánapú kemoterápiás szereket, különösen a docetaxelt és a paclitaxelt ciszplatinnal és 5-fluorouracillal kombinálva alkalmazzák neoadjuváns kemoterápiaként fej-nyaki tumoros betegek kezelésében. E betegségek kimenetele azonban az újítások ellenére szinte változatlan maradt, a legtöbb előrehaladott stádiumú HNSCC-ben szenvedő beteget továbbra is platinaalapú terápiával kezelik. Jelen értekezés keretében a Cx43 és a Bcl-2 fehérjék expresszióját mint a taxánnal szembeni gyógyszerérzékenység potenciális prediktív molekuláris markereit vizsgáltuk HNSCC sejtvonalakon és tumorsejteken. Emellett az új terápiás lehetőségek jelátviteli útvonalakra gyakorolt hatását is vizsgáltuk abban a reményben, hogy eredményeink hozzájárulhatnak a fej-nyaki tumorban szenvedő páciensek túlélési esélyeinek javításához.

A Bcl-2 család fehérjéi az apoptózis kulcsfontosságú szabályozó elemei. A Bcl-2, mint kulcsfontosságú apoptózisellenes szabályozó fehérje, a teljes sejtszámot nem a sejtosztódási sebesség fokozásával, hanem a sejthalál gátlásával növeli [113]. A fej-nyaki tumorok gyakran túltermelik az antiapoptotikus Bcl-2 fehérjét, ami összefüggést mutat a daganat kemorezisztenciájával [114]. Korábbi tanulmányok arra is rávilágítottak, hogy kemoterápiával kombinálva a Bcl-2 potenciális terápiás célpontként szolgálhat fej-nyaki tumorokban [115].

A connexinek jól karakterizált sejtkapcsoló fehérjék, amelyek lehetséges tumorszupresszor szerepüket és intracelluláris jelátviteli utakkal való interferenciájukat már igazolták [116]. Kimutatták, hogy a connexinek a szöveti homeosztázis szabályozásán keresztül koordinálják a sejtes eseményeket, mint a sejtnövekedés, a migráció, az apoptózis vagy a jelátvitel. Ezek a szerepek több tanulmány szerint függetlenek a gap junction-ön keresztül megvalósuló sejtek közötti kommunikációtól, bár

a pontos mechanizmusok még nincsenek feltárva [75, 117]. A connexinek funkcióvesztő mutációját számos betegség, köztük különféle daganatok esetében leírták már [118].

Korábbi kutatásunkban megállapítottuk, hogy a Cx43 prognosztikai faktor fej-nyaki tumorokban: a fehérje alacsonyabb szintje szignifikánsan rosszabb túléléssel társul [73]. Ugyanerre a következtetésre jutottak Puzzo és munkatársai gégerák vizsgálatakor [119]. Más tanulmányokban azonban fordított összefüggést találtak a Cx43 expressziója és a teljes túlélés között, ami arra utal, hogy a Cx43 a tumor anatómiai elhelyezkedésétől (nyelőcső vagy szájüreg), illetve a fehérje sejten belüli lokalizációjától (citoplazmában és sejtmagban vagy a plazmamembránban) függően eltérő szereppel rendelkezik [120-122]. Dubina és kollégái vastagbél tumorokban kereteltolódásos mutációt mutattak ki a Cx43 C-terminális régiójában, amely befolyásolja a Cx43 foszforilációját, lokalizációját és működését, valamint a festési eljárásokban alkalmazott antitestek kötődését is [123]. A Cx43-at, mint a kemoterápia potenciális molekuláris markerét fej-nyaki tumorokban még nem írták le, azonban megfigyelték, hogy a Cx43 túltermeltetése csökkenti számos (tüdő-, emlő- vagy prosztataeredetű) tumorsejtvonal növekedését [124-126].

A fej-nyaki tumorok *in vitro* modelljeinek létrehozásához három, különböző lokalizációjú (Detroit 562: pharynx, FaDu: hypopharynx és SCC25: nyelv) fej-nyaki tumorsejtvonalat alkalmaztunk. Western blot és fluoreszcens immuncitokémia használatával meghatároztuk a Cx43 és a Bcl-2 fehérjék mennyiségét és lokalizációját mindhárom sejtvonalban, valamint immunhisztokémia alkalmazásával megvizsgáltuk ugyanezt formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) tumormintákban is. Megállapítottuk, hogy mind a vizsgált sejtvonalak, mind a szövetminták Cx43- és Bcl-2-expressziója eltérő. Nem találtunk összefüggést a betegek klinikopatológiai adatai (stádium, grade, lokalizáció vagy betegség-specifikus túlélés) és a Cx43 vagy a Bcl-2 szintje között. Érdekes módon a magas Cx43-expresszióval rendelkező betegek túlélése rosszabbnak adódott, mint azon pácienseké, akiknek a Cx43-szintje alacsony volt. Ez a megfigyelésünk összhangban van Brockmeyer és munkatársainak korábbi megállapításaival, akik ezt a jelenséget a Cx43 sejten belüli lokalizációjával hozták összefüggésbe [120].

A Cx43 és a Bcl-2 expressziójának kapcsolatát megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a magas Cx43-szinthez általában a Bcl-2 alacsony expressziója társul. A jelenség legjobb példája az SCC25 sejtvonal, amely a legmagasabb Cx43- és a legalacsonyabb Bcl-2-

szintet mutatta, és amely egyben paclitaxelkezeléssel szemben a legérzékenyebbnek bizonyult, mivel itt a legalacsonyabb az IC₅₀ érték és a legmagasabb az apoptotikus sejtek aránya. Ugyanakkor a másik két sejtvonalban az alacsony Cx43-expresszió mellett emelkedett Bcl-2-szintet és alacsonyabb paclitaxelérzékenységet figyeltünk meg. A Detroit 562 sejtvonal, a magasabb Cx43-szint ellenére, kevésbé érzékeny paclitaxelkezelésre, amely a nagyon magas Bcl-2-expresszióval lehet összefüggésben. Ez a jelenség rávilágít arra, hogy a Cx43 mellett a Bcl-2 önmagában is figyelemreméltó faktor lehet. Eredményeink összhangban vannak a glioblasztóma sejtvonalakra vonatkozó korábbi megfigyelésekkel, ahol a Cx43 magas szintjét alacsony Bcl-2-expresszió és a taxánapu terápiákkal szembeni érzékenység kísérte [84]. Hasonló hatásokat figyelték meg a transzfektált petefészek- és prosztatarák sejtvonalakban *in vitro* és egérmodellekben is [127, 128]. Huang és kollégái feltételezték, hogy ez a mechanizmus független lehet a Cx43 gap junction-ön keresztül megvalósuló intercelluláris kommunikációban betöltött szerepétől, ugyanis sejtmmodelljükben a Cx43 főként a citoplazmában és a sejtmagban helyezkedett el. Kísérleteikben több, az apoptózishoz kapcsolódó fehérjét (Bcl-2, Bax, Bak, Mcl-1) is megvizsgáltak, de csak a Bcl-2 szintjében találtak szignifikáns változást [129]. Az SCC25 sejtvonalban a Cx43 a plazmamembrán mellett a sejtmagban is megjelenik, ahogy ezt Huang és munkatársai transzfektált modelljükben tapasztalták. Úgy vélték, hogy a Cx43 közvetlenül kötődik cisz elemekhez a promóter régióban, ezáltal szabályozva a génexpressziót [84]. A Cx43 fehérjének nincs sejtmagi lokalizációs szignálja, más, ilyen szekvenciával rendelkező fehérjékhez kapcsolódva jut be a sejtmagba és működik transzkripció szabályozóként [130, 131]. Egy másik lehetséges mechanizmus szerint a Cx43 a jelátviteli kaszkádokon keresztül hathat a Bcl-2 expressziójára, mivel rendelkezik SH2 és SH3 kötőhellyel, és tudja gátolni az Src-t. Wang és kollégái megfigyelték, hogy a Cx43 mennyiségének növelése csak akkor érzékenyítette a vastagbél-tumor-sejteket paclitaxellel szemben, ha azokat nagy sűrűségben tenyésztették és érintkeztek egymással. Ez arra utal, hogy a kemoszénitizációban a gap junction funkciónak is szerepe lehet [83]. Kísérleteink során minden esetben olyan sejtszámot alkalmaztunk, amelynél a sejtek nagy sűrűségben voltak jelen és érintkeztek egymással, azonban nem tanulmányoztuk külön a gap junction funkció szerepét. Mindemellett a Cx43 kötődik a tubulinhoz és részt vesz a mikrotubulusok stabilizálásában is, ami szintén befolyásolhatja a paclitaxellel szembeni

érzékenységet [132]. E kutatásunkban nem törekedtünk a Cx43 és a mikrotubulusok közötti közvetlen kölcsönhatás tanulmányozására.

Vizsgálatunkban a tumorsejtvonalakhoz hasonlóan FFPE HNSCC szövetmintákban is fordított összefüggést találtunk a Cx43 és a Bcl-2 fehérjék expressziója között. A magas Cx43-expresszió gyakran fordult elő alacsony Bcl-2-szinttel, amely jelenség szignifikánsnak bizonyult. Korrelációt figyeltünk meg a Cx43 és a Bcl-2 fehérjék mennyisége és a neoadjuváns TPF-fel folytatott kemoterápiára adott válasz között, amely valószínűleg az alacsony esetszám (18 beteg részesült ilyen terápiában) miatt nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. A feltárt fordított összefüggés igazolására megvizsgáltuk a TCGA (The Cancer Genome Atlas) adatbázisból származó mRNS-expressziós adatokat. A GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) alkalmazásával el tudtuk végezni a TCGA expressziós adatainak páronkénti génkorrelációs elemzését [133]. A *GJAI* és a *BCL2* gének expressziója fej-nyaki tumorokban szignifikáns fordított összefüggést mutatott ($p=2,4 \cdot 10^{-6}$, $R=-0,21$), amely megerősítheti az általunk kimutatott kapcsolatot. A rendelkezésünkre álló FFPE HNSCC szövetmintáinkból nem tudtunk megfelelő mennyiségű mRNS-t izolálni a vizsgálatok elvégzéséhez.

A Cx43 mennyiségének a Bcl-2 expressziójára gyakorolt hatását RNS-interferencia és plazmidtranszfekció alkalmazásával tanulmányoztuk. Azt tapasztaltuk, hogy SCC25 sejtekben a Cx43 mennyiségének jelentős csökkenése szignifikánsan megnövekedett Bcl-2-expressziót eredményezett, míg FaDu sejtekben a Cx43 mennyiségének jelentős emelkedése szignifikánsan csökkentette a Bcl-2-expressziót. RNS-interferencia alkalmazásakor Detroit 562 és FaDu sejtekben nem tapasztaltunk jelentős változást a Bcl-2 fehérje szintjében, ami alighanem az alacsony kezdeti Cx43-expressziónak tudható be, ami miatt az RNS-interferencia által okozott további csökkenés már nem okozott számottevő választ. Huang és munkatársai hasonló hatásokat fedeztek fel, amikor a Cx43-at glioblasztóma sejtvonalakba transzfektálták [84]. A csökkent Cx43-expresszió az SCC25 sejtekben alacsonyabb paclitaxelérzékenységhez és az apaoptotikus sejtek arányának csökkenéséhez, míg a megnövekedett Cx43-szint a FaDu sejtekben magasabb paclitaxelérzékenységhez vezetett. A *GJAI* géntranszfekció mindhárom sejtvonalban növelte a Cx43 fehérje expresszióját, de a hatás csak a FaDu sejtekben bizonyult szignifikánsnak. A transzfektált Detroit 562 sejtekben az emelkedett Cx43-szint már két

nap alatt csökkent vagy teljesen eltűnt. Az SCC25 sejtekben az eredendően magas Cx43-szinthez képest a transzfekció nem okozott olyan kiemelkedő változást, amely hatására az egyébként is alacsony Bcl-2-expresszió tovább csökkenhetett volna. A FaDu sejtvonal további transzfekciós kísérletekhez való felhasználását a hatékonyság mellett a módszerrel szembeni magas tolerancia tette lehetővé. A *GJAI*-transzfekció azonban nem indukált jelentős apoptózist a FaDu sejtekben. Megfigyeltük, hogy a transzfekciós eljárás önmagában érzékenyíti a sejteket paclitaxelkezeléssel szemben. Ez a hatás a kontroll plazmid alkalmazásakor erősebben jelentkezett, és ezt a zavaró hatást a transzfekciós reagens koncentrációjának változtatása sem csökkentette.

Mindezeket figyelembe véve arra a következtetésre jutottunk, hogy a Cx43 és a Bcl-2 expressziója fej-nyaki tumorsejtvonalakban és szövetmintákban egyaránt fordítottan korrelál. A magas Cx43- és az alacsony Bcl-2-szint paclitaxelkezelésre adott jobb választ jelez előre a vizsgált sejtvonalakban. A Cx43 szerepét a folyamatban RNS-interferenciával és *GJAI*-transzfekcióval igazoltuk. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a Cx43 befolyásolja a Bcl-2 expresszióját. Az emelkedett Cx43- és az ezzel járó alacsony Bcl-2-szint fokozott paclitaxelérzékenységet eredményez. Mivel a taxánapú szerek a fej-nyaki tumorok indukciós kemoterápiájának kulcsfontosságú összetevői, ezeknek a biomarkereknek a tesztelése fej-nyaki tumoros betegeknél jobb kezelési stratégia kidolgozását és a kimenetel pontosabb előrejelzését teheti lehetővé. A fenti molekuláris változások és a terápiás válasz közötti összefüggésre irányuló szisztematikus retrospektív klinikai vizsgálatok tovább erősíthetik megállapításainkat.

Potenciális terápiás célpontok azonosítását célzó vizsgálatunkban elsősorban a kinázinhibitor alapú, személyre szabott terápiára koncentráltunk, amelyet már sikeresen alkalmaztak HPV-negatív fej-nyaki tumorok kezelésében. Immunhisztokémia segítségével FFPE tumormintákban megnéztük az EGFR és a pY1068-EGFR szintjét. Az esetek több mint 90%-ában magas EGFR-expressziót mutattunk ki a szövetmintákban. Érdekes módon a klinikopatológiai paraméterek közül csak a grade mutatott korrelációt az EGFR szintjével, gyakrabban figyeltünk meg magas EGFR-expressziót az előrehaladott daganatokból származó mintákban. Annak ellenére, hogy az EGFR túltermelődése mennyire gyakori fej-nyaki tumorokban, az EGFR extracelluláris doménjéhez kötődő monoklonális ellenanyagok (cetuximab) és az intracelluláris doménjéhez kötődő tirozin-kináz-inhibitorok (erlotinib, gefitinib) nem bizonyultak

hatékonyabbnak a kemo- és sugárterápiánál. E jelenségnek számos oka lehet, mint például más receptor-tirozin-kináz fehérjék túltermelődése, vagy a jelátviteli kaszkádokat érintő mutációk jelenléte, amelyek kiküszöbölik az EGFR-gátlók hatását [134].

A pY1068-EGFR szintjét az EGFR-aktivitás indikátoraként használtuk. A vizsgált fejnyaki tumorszövetminták mindössze 10%-a mutatott magas EGFR-aktivitást. Szignifikáns összefüggést figyeltünk meg a betegség-specifikus túléléssel: magasabb EGFR-aktivitás rosszabb prognózissal járt. Ezen eredmény alapján feltételezzük, hogy az EGFR-gátló terápiákra adott válasz pontosabban előre jelezhető lenne az aktivitás alapján, mint az EGFR-expresszió szerint, vagyis az EGFR aktivitása fontos prognosztikai marker lehet. Megfigyelésünk összhangban van Wheeler és munkatársainak vizsgálatával, amely szerint a magas pY1068-EGFR-szint összefüggést mutat a progressziómentes túlélés csökkenésével. Azt is megállapították, hogy a pY1068-EGFR-szint független prognosztikai információkat szolgáltat, emellett a pY1068-EGFR szintje és az EGFR expressziója pozitívan korrelált egymással [135].

A fejnyaki tumorok viselkedésének modellezésére három, változatos molekuláris háttérű sejtvonalat alkalmaztunk. Ezekben nem találtunk jelentős különbséget az EGFR-gátlók életképességre gyakorolt hatása között. Az afatinib erősebb gátlást mutatott, mint az erlotinib, bár nem volt olyan hatékony, mint ahogyan az EGFR-expresszió alapján várható lett volna. Az erlotinib egy első generációs EGFR tirozin-kináz-inhibitor, amely kompetitív antagonistaként reverzibilisen kötődik az EGFR tirozin-kináz doménjének ATP-kötő helyéhez. Ezzel szemben az afatinib egy második generációs EGFR tirozin-kináz-inhibitor, amely irreverzibilisen kötődik az EGFR és a HER-2 fehérjékhez. Az afatinib tehát az EGFR fehérjecsald többi tagját is gátolja, ami magyarázhatja az erősebb hatást a HNSCC-sejtek életképességére [136-138]. Az EGFR-gátlók hatásával szemben szignifikáns változást eredményezett a sejtek életképességében, amikor az EGFR-jelátvitelben kulcsfontosságú MEK fehérjét gátoltuk. Az SCC25 sejtek érzékenyebbnek bizonyultak a MEK gátlására, mint a másik két vizsgált sejtvonal, és a kezelőszerek közül a trametinib hatásosabb volt, mint a selumetinib. Míg a selumetinib egy hatékony, erősen szelektív MEK-1 inhibitor, addig a trametinib szubnanomoláris koncentrációban gátolja a MEK-1 és MEK-2 kinázokat. Ez a különbség állhat annak háttérében, hogy a trametinib erősebb hatást gyakorol a fejnyaki tumorsejtek életképességére [139]. A sikeresebb EGFR- és MEK-gátlók hatását kombinációs kezelésben is megvizsgáltuk, és mindhárom

sejtvonal esetén nagymértékű szinergizmust figyeltünk meg. Azonban amikor összehasonlítottuk a kombinációs kezeléseket az afatinib vagy a trametinib kezelésekkel, akkor csak a FaDu sejtekben volt szignifikáns különbség.

Magyarázatot keresve a kezelőszerekkel szembeni érzékenységben adódó különbségekre, meghatároztuk a sejtvonalak expresziós és foszforilációs profilját. Az EGFR, az Akt és az ERK mennyiségében nem találtunk olyan jelentős különbséget, amely az EGFR- és a MEK-gátlókkal szembeni eltérő viselkedést okozhatná. Ezzel ellentétben számottevő különbséget figyeltünk meg a fehérjék foszforilációs szintjében. Az EGFR a FaDu sejtekben szignifikánsan alacsonyabb aktivitást produkált, mint a másik két sejtvonalban. Ami az Akt és az ERK aktivitását illeti, az Akt kináz aktívabb volt a Detroit 562 sejtekben, mint az ERK, ami összhangban van a *PIK3CA* aktiváló mutációjával [140]. Az SCC25 sejtekben az ERK kináz bizonyult aktívabbnak. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a Detroit 562 sejtekben a PI3K/Akt útvonal, míg az SCC25 sejtekben a MEK/ERK útvonal dominál, a FaDu sejtekben pedig ez a két jelátviteli útvonal közel azonos mértékben aktív.

A jobb megértés érdekében megvizsgáltuk, hogy a trametinibkezelés hogyan változtatja meg a fehérjék aktivitását. A MEK-gátlása az elvártan megfelelően az ERK aktivitásának megszűnését eredményezte a Detroit 562 és az SCC25 sejtekben. A FaDu sejtekben ugyanez a hatás jelentősen megnövelte az EGFR és az Akt aktivitását, ami egy visszacsatolási mechanizmus működésére utal.

A MEK/ERK jelátviteli útvonal a tumorbiológia egyik legjobban jellemzett kinázkaskádja. Deregulációja gyakran megfigyelhető különböző daganatokban (köztük melanomában, hasnyálmirigy-, tüdő-, vastagbél- és emlőtumorokban) és központi szerepet játszik a karcinogenezisben és a daganatok progressziójában. Az érintett kinázok célzása ígéretes új terápiák kidolgozását jelentheti. A fej-nyaki tumorban szenvedő betegek körülbelül 18%-a hordoz a MEK/ERK útvonalat érintő mutációt. A TCGA adatai szerint a jelentős komponensek (*HRAS*, *BRAF*, *ERK2*) az esetek 10,5%-ban mutáltak [141]. Az általunk vizsgált sejtvonalak vad típusúak a releváns génekre nézve [140], ezért úgy gondoljuk, hogy jelen esetben az ERK/EGFR visszacsatolási hurok jelenlétét ezek nem befolyásolják. Mivel a *RAS*- és *RAF*-mutációk fej-nyaki tumorokban ritkák, érdemes a MEK/ERK útvonalat a végponthoz minél közelebb gátolni. Xie és kollégái tanulmányukban meghatározták a MEK-gátló trametinib hatásmechanizmusát.

Megállapították, hogy a trametinib gátolja az ERK fehérje működését, valamint hogy a sejtproliferáció csökkenéséhez az EGFR és Myc fehérjék expressziójának csökkenése is hozzájárul [142]. Eredményeink összhangban vannak megfigyeléseikkel, melyek szerint a trametinib hatása a teljes molekuláris háttértől függ, ezért vizsgálatunkat az EGFR-útvonali aktivitási adataival egészítettük ki, leírtuk az ismert visszacsatolási mechanizmus jelenlétét, és különböző potenciális terápiás stratégiát dolgoztunk ki az egyes tumoraltípusokhoz. A MEK-gátlókat jelenleg is számos klinikai vizsgálatban értékelik, és sok esetben tapasztalnak jelentős daganatellenes hatást, azonban a rezisztencia kialakulása továbbra is kritikus kérdés maradt. A biokémiai visszacsatolási hurkok és más jelátviteli útvonalakkal (főleg a PI3K/Akt útvonallal) való egymásra hatás gyakran felelősek a MEK-gátlókkal kezelt daganatok rezisztenciájáért [86, 143, 144].

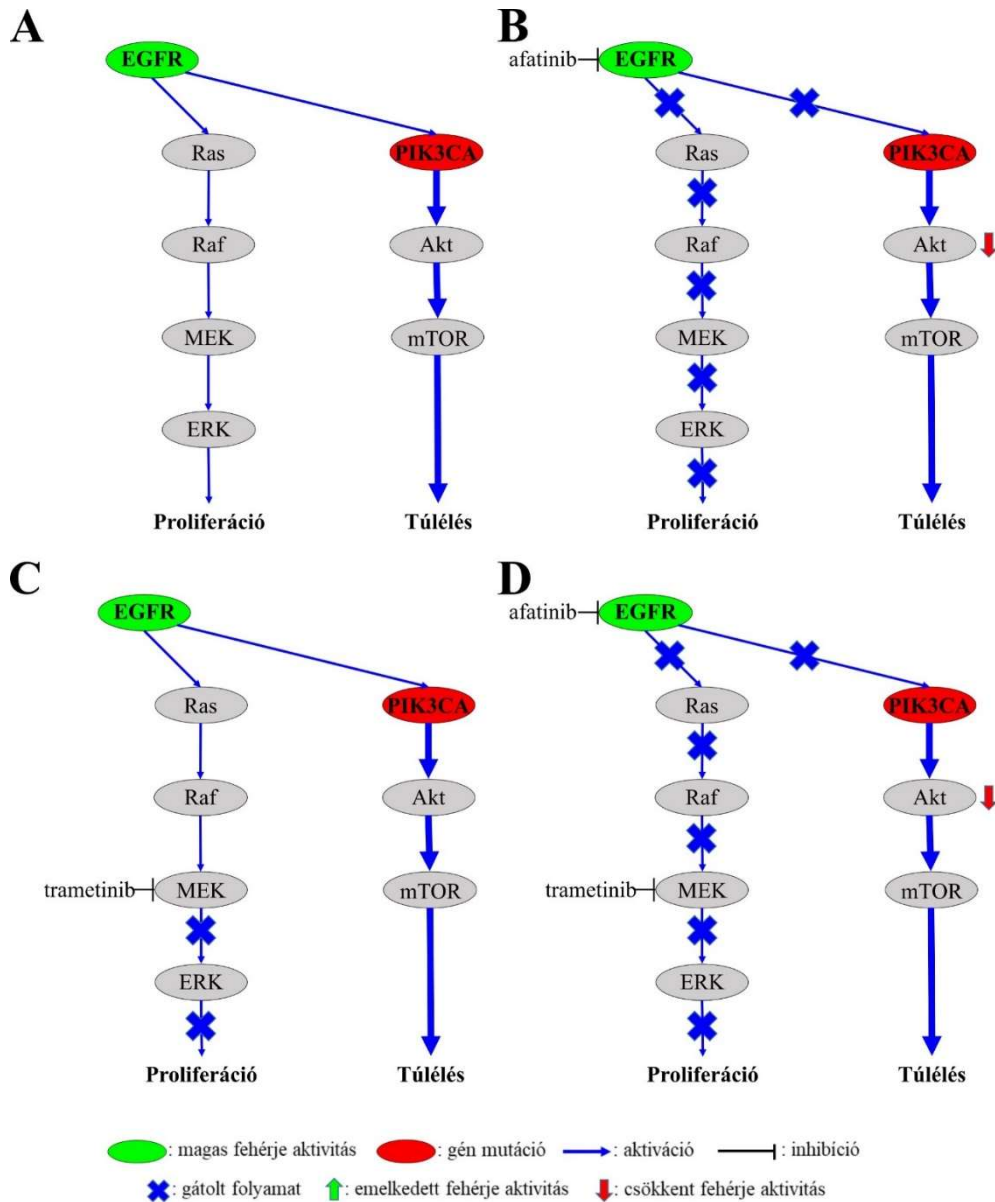
Eredményeink alapján felállítottuk a jelátviteli útvonalak elméleti modelljét a három vizsgált sejtvonal molekuláris hátterének megfelelően. Kezelés nélkül a PI3K/Akt útvonal aktívabb a Detroit 562 sejtekben a *PIK3CA* funkciónyerő mutációja miatt. Ezekben a sejtekben az afatinibkezelés teljesen gátolja a MEK/ERK útvonalat, a PI3K/Akt jelút aktivitása azonban csökken ugyan, de nem szűnik meg. Ebből adódóan a Detroit 562 sejtekben EGFR-gátlókkal nem érhető el jelentős életképesség-csökkenés. A trametinibkezelés csak a MEK/ERK utat gátolja, a PI3K/Akt jelút aktív marad. Ennek megfelelően ebben a sejtvonalban a MEK-gátlók az EGFR-gátlóknál is kisebb hatékonyságot mutatnak. Az afatinib + trametinib kombinációs kezelés nem okozott nagyobb csökkenést a sejtek életképességében az afatinibhez viszonyítva, így ez a kombináció a Detroit 562 sejtek gátlására nem megfelelő. Feltételezzük, hogy az EGFR-vagy a MEK-inhibitorokat Akt-gátlóval lenne érdemes kombinálni, hogy a Detroit 562 sejtek jelentős pusztulását idézzük elő (24. ábra).

A FaDu sejtekben a MEK/ERK és a PI3K/Akt útvonalak hasonló aktivitása mellett az ERK és EGFR közötti visszacsatolási mechanizmust figyeltünk meg. Ez a típusú visszacsatolási mechanizmus gyakran felel az EGFR-jelátvitel kikapcsolásáért [145]. Korábbi tanulmányokban vastagbél-, petefészek- és májtumorsejtekben kimutatták, hogy a foszforilált ERK aktiválja a CDC25 foszfatázt, amely inaktíválja az EGFR-t [146-148]. A pY1068-EGFR szintje alacsony ebben a sejtvonalban, ami alátámasztja a visszacsatolási hurok jelenlétét. Az afatinibkezelés teljesen gátolja a MEK/ERK útvonalat és részben a PI3K/Akt jelutat. A trametinibkezelés a FaDu sejtekben teljesen blokkolja a

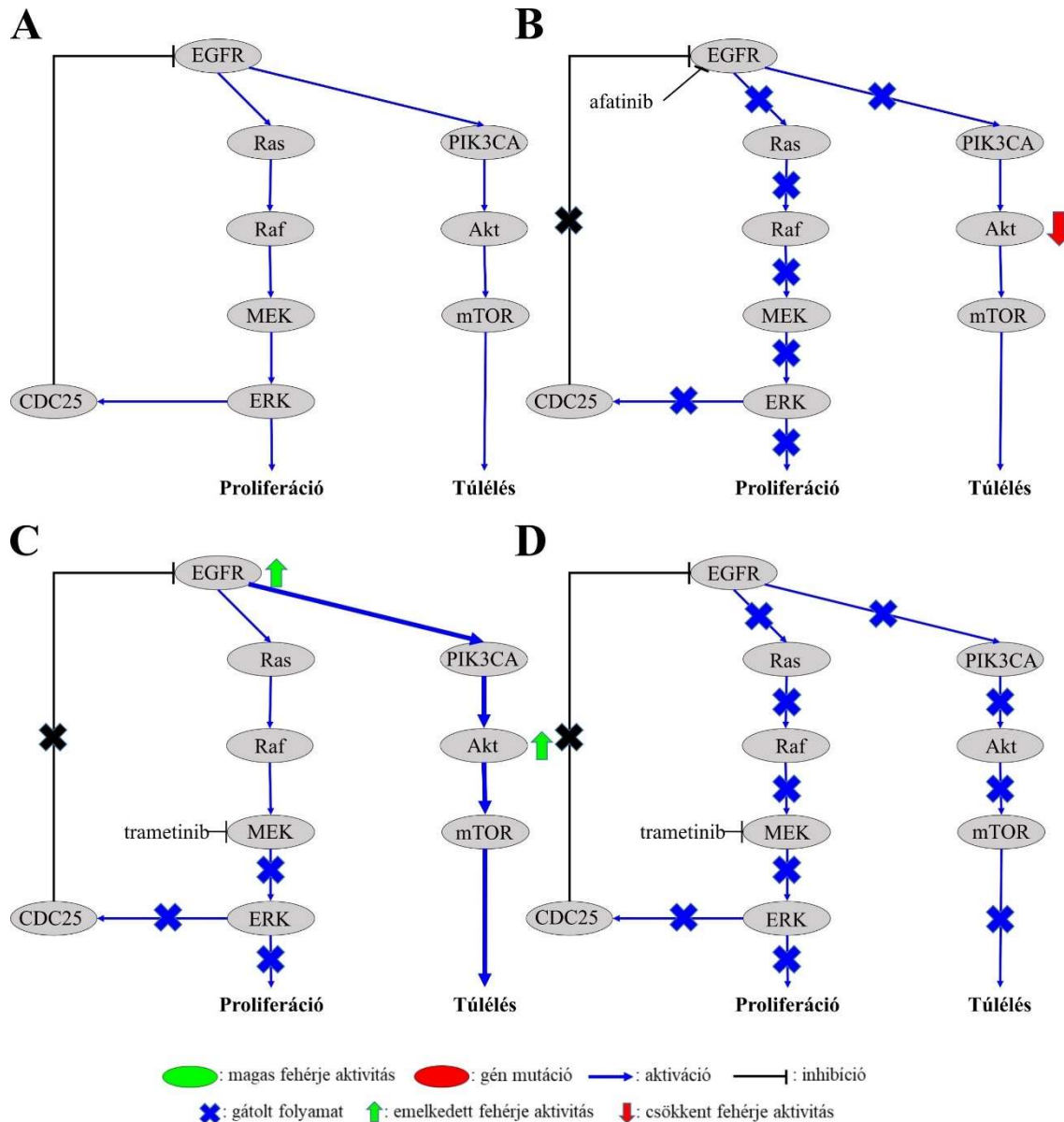
MEK/ERK utat, így felfüggeszti az EGFR defoszforilációját, amire a megnövekedett pY1068-EGFR-mennyiség utal. A MEK/ERK gátlásának hatására a PI3K/Akt út aktívabbá válik, amit az emelkedett pS474-Akt jelenléte bizonyít. A FaDu sejteket afatinibbel és trametinibbel együtt kezelve mindkét útvonal egyidejű gátlása okozza a tumorellenes hatást. Emiatt a FaDu sejteken a MEK- és az EGFR-inhibitorok kombinációs alkalmazását javasoljuk (25. ábra).

Kezeletlen SCC25 sejtekben a MEK/ERK útvonal meglehetősen aktív. Nem azonosítottunk olyan mutációkat, amelyek befolyásolnák a vizsgált útvonalakat, és a FaDu sejtekben jelenlévő visszacsatolási hurkot sem mutattuk ki ebben a sejtvonaltban. Az afatinibkezelés mindkét jelátviteli utat teljesen gátolta. A trametinibkezelés a MEK/ERK jelút teljes gátlását eredményezte, ami önmagában is elegendő lehet az SCC25 sejtek életképességének korlátozásához, mivel a PI3K/Akt útvonal kevésbé aktív. Az afatinib + trametinib kombinációs kezelés is a vizsgált útvonalak teljes gátlását eredményezte, azonban az EGFR- és a MEK-gátlók monoterápiában való alkalmazásához képest a két szer egyidejű alkalmazása nem tesz lehetővé figyelemreméltó dóziscsökkenést, amely a mellékhatások csökkenéséhez vezethetne. Így az EGFR- vagy a MEK-inhibitorok önmagukban hatékony stratégiát jelenthetnek az SCC25 sejtek gátlásában (26. ábra).

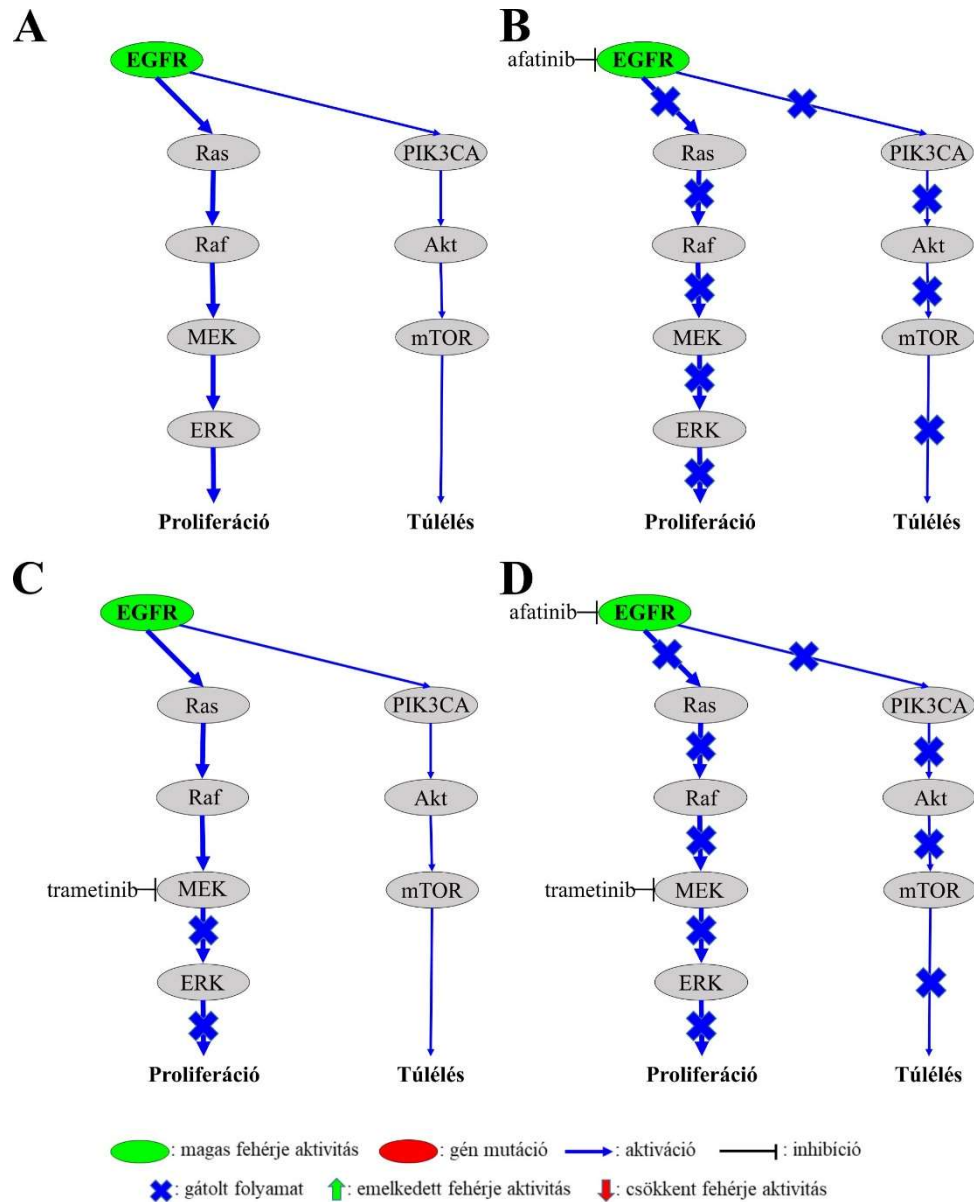
Az elmúlt három évtizedben a terápiás és diagnosztikai lehetőségek bővítésére tett erőfeszítések és a jelentős tudományos fejlődés a HNSCC területén csak szerény mértékben javította a fej-nyaki tumorban szenvedő betegek túlélését. Eredményeink egyértelműen rámutatnak ennek a daganattípusnak a sokszínűségére és a személyre szabott diagnózis és kezelés fontosságára. A bemutatott eredmények arra is rávilágítanak, hogy az EGFR-expresszió elemzése mellett az EGFR foszforilációs állapotának vizsgálata is elengedhetetlen. A fej-nyaki tumorok gyógyításához további átfogó vizsgálatokra van szükség, amelyekkel megérthetjük a mögöttes patomechanizmust és új módszereket találhatunk a HNSCC-k kezelésére.



24. ábra: Detroit 562 tumorsejtvonal jelátviteli útvonalainak egyszerűsített elméleti modellje. A felállított modellek fehérjeexpressziós és -foszforilációs méréseken, valamint életképesség-vizsgálatokon alapszanak, csak a MEK/ERK és a PI3K/Akt útvonalakat jelenítik meg, és nem terjednek ki a jelátviteli utak közötti kapcsolatokra. Az EGFR által indított jelátvitel **(A)** kezeletlen, **(B)** afatinibbel kezelt, **(C)** trametinibbel kezelt és **(D)** afatinib + trametinib kombinációjával kezelt sejtekben.



25. ábra: FaDu tumorsejtvonal jelátviteli útvonalainak egyszerűsített elméleti modellje. A felállított modellek fehérjeexpressziós és -foszforilációs méréseken, valamint életképesség-vizsgálatokon alapszanak, csak a MEK/ERK és a PI3K/Akt útvonalakat jelenítik meg, és nem terjednek ki a jelátviteli utak közötti kapcsolatokra. Az EGFR által indított jelátvitel **(A)** kezeletlen, **(B)** afatinibbel kezelt, **(C)** trametinibbel kezelt és **(D)** afatinib + trametinib kombinációjával kezelt sejtekben.



26. ábra: SCC25 tumorsejtvonal jelátviteli útvonalainak egyszerűsített elméleti modellje. A felállított modellek fehérjeexpressziós és -foszforilációs méréseken, valamint életképesség-vizsgálatokon alapszanak, csak a MEK/ERK és a PI3K/Akt útvonalakat jelenítik meg, és nem terjednek ki a jelátviteli utak közötti kapcsolatokra. Az EGFR által indított jelátvitel **(A)** kezeletlen, **(B)** afatinibbel kezelt, **(C)** trametinibbel kezelt és **(D)** afatinib + trametinib kombinációjával kezelt sejtekben.

7. Következtetések

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

1. Fordított korrelációt találtunk a fej-nyaki tumorok *in vitro* modelljeként vizsgált sejtvonalak és a tumoros betegekből származó szövetminták Cx43- és Bcl-2-expressziója között.
2. A magas Cx43- és az ezzel együtt járó alacsony Bcl-2-expresszió alkalmasnak bizonyult a paclitaxelkezelésre várható kedvezőbb válaszreakció előjelzésére. A legmagasabb Cx43- és a legalacsonyabb Bcl-2-szinttel rendelkező sejtvonal volt a leginkább érzékeny paclitaxelre. Ugyanakkor az alacsony Cx43- és a magasabb Bcl-2-szinttel bíró sejtvonalak alacsonyabb paclitaxelérzékenységet mutattak.
3. Eredményeink arra utalnak, hogy a Cx43 fehérje szerepet játszhat a Bcl-2 fehérje szintjének szabályozásában. Géncsendesítés alkalmazásával megállapítottuk, hogy a Cx43-expresszió csökkentése szignifikánsan emeli a Bcl-2 szintjét, amely csökkent paclitaxelérzékenységet és alacsonyabb apoptózisráta-t eredményez. Amikor pedig plazmidtranszfekcióval emeltük a Cx43 mennyiségét, az szignifikánsan csökkentette a Bcl-2-expressziót és érzékenyítette a sejteket paclitaxelkezeléssel szemben.
4. A Cx43 prediktív marker lehet fej-nyaki tumorokban taxánalapú terápia esetén.
5. A pY1068-EGFR-szint emelkedése prognosztikus jelentőséggel bír fej-nyaki daganatokban. A pY1068-EGFR nagyobb mennyisége szignifikánsan kedvezőtlenebb betegségspecifikus túléléssel társul e daganattípus esetében.
6. A fej-nyaki daganatok *in vitro* modelljében a MEK/ERK és a PI3K/Akt jelátviteli utak tagjait érintő mutációk és fehérjefoszforilációk ismerete felhasználható az EGFR- és a MEK-gátlókkal, valamint ezek kombinációjával szembeni érzékenység predikciójára.
7. Olyan fej-nyaki tumorokban, amelyekben nincs jelen a MEK/ERK és a PI3K/Akt útvonalakat érintő mutáció és nem működik az ERK/EGFR visszacsatolási hurok, a MEK ígéretes terápiás támadáspont lehet.

8. Összefoglalás

A fej-nyaki tumorok változatos molekuláris háttérrel rendelkező daganatok, amelyek kialakulásában az alkoholfogyasztás, a dohányzás és a HPV-fertőzés is jelentős szerepet játszik. A tumorsejtek molekuláris hibáinak sokszínűsége jelentős kihívást jelent a kezelés szempontjából, és ennek leküzdését leginkább az ismert prognosztikus és prediktív biomarkerek korlátozott száma hátráltatja.

Kutatásunk során fej-nyaki daganatokban prediktív, illetve prognosztikus jelentőségű fehérjék azonosítását tűztük ki célul, valamint, hogy a releváns molekuláris tulajdonságok alapján keressünk e tumorsejtek ellen felhasználható új potenciális gyógyszer-célpontokat. Vizsgálatainkban a Cx43 és a Bcl-2 fehérjék expresszióját, mint a paclitaxel érzékenység potenciális prediktív molekuláris markereit teszteltük. Eredményeink a Cx43 és a Bcl-2 expressziója között fennálló fordított korrelációt mutattak a fej-nyaki tumorokban, és azt támasztották alá, hogy a magas Cx43-, illetve ezzel együtt járó alacsony Bcl-2-expresszió a paclitaxelkezelésre adott kedvezőbb válaszreakcióval társul. Ezek alapján feltételezzük, hogy a Cx43 mennyisége befolyásolja a Bcl-2 protoonkogén szintjét és hogy a Cx43 prediktív marker lehet fej-nyaki tumorok taxánapú terápiája vonatkozásában. Mivel a taxánapú szerek a fej-nyaki tumorok indukciós kemoterápiájának kulcsfontosságú elemei, e biomarkerek vizsgálata a klinikai gyakorlatban elősegítheti a kezelés jobb tervezését és megalapozottabbá teheti a predikciót.

Az új prediktív markerek azonosítása mellett az EGFR prognosztikus szerepére és az EGFR-gátlókkal szembeni rezisztencia elkerülésére vagy kiküszöbölésére alkalmas célzott terápiás szerek vizsgálatára fókuszáltunk. E kutatás eredményeként egyrészt megállapítottuk, hogy az EGFR-aktivitás önálló prognosztikai marker, másrészt potenciális terápiás célpontként azonosítottuk fej-nyaki tumorokban a MEK jelátviteli szabályozó fehérjét. A MEK-gátlók mélyrehatóbb tanulmányozása során felfedeztük, hogy a vastagbél- és hasnyálmirigy-daganatokban leírt ERK/EGFR visszacsatolási hurok fej-nyaki tumorokban is működik. Kísérletes eredményeink alapján felállított modelljeink alkalmasak lehetnek az EGFR- és a MEK-gátlókkal, valamint ezek kombinációjával szembeni érzékenység predikciójára.

Eredményeink segíthetnek a fej-nyaki daganatok molekuláris háttérének pontosabb megértésében, lényeges molekuláris markereken alapuló csoportosításában és új, személyre szabott terápiás lehetőségek megteremtésében.

9. Summary

Head and neck cancers are tumors of diverse molecular background, the development of which is also greatly associated with alcohol consumption, smoking and HPV infection. The diversity of molecular defects in tumor cells poses a major challenge for treatment and the main obstacle to overcoming this is the limited number of known prognostic and predictive biomarkers.

Our research aimed to identify proteins with predictive and prognostic value in head and neck cancers, as well as to search for new potential drug targets that can be used against these tumor cells based on their relevant molecular properties.

We investigated the expression of Cx43 and Bcl-2 proteins as potential predictive molecular markers of paclitaxel sensitivity. Our results showed an inverse correlation between the expression of Cx43 and Bcl-2 in head and neck cancers and confirmed that high Cx43 and accompanying low Bcl-2 expression are associated with a more favorable response to paclitaxel treatment. Based on these findings, we hypothesize that the amount of Cx43 influences the level of Bcl-2 proto-oncogene and that Cx43 can be a predictive marker for taxane-based therapy of head and neck cancers. Since taxane-based agents are a key element of induction chemotherapy of head and neck cancers, the assessment of these biomarkers in clinical practice can help to better plan treatment and make prediction more robust.

In addition to identifying new predictive markers, we focused on the prognostic role of EGFR and the investigation of targeted therapeutic agents suitable to avoid or eliminate resistance to EGFR inhibitors. As a result of this research, on the one hand, we have established that EGFR activity is an independent prognostic marker, and on the other hand, we have identified the MEK signaling regulatory protein as a potential therapeutic target in head and neck cancers. A more in-depth study of MEK inhibitors revealed that the ERK/EGFR feedback loop described in colon and pancreatic tumors is also present in head and neck cancers. Our experimental results suggest that our models may be useful for predicting sensitivity to EGFR and MEK inhibitors, as well as their combinations.

Our results may lead to more detailed understanding of the molecular background of head and neck cancers and help to classify them according to important molecular markers and to discover new personalized therapeutic options.

10. Irodalomjegyzék

1. Mukherjee, S., *Betegségek betegsége*. 2013, Budapest: Libri Kiadó. 613.
2. Kopper László, T.J., Becságh Péter, Nagy Zsuzsanna, *Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában 3*. 2013, Budapest: Semmelweis Kiadó. 564.
3. Cooper, G.M., *Elements of Human Cancer*. 1992, Boston: Jones & Bartlett Learning. 354.
4. Stockley, T.L., A.M. Oza, H.K. Berman, N.B. Leighl, J.J. Knox, F.A. Shepherd, E.X. Chen, M.K. Krzyzanowska, N. Dhani, A.M. Joshua, M.S. Tsao, S. Serra, B. Clarke, M.H. Roehrl, T. Zhang, M.A. Sukhai, N. Califaretti, M. Trinkaus, P. Shaw, T. van der Kwast, L. Wang, C. Virtanen, R.H. Kim, A.R. Razak, A.R. Hansen, C. Yu, T.J. Pugh, S. Kamel-Reid, L.L. Siu, and P.L. Bedard, *Molecular profiling of advanced solid tumors and patient outcomes with genotype-matched clinical trials: the Princess Margaret IMPACT/COMPACT trial*. *Genome Med*, 2016. **8**(1): p. 109.
5. Sung, H., J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. *CA Cancer J Clin*, 2021. **71**(3): p. 209-249.
6. Torre, L.A., F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal, *Global cancer statistics, 2012*. *CA Cancer J Clin*, 2015. **65**(2): p. 87-108.
7. Smith, B.D., G.L. Smith, A. Hurria, G.N. Hortobagyi, and T.A. Buchholz, *Future of cancer incidence in the United States: burdens upon an aging, changing nation*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(17): p. 2758-65.
8. Kenessey, I., P. Nagy, and C. Polgár, *[The Hungarian situation of cancer epidemiology in the second decade of the 21st century]*. *Magy Onkol*, 2022. **66**(3): p. 175-184.
9. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
10. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
11. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. *Cancer Discov*, 2022. **12**(1): p. 31-46.

12. Chakravarthi, B.V., S. Nepal, and S. Varambally, *Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer*. Am J Pathol, 2016. **186**(7): p. 1724-35.
13. Kopper László, T.J., *Molekuláris onkológia*. 2007, Budapest: Semmelweis Kiadó.
14. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
15. Greenman, C., P. Stephens, R. Smith, G.L. Dalgliesh, C. Hunter, G. Bignell, H. Davies, J. Teague, A. Butler, C. Stevens, S. Edkins, S. O'Meara, I. Vastrik, E.E. Schmidt, T. Avis, S. Barthorpe, G. Bhamra, G. Buck, B. Choudhury, J. Clements, J. Cole, E. Dicks, S. Forbes, K. Gray, K. Halliday, R. Harrison, K. Hills, J. Hinton, A. Jenkinson, D. Jones, A. Menzies, T. Mironenko, J. Perry, K. Raine, D. Richardson, R. Shepherd, A. Small, C. Tofts, J. Varian, T. Webb, S. West, S. Widaa, A. Yates, D.P. Cahill, D.N. Louis, P. Goldstraw, A.G. Nicholson, F. Brasseur, L. Looijenga, B.L. Weber, Y.E. Chiew, A. DeFazio, M.F. Greaves, A.R. Green, P. Campbell, E. Birney, D.F. Easton, G. Chenevix-Trench, M.H. Tan, S.K. Khoo, B.T. Teh, S.T. Yuen, S.Y. Leung, R. Wooster, P.A. Futreal, and M.R. Stratton, *Patterns of somatic mutation in human cancer genomes*. Nature, 2007. **446**(7132): p. 153-8.
16. Burtneß, B., K.J. Harrington, R. Greil, D. Soulières, M. Tahara, G. de Castro, A. Psyrri, N. Basté, P. Neupane, Å. Bratland, T. Fuereder, B.G.M. Hughes, R. Mesía, N. Ngamphaiboon, T. Rordorf, W.Z. Wan Ishak, R.-L. Hong, R. González Mendoza, A. Roy, Y. Zhang, B. Gumuscu, J.D. Cheng, F. Jin, D. Rischin, G. Lerzo, M. Tatangelo, M. Varela, J.J. Zarba, M. Boyer, H. Gan, B. Gao, B. Hughes, G. Mallesara, D. Rischin, A. Taylor, M. Burian, T. Fuereder, R. Greil, C.H. Barrios, D.O. de Castro Junior, G. Castro, F.A. Franke, G. Girotto, I.P.F. Lima, U.R. Nicolau, G.D.J. Pinto, L. Santos, A.-P. Victorino, N. Chua, F. Couture, R. Gregg, A. Hansen, J. Hilton, J. McCarthy, D. Soulieres, R. Ascui, P. Gonzalez, L. Villanueva, M. Torregroza, A. Zambrano, P. Holeckova, Z. Kral, B. Melichar, J. Prausova, M. Vosmik, M. Andersen, N. Gyldenkerne, H. Jurgens, K. Putnik, P. Reinikainen, V. Gruenwald, S. Laban, G. Aravantinos, I. Boukovinas, V. Georgoulas, A. Psyrri, D. Kwong, Y. Al-Farhat, T. Csoszi, J. Erfan, G. Horvai, L. Landherr, E. Remenar, A. Ruzsa, J. Szota, S. Billan, I. Gluck, O. Gutfeld, A. Popovtzer, M. Benasso, S. Bui, V. Ferrari, L. Licitra, F. Nole, T. Fujii, Y.

- Fujimoto, N. Hanai, H. Hara, K. Matsumoto, K. Mitsugi, N. Monden, M. Nakayama, K. Okami, N. Oridate, K. Shiga, Y. Shimizu, M. Sugawara, M. Tahara, M. Takahashi, S. Takahashi, K. Tanaka, T. Ueda, H. Yamaguchi, T. Yamazaki, R. Yasumatsu, T. Yokota, T. Yoshizaki, I. Kudaba, Z. Stara, W.Z. Wan Ishak, S.K. Cheah, J. Aguilar Ponce, R. Gonzalez Mendoza, C. Hernandez Hernandez, F. Medina Soto, J. Buter, A. Hoeben, S. Oosting, K. Suijkerbuijk, A. Bratland, M. Brydoey, R. Alvarez, L. Mas, P. Caguioa, J. Querol, E.E. Regala, M.B. Tamayo, E.M. Villegas, A. Kawecki, A. Karpenko, A. Klochikhin, A. Smolin, O. Zarubnikov, B.C. Goh, G. Cohen, J. du Toit, C. Jordaan, G. Landers, P. Ruff, W. Szpak, N. Tabane, I. Brana, L. Iglesias Docampo, J. Lavernia, R. Mesia, E. Abel, V. Muratidu, N. Nielsen, V. Cristina, T. Rordorf, S. Rothschild, R.-L. Hong, H.-M. Wang, M.-H. Yang, S.-P. Yeh, C.-J. Yen, N. Ngamphaiboon, N. Soparattanapaisarn, V. Sriuranpong, S. Aksoy, I. Cicin, M. Ekenel, H. Harputluoglu, O. Ozyilkan, K. Harrington, S. Agarwala, H. Ali, R. Alter, D. Anderson, J. Bruce, B. Burtneess, N. Campbell, M. Conde, J. Deeken, W. Edenfield, L. Feldman, E. Gaughan, B. Goueli, B. Halmos, U. Hegde, B. Hunis, R. Jotte, A. Karnad, S. Khan, N. Laudi, D. Laux, D. Martincic, S. McCune, D. McGaughey, K. Misiukiewicz, D. Mulford, E. Nadler, P. Neupane, J. Nunnink, J. Ohr, M. O'Malley, B. Patson, D. Paul, E. Popa, S. Powell, R. Redman, V. Rella, C. Rocha Lima, A. Sivapiragasam, Y. Su, A. Sukari, S. Wong, E. Yilmaz and J. Yorio, *Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study*. The Lancet, 2019. **394**(10212): p. 1915-1928.
17. Cohen, E.E.W., D. Soulières, C. Le Tourneau, J. Dinis, L. Licitra, M.-J. Ahn, A. Soria, J.-P. Machiels, N. Mach, R. Mehra, B. Burtneess, P. Zhang, J. Cheng, R.F. Swaby, K.J. Harrington, M. Acosta-Rivera, D.R. Adkins, M. Aghmesheh, M.-J. Ahn, M. Airolidi, E. Aleknavicius, Y. Al-Farhat, A.P. Algazi, S. Almokadem, A. Alyasova, J.R. Bauman, M. Benasso, A. Berrocal, V. Bray, B.A. Burtneess, F. Caponigro, A. Castro, T.P. Cescon, K. Chan, A. Chaudhry, B. Chauffert, E. Cohen, T. Csoszi, J.P. De Boer, J.-P. Delord, A. Dietz, J. Dinis, C. Dupuis, L. Digue, J. Erfan, Y. Escobar Alvarez, M. Evans, M.J. Fidler, M.D. Forster, S.

- Friesland, A.K. Ganti, L. Geoffrois, C. Grant, V. Gruenwald, K. Harrington, T. Hoffmann, G. Horvai, A. Inciura, R. Jang, P. Jankowska, A. Jimeno, M. Joseph, A. Juarez Ramiro, B. Karaszewska, A. Kawecki, U. Keilholz, U. Keller, S.-B. Kim, J. Kocsis, N. Kotecki, M.F. Kozloff, J. Lambea, L. Landherr, Y. Lantsukhay, S.A. Lazarev, L.W. Lee, C. Le Tourneau, L. Licitra, I.D. Lifirenko, N. Mach, D. Martincic, O.V. Matorin, M. McGrath, J.-P. Machiels, R. Mehra, K. Misiukiewicz, J.C. Morris, F.F. Mufazalov, J. Niu, D. Pamoorthy Srinivasan, P. Perez Segura, D. Rauch, M.L. Ribeiro, C. Rodriguez, F. Rolland, A. Russo, A. Ruzsa, F. Sanches, S.-W. Shin, M. Shtiveland, D. Soulieres, A. Soria, P. Specenier, E. Szekanecz, J. Szota, C.M.L. van Herpen, H.A. Velez-Cortes, W.V. Walsh, S. Wilop, R. Winterhalder, M. Wojtukiewicz, D. Wong and D. Zandberg, *Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study*. The Lancet, 2019. **393**(10167): p. 156-167.
18. Ferris, R.L., G. Blumenschein, Jr., J. Fayette, J. Guigay, A.D. Colevas, L. Licitra, K. Harrington, S. Kasper, E.E. Vokes, C. Even, F. Worden, N.F. Saba, L.C. Iglesias Docampo, R. Haddad, T. Rordorf, N. Kiyota, M. Tahara, M. Monga, M. Lynch, W.J. Geese, J. Kopit, J.W. Shaw, and M.L. Gillison, *Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck*. N Engl J Med, 2016. **375**(19): p. 1856-1867.
 19. Vajda, F., E. Bajtai, B. Gombos, E. Karai, L. Hámori, G. Szakács, and A. Füredi, *[Development of novel treatment strategies for drug resistant cancer]*. Magyar Onkol, 2021. **65**(2): p. 176-187.
 20. Zheng, H.C., *The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers*. Oncotarget, 2017. **8**(35): p. 59950-59964.
 21. Altenberg, G.A., *Structure of multidrug-resistance proteins of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2004. **4**(1): p. 53-62.
 22. Doyle, L.A., W. Yang, L.V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A.K. Rishi, and D.D. Ross, *A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15665-70.

23. Szakács, G., J.K. Paterson, J.A. Ludwig, C. Booth-Genthe, and M.M. Gottesman, *Targeting multidrug resistance in cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(3): p. 219-34.
24. Liang, K., K.K. Ang, L. Milas, N. Hunter, and Z. Fan, *The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003. **57**(1): p. 246-54.
25. Tang, J., F. Guo, Y. Du, X. Liu, Q. Qin, X. Liu, T. Yin, L. Jiang, and Y. Wang, *Continuous exposure of non-small cell lung cancer cells with wild-type EGFR to an inhibitor of EGFR tyrosine kinase induces chemoresistance by activating STAT3*. Int J Oncol, 2015. **46**(5): p. 2083-95.
26. Page, C., H.J. Lin, Y. Jin, V.P. Castle, G. Nunez, M. Huang, and J. Lin, *Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis*. Anticancer Res, 2000. **20**(1a): p. 407-16.
27. Zhang, P., P. Zhang, B. Shi, M. Zhou, H. Jiang, H. Zhang, X. Pan, H. Gao, H. Sun, and Z. Li, *Galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer*. Cell Death Dis, 2014. **5**(1): p. e991.
28. Sun, Y., Z. Guan, L. Liang, Y. Cheng, J. Zhou, J. Li, and Y. Xu, *NF- κ B signaling plays irreplaceable roles in cisplatin-induced bladder cancer chemoresistance and tumor progression*. Int J Oncol, 2016. **48**(1): p. 225-34.
29. Lakshmanan, I., S. Salfity, P. Seshacharyulu, S. Rachagani, A. Thomas, S. Das, P.D. Majhi, R.K. Nimmakayala, R. Vengoji, S.M. Lele, M.P. Ponnusamy, S.K. Batra, and A.K. Ganti, *MUC16 Regulates TSPYL5 for Lung Cancer Cell Growth and Chemoresistance by Suppressing p53*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(14): p. 3906-3917.
30. Galletti, G., B.I. Leach, L. Lam, and S.T. Tagawa, *Mechanisms of resistance to systemic therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer*. Cancer Treat Rev, 2017. **57**: p. 16-27.
31. Li, W. and D.W. Melton, *Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance*. Oncogene, 2012. **31**(19): p. 2412-22.

32. van Eijk, M., R.J. Boosman, A.H. Schinkel, A.D.R. Huitema, and J.H. Beijnen, *Cytochrome P450 3A4, 3A5, and 2C8 expression in breast, prostate, lung, endometrial, and ovarian tumors: relevance for resistance to taxanes*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019. **84**(3): p. 487-499.
33. Gottesman, M.M., *Mechanisms of cancer drug resistance*. *Annu Rev Med*, 2002. **53**: p. 615-27.
34. Kavallaris, M., *Microtubules and resistance to tubulin-binding agents*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(3): p. 194-204.
35. Pytynia, K.B., K.R. Dahlstrom, and E.M. Sturgis, *Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer*. *Oral Oncol*, 2014. **50**(5): p. 380-6.
36. Adams, A.K., T.M. Wise-Draper, and S.I. Wells, *Human papillomavirus induced transformation in cervical and head and neck cancers*. *Cancers (Basel)*, 2014. **6**(3): p. 1793-820.
37. Hunt, J.L., L. Barnes, J.S. Lewis, Jr., M.E. Mahfouz, P.J. Slootweg, L.D. Thompson, A. Cardesa, K.O. Devaney, D.R. Gnepp, W.H. Westra, J.P. Rodrigo, J.A. Woolgar, A. Rinaldo, A. Triantafyllou, R.P. Takes, and A. Ferlito, *Molecular diagnostic alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck and potential diagnostic applications*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2014. **271**(2): p. 211-23.
38. Li, Y.Y., G.J. Hanna, A.C. Laga, R.I. Haddad, J.H. Lorch, and P.S. Hammerman, *Genomic analysis of metastatic cutaneous squamous cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(6): p. 1447-56.
39. Hoffmann, D., I. Hoffmann, and K. El-Bayoumy, *The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder*. *Chem Res Toxicol*, 2001. **14**(7): p. 767-90.
40. Sun, W. and J.A. Califano, *Sequencing the head and neck cancer genome: implications for therapy*. *Ann N Y Acad Sci*, 2014. **1333**: p. 33-42.
41. Hashibe, M., P. Brennan, S. Benhamou, X. Castellsague, C. Chen, M.P. Curado, L. Dal Maso, A.W. Daudt, E. Fabianova, L. Fernandez, V. Wunsch-Filho, S. Franceschi, R.B. Hayes, R. Herrero, S. Koifman, C. La Vecchia, P. Lazarus, F. Levi, D. Mates, E. Matos, A. Menezes, J. Muscat, J. Eluf-Neto, A.F. Olshan, P. Rudnai, S.M. Schwartz, E. Smith, E.M. Sturgis, N. Szeszenia-Dabrowska, R.

- Talamini, Q. Wei, D.M. Winn, D. Zaridze, W. Zatonski, Z.F. Zhang, J. Berthiller, and P. Boffetta, *Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(10): p. 777-89.
42. Kobayashi, K., K. Hisamatsu, N. Suzui, A. Hara, H. Tomita, and T. Miyazaki, *A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer*. J Clin Med, 2018. **7**(9).
 43. Lifsics, A., M. Cistjakovs, L. Sokolovska, R. Deksnis, M. Murovska, and V. Groma, *The Role of the p16 and p53 Tumor Suppressor Proteins and Viral HPV16 E6 and E7 Oncoproteins in the Assessment of Survival in Patients with Head and Neck Cancers Associated with Human Papillomavirus Infections*. Cancers (Basel), 2023. **15**(10).
 44. Gillison, M.L., L. Alemany, P.J. Snijders, A. Chaturvedi, B.M. Steinberg, S. Schwartz, and X. Castellsague, *Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis*. Vaccine, 2012. **30 Suppl 5**: p. F34-54.
 45. Chaturvedi, A.K., B.I. Graubard, T. Broutian, W. Xiao, R.K.L. Pickard, L. Kahle, and M.L. Gillison, *Prevalence of Oral HPV Infection in Unvaccinated Men and Women in the United States, 2009-2016*. Jama, 2019. **322**(10): p. 977-979.
 46. Fernandes, Q., M. Merhi, A. Raza, V.P. Inchakalody, N. Abdelouahab, A.R. Zar Gul, S. Uddin, and S. Dermime, *Role of Epstein-Barr Virus in the Pathogenesis of Head and Neck Cancers and Its Potential as an Immunotherapeutic Target*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 257.
 47. Stransky, N., A.M. Egloff, A.D. Tward, A.D. Kostic, K. Cibulskis, A. Sivachenko, G.V. Kryukov, M.S. Lawrence, C. Sougnez, A. McKenna, E. Shefler, A.H. Ramos, P. Stojanov, S.L. Carter, D. Voet, M.L. Cortés, D. Auclair, M.F. Berger, G. Saksena, C. Guiducci, R.C. Onofrio, M. Parkin, M. Romkes, J.L. Weissfeld, R.R. Seethala, L. Wang, C. Rangel-Escareño, J.C. Fernandez-Lopez, A. Hidalgo-Miranda, J. Melendez-Zajgla, W. Winckler, K. Ardlie, S.B. Gabriel, M. Meyerson, E.S. Lander, G. Getz, T.R. Golub, L.A. Garraway, and J.R. Grandis, *The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma*. Science, 2011. **333**(6046): p. 1157-60.

48. Brauswetter, D., E. Birtalan, K. Danos, A. Kocsis, T. Krenacs, J. Timar, R. Mihalyi, D. Horcsik, G. Polony, L. Tamas, and I. Petak, *p16(INK4) expression is of prognostic and predictive value in oropharyngeal cancers independent of human papillomavirus status: a Hungarian study*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2017. **274**(4): p. 1959-1965.
49. Lin, S.Y., K. Makino, W. Xia, A. Matin, Y. Wen, K.Y. Kwong, L. Bourguignon, and M.C. Hung, *Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(9): p. 802-8.
50. Kaminagakura, E., I. Werneck da Cunha, F.A. Soares, I.N. Nishimoto, and L.P. Kowalski, *CCND1 amplification and protein overexpression in oral squamous cell carcinoma of young patients*. Head Neck, 2011. **33**(10): p. 1413-9.
51. Feng, Z., W. Guo, C. Zhang, Q. Xu, P. Zhang, J. Sun, H. Zhu, Z. Wang, J. Li, L. Wang, B. Wang, G. Ren, T. Ji, W. Tu, X. Yang, W. Qiu, L. Mao, Z. Zhang, and W. Chen, *CCND1 as a predictive biomarker of neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26399.
52. Xie, S., M. Chen, B. Yan, X. He, X. Chen, and D. Li, *Identification of a role for the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in innate immune cells*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94496.
53. Suda, T., T. Hama, S. Kondo, Y. Yuza, M. Yoshikawa, M. Urashima, T. Kato, and H. Moriyama, *Copy number amplification of the PIK3CA gene is associated with poor prognosis in non-lymph node metastatic head and neck squamous cell carcinoma*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 416.
54. Jiang, W.G., T.A. Martin, C. Parr, G. Davies, K. Matsumoto, and T. Nakamura, *Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies*. Crit Rev Oncol Hematol, 2005. **53**(1): p. 35-69.
55. Sierra, J.R. and M.S. Tsao, *c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer*. Ther Adv Med Oncol, 2011. **3**(1 Suppl): p. S21-35.
56. Leemans, C.R., B.J. Braakhuis, and R.H. Brakenhoff, *The molecular biology of head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(1): p. 9-22.
57. Yemelyanova, A., R. Vang, M. Kshirsagar, D. Lu, M.A. Marks, M. Shih Ie, and R.J. Kurman, *Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a*

- surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis*. Mod Pathol, 2011. **24**(9): p. 1248-53.
58. Ringström, E., E. Peters, M. Hasegawa, M. Posner, M. Liu, and K.T. Kelsey, *Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(10): p. 3187-92.
 59. Haraf, D.J., E. Nodzenski, D. Brachman, R. Mick, A. Montag, D. Graves, E.E. Vokes, and R.R. Weichselbaum, *Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(4): p. 755-62.
 60. Ang, K.K., J. Harris, R. Wheeler, R. Weber, D.I. Rosenthal, P.F. Nguyen-Tân, W.H. Westra, C.H. Chung, R.C. Jordan, C. Lu, H. Kim, R. Axelrod, C.C. Silverman, K.P. Redmond, and M.L. Gillison, *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(1): p. 24-35.
 61. Szturcz, P., M. Budíková, J.B. Vermorken, I. Horová, B. Gál, E. Raymond, A. de Gramont, and S. Faivre, *Prognostic value of c-MET in head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis of aggregate data*. Oral Oncol, 2017. **74**: p. 68-76.
 62. García-Escudero, R., C. Segrelles, M. Dueñas, M. Pombo, C. Ballestín, M. Alonso-Riaño, P. Nenclares, R. Álvarez-Rodríguez, G. Sánchez-Aniceto, A. Ruiz-Alonso, J.L. López-Cedrún, J.M. Paramio, and C. Lorz, *Overexpression of PIK3CA in head and neck squamous cell carcinoma is associated with poor outcome and activation of the YAP pathway*. Oral Oncol, 2018. **79**: p. 55-63.
 63. Sølrand, T.M. and I.J. Brusevold, *Prognostic molecular markers in cancer - quo vadis?* Histopathology, 2013. **63**(3): p. 297-308.
 64. Zheng, Y., C. Zhang, D.R. Croucher, M.A. Soliman, N. St-Denis, A. Pasculescu, L. Taylor, S.A. Tate, W.R. Hardy, K. Colwill, A.Y. Dai, R. Bagshaw, J.W. Dennis, A.C. Gingras, R.J. Daly, and T. Pawson, *Temporal regulation of EGF signalling networks by the scaffold protein Shc1*. Nature, 2013. **499**(7457): p. 166-71.

65. Abe, M., Y. Kuroda, M. Hirose, Y. Watanabe, M. Nakano, and T. Handa, *Inhibition of autophosphorylation of epidermal growth factor receptor by small peptides in vitro*. Br J Pharmacol, 2006. **147**(4): p. 402-11.
66. Salazar-Cavazos, E., C.F. Nitta, E.D. Mitra, B.S. Wilson, K.A. Lidke, W.S. Hlavacek, and D.S. Lidke, *Multisite EGFR phosphorylation is regulated by adaptor protein abundances and dimer lifetimes*. Mol Biol Cell, 2020. **31**(7): p. 695-708.
67. Nicholson, R.I., J.M. Gee, and M.E. Harper, *EGFR and cancer prognosis*. Eur J Cancer, 2001. **37 Suppl 4**: p. S9-15.
68. Shah, N.G., T.I. Trivedi, R.A. Tankshali, J.V. Goswami, D.H. Jetly, S.N. Shukla, P.M. Shah, and R.J. Verma, *Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: a multivariate analysis*. Head Neck, 2009. **31**(12): p. 1544-56.
69. Won, H.S., C.K. Jung, S.H. Chun, J.H. Kang, Y.S. Kim, D.I. Sun, and M.S. Kim, *Difference in expression of EGFR, pAkt, and PTEN between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2012. **48**(10): p. 985-990.
70. Barberán, S. and F. Cebrià, *The role of the EGFR signaling pathway in stem cell differentiation during planarian regeneration and homeostasis*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2019. **87**: p. 45-57.
71. Xia, W., Y.K. Lau, H.Z. Zhang, F.Y. Xiao, D.A. Johnston, A.R. Liu, L. Li, R.L. Katz, and M.C. Hung, *Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(12): p. 4164-74.
72. Janssen-Timmen, U., O. Traub, R. Dermietzel, H.M. Rabes, and K. Willecke, *Reduced number of gap junctions in rat hepatocarcinomas detected by monoclonal antibody*. Carcinogenesis, 1986. **7**(9): p. 1475-82.
73. Dános, K., D. Brauswetter, E. Birtalan, A. Pató, G. Bencsik, T. Krenács, I. Peták, and L. Tamás, *The Potential Prognostic Value of Connexin 43 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2016. **24**(7): p. 476-81.
74. Kazan, J.M., J. El-Saghir, J. Saliba, A. Shaito, N. Jalaeddine, L. El-Hajjar, S. Al-Ghadban, L. Yehia, K. Zibara, and M. El-Sabban, *Cx43 Expression Correlates*

- with Breast Cancer Metastasis in MDA-MB-231 Cells In Vitro, In a Mouse Xenograft Model and in Human Breast Cancer Tissues*. Cancers (Basel), 2019. **11**(4).
75. Wu, J.I. and L.H. Wang, *Emerging roles of gap junction proteins connexins in cancer metastasis, chemoresistance and clinical application*. J Biomed Sci, 2019. **26**(1): p. 8.
 76. Solan, J.L. and P.D. Lampe, *Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1711**(2): p. 154-63.
 77. Kuang, J.Y., Y.F. Guo, Y. Chen, J. Wang, J.J. Duan, X.L. He, L. Li, S.C. Yu, and X.W. Bian, *Connexin 43 C-terminus directly inhibits the hyperphosphorylation of Akt/ERK through protein-protein interactions in glioblastoma*. Cancer Sci, 2018. **109**(8): p. 2611-2622.
 78. Lampe, P.D. and A.F. Lau, *The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(7): p. 1171-86.
 79. Martinez-Useros, J. and J. Garcia-Foncillas, *The challenge of blocking a wider family members of EGFR against head and neck squamous cell carcinomas*. Oral Oncol, 2015. **51**(5): p. 423-30.
 80. Chow, L.Q.M., R. Haddad, S. Gupta, A. Mahipal, R. Mehra, M. Tahara, R. Berger, J.P. Eder, B. Burtress, S.H. Lee, B. Keam, H. Kang, K. Muro, J. Weiss, R. Geva, C.C. Lin, H.C. Chung, A. Meister, M. Dolled-Filhart, K. Pathiraja, J.D. Cheng, and T.Y. Seiwert, *Antitumor Activity of Pembrolizumab in Biomarker-Unselected Patients With Recurrent and/or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Results From the Phase Ib KEYNOTE-012 Expansion Cohort*. J Clin Oncol, 2016. **34**(32): p. 3838-3845.
 81. Hasegawa, Y., M. Goto, N. Hanai, T. Ozawa, and H. Hirakawa, *Predictive biomarkers for combined chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin in oro- and hypopharyngeal cancers*. Mol Clin Oncol, 2018. **8**(2): p. 378-386.
 82. Boguszewicz, L., *Predictive Biomarkers for Response and Toxicity of Induction Chemotherapy in Head and Neck Cancers*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 900903.

83. Wang, S., S. Zhang, Z. Zhao, C. Zhang, X. Yang, and Y. Wang, *Connexin 43 enhances paclitaxel cytotoxicity in colorectal cancer cell lines*. Exp Ther Med, 2017. **14**(2): p. 1212-1218.
84. Huang, R.-P., M.Z. Hossain, R. Huang, J. Gano, Y. Fan, and A.L. Boynton, *Connexin 43 (cx43) enhances chemotherapy-induced apoptosis in human glioblastoma cells*. International Journal of Cancer, 2001. **92**(1): p. 130-138.
85. Han, W. and H.W. Lo, *Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations*. Cancer Lett, 2012. **318**(2): p. 124-34.
86. Neuzillet, C., A. Tijeras-Raballand, L. de Mestier, J. Cros, S. Faivre, and E. Raymond, *MEK in cancer and cancer therapy*. Pharmacol Ther, 2014. **141**(2): p. 160-71.
87. Neuzillet, C., P. Hammel, A. Tijeras-Raballand, A. Couvelard, and E. Raymond, *Targeting the Ras-ERK pathway in pancreatic adenocarcinoma*. Cancer Metastasis Rev, 2013. **32**(1-2): p. 147-62.
88. Montagut, C. and J. Settleman, *Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy*. Cancer Lett, 2009. **283**(2): p. 125-34.
89. Seger, R. and E.G. Krebs, *The MAPK signaling cascade*. Faseb j, 1995. **9**(9): p. 726-35.
90. Van Damme, N., P. Deron, N. Van Roy, P. Demetter, A. Bols, J. Van Dorpe, F. Baert, J.L. Van Laethem, F. Speleman, P. Pauwels, and M. Peeters, *Epidermal growth factor receptor and K-RAS status in two cohorts of squamous cell carcinomas*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 189.
91. McArthur, G.A., *The coming of age of MEK*. Lancet Oncol, 2012. **13**(8): p. 744-5.
92. Duncan, J.S., M.C. Whittle, K. Nakamura, A.N. Abell, A.A. Midland, J.S. Zawistowski, N.L. Johnson, D.A. Granger, N.V. Jordan, D.B. Darr, J. Usary, P.F. Kuan, D.M. Smalley, B. Major, X. He, K.A. Hoadley, B. Zhou, N.E. Sharpless, C.M. Perou, W.Y. Kim, S.M. Gomez, X. Chen, J. Jin, S.V. Frye, H.S. Earp, L.M. Graves, and G.L. Johnson, *Dynamic reprogramming of the kinome in response to targeted MEK inhibition in triple-negative breast cancer*. Cell, 2012. **149**(2): p. 307-21.

93. Flaherty, K.T., C. Robert, P. Hersey, P. Nathan, C. Garbe, M. Milhem, L.V. Demidov, J.C. Hassel, P. Rutkowski, P. Mohr, R. Dummer, U. Trefzer, J.M. Larkin, J. Utikal, B. Dreno, M. Nyakas, M.R. Middleton, J.C. Becker, M. Casey, L.J. Sherman, F.S. Wu, D. Ouellet, A.M. Martin, K. Patel, and D. Schadendorf, *Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma*. N Engl J Med, 2012. **367**(2): p. 107-14.
94. Miller, C.R., K.E. Oliver, and J.H. Farley, *MEK1/2 inhibitors in the treatment of gynecologic malignancies*. Gynecol Oncol, 2014. **133**(1): p. 128-37.
95. Francipane, M.G. and E. Lagasse, *mTOR pathway in colorectal cancer: an update*. Oncotarget, 2014. **5**(1): p. 49-66.
96. Peterson, W.D., Jr., C.S. Stulberg, and W.F. Simpson, *A permanent heteroploid human cell line with type B glucose-6-phosphate dehydrogenase*. Proc Soc Exp Biol Med, 1971. **136**(4): p. 1187-91.
97. Rangan, S.R., *A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma*. Cancer, 1972. **29**(1): p. 117-21.
98. Rheinwald, J.G. and M.A. Beckett, *Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas*. Cancer Res, 1981. **41**(5): p. 1657-63.
99. Riss, T.L., R.A. Moravec, A.L. Niles, S. Duellman, H.A. Benink, T.J. Worzella, and L. Minor, *Cell Viability Assays*, in *Assay Guidance Manual*, S. Markossian, et al., Editors. 2004, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD).
100. Chou, T.C., *Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(3): p. 621-81.
101. Chou, T.C., *Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method*. Cancer Res, 2010. **70**(2): p. 440-6.
102. Calder, J., A. Nagelberg, J. Luu, D. Lu, and W.W. Lockwood, *Resistance to BET inhibitors in lung adenocarcinoma is mediated by casein kinase phosphorylation of BRD4*. Oncogenesis, 2021. **10**(3): p. 27.
103. Strober, W., *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*. Curr Protoc Immunol, 2015. **111**: p. A3 B 1-A3 B 3.

104. Wlodkowic, D., J. Skommer, and Z. Darzynkiewicz, *Flow cytometry-based apoptosis detection*. Methods Mol Biol, 2009. **559**: p. 19-32.
105. Mahmood, T. and P.C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. N Am J Med Sci, 2012. **4**(9): p. 429-34.
106. Kim, C.H., S.H. Kim, S.Y. Park, J. Yoo, S.K. Kim, and H.K. Kim, *Identification of EGFR Mutations by Immunohistochemistry with EGFR Mutation-Specific Antibodies in Biopsy and Resection Specimens from Pulmonary Adenocarcinoma*. Cancer Res Treat, 2015. **47**(4): p. 653-60.
107. Wen, Y.H., E. Brogi, A. Hasanovic, M. Ladanyi, R.A. Soslow, D. Chitale, J. Shia, and A.L. Moreira, *Immunohistochemical staining with EGFR mutation-specific antibodies: high specificity as a diagnostic marker for lung adenocarcinoma*. Mod Pathol, 2013. **26**(9): p. 1197-203.
108. Gallo, O., V. Boddi, A. Calzolari, L. Simonetti, M. Trovati, and S. Bianchi, *bcl-2 protein expression correlates with recurrence and survival in early stage head and neck cancer treated by radiotherapy*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(2): p. 261-7.
109. Wilson, G.D., M.I. Saunders, S. Dische, P.I. Richman, F.M. Daley, and S.M. Bentzen, *bcl-2 expression in head and neck cancer: an enigmatic prognostic marker*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **49**(2): p. 435-41.
110. Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, and A. Jemal, *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
111. Windon, M.J., G. D'Souza, E.M. Rettig, W.H. Westra, A. van Zante, S.J. Wang, W.R. Ryan, W.K. Mydlarz, P.K. Ha, B.A. Miles, W. Koch, C. Gourin, D.W. Eisele, and C. Fakhry, *Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults*. Cancer, 2018. **124**(14): p. 2993-2999.
112. Fung, S.Y., J.W. Lam, and K.C. Chan, *Clinical utility of circulating Epstein-Barr virus DNA analysis for the management of nasopharyngeal carcinoma*. Chin Clin Oncol, 2016. **5**(2): p. 18.
113. Hardwick, J.M. and L. Soane, *Multiple functions of BCL-2 family proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(2).

114. Trask, D.K., G.T. Wolf, C.R. Bradford, S.G. Fisher, K. Devaney, M. Johnson, T. Singleton, and M. Wicha, *Expression of Bcl-2 family proteins in advanced laryngeal squamous cell carcinoma: correlation with response to chemotherapy and organ preservation*. Laryngoscope, 2002. **112**(4): p. 638-44.
115. Li, R., A.L. Boehm, M.B. Miranda, S. Shangary, J.R. Grandis, and D.E. Johnson, *Targeting antiapoptotic Bcl-2 family members with cell-permeable BH3 peptides induces apoptosis signaling and death in head and neck squamous cell carcinoma cells*. Neoplasia, 2007. **9**(10): p. 801-11.
116. Naus, C.C. and D.W. Laird, *Implications and challenges of connexin connections to cancer*.
117. Zhou, J.Z. and J.X. Jiang, *Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions--an update*. FEBS Lett, 2014. **588**(8): p. 1186-92.
118. Mesnil, M., S. Crespin, J.L. Avanzo, and M.L. Zaidan-Dagli, *Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1719**(1-2): p. 125-45.
119. Puzzo, L., R. Caltabiano, R. Parenti, S. Trapasso, and E. Allegra, *Connexin 43 (Cx43) Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas: Preliminary Data on Its Possible Prognostic Role*. Head Neck Pathol, 2016. **10**(3): p. 292-7.
120. Brockmeyer, P., K. Jung, C. Perske, H. Schliephake, and B. Hemmerlein, *Membrane connexin 43 acts as an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma*. Int J Oncol, 2014. **45**(1): p. 273-81.
121. Tanaka, T., M. Kimura, H. Ishiguro, K. Mizoguchi, and H. Takeyama, *Connexin 43 expression is associated with poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma*.
122. Aasen, T., I. Sansano, M.A. Montero, C. Romagosa, J. Temprana-Salvador, A. Martinez-Marti, T. Moline, J. Hernandez-Losa, and S. Ramon y Cajal, *Insight into the Role and Regulation of Gap Junction Genes in Lung Cancer and Identification of Nuclear Cx43 as a Putative Biomarker of Poor Prognosis*. Cancers (Basel), 2019. **11**(3).

123. Dubina, M.V., N.A. Iatckii, D.E. Popov, S.V. Vasil'ev, and V.A. Krutovskikh, *Connexin 43, but not connexin 32, is mutated at advanced stages of human sporadic colon cancer*.
124. Zhang, Z.Q., W. Zhang, N.Q. Wang, M. Bani-Yaghoub, Z.X. Lin, and C.C. Naus, *Suppression of tumorigenicity of human lung carcinoma cells after transfection with connexin43*. Carcinogenesis, 1998. **19**(11): p. 1889-1894.
125. Mehta, P.P., C. Perez-Stable, M. Nadji, M. Mian, K. Asotra, and B.A. Roos, *Suppression of human prostate cancer cell growth by forced expression of connexin genes*. Dev Genet, 1999. **24**(1-2): p. 91-110.
126. Hirschi, K.K., C.E. Xu, T. Tsukamoto, and R. Sager, *Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential*. Cell Growth Differ, 1996. **7**(7): p. 861-70.
127. Fernstrom, M.J., L.D. Koffler, G. Abou-Rjaily, P.D. Boucher, D.S. Shewach, and R.J. Ruch, *Neoplastic reversal of human ovarian carcinoma cells transfected with connexin43*. Exp Mol Pathol, 2002. **73**(1): p. 54-60.
128. Fukushima, M., Y. Hattori, T. Yoshizawa, and Y. Maitani, *Combination of non-viral connexin 43 gene therapy and docetaxel inhibits the growth of human prostate cancer in mice*. Int J Oncol, 2007. **30**(1): p. 225-31.
129. Huang, R.P., Y. Fan, M.Z. Hossain, A. Peng, Z.L. Zeng, and A.L. Boynton, *Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43)*. Cancer Res, 1998. **58**(22): p. 5089-96.
130. Zhu, Y., *Gap Junction-Dependent and -Independent Functions of Connexin43 in Biology*. Biology (Basel), 2022. **11**(2).
131. Kotini, M., E.H. Barriga, J. Leslie, M. Gentzel, V. Rauschenberger, A. Schambony, and R. Mayor, *Gap junction protein Connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 3846.
132. Giepmans, B.N., I. Verlaan, T. Hengeveld, H. Janssen, J. Calafat, M.M. Falk, and W.H. Moolenaar, *Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules*. Curr Biol, 2001. **11**(17): p. 1364-8.

133. Tang, Z., C. Li, B. Kang, G. Gao, C. Li, and Z. Zhang, *GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses*. Nucleic Acids Research, 2017. **45**(W1): p. W98-W102.
134. Rehmani, H.S. and N. Issaeva, *EGFR in head and neck squamous cell carcinoma: exploring possibilities of novel drug combinations*. Ann Transl Med, 2020. **8**(13): p. 813.
135. Wheeler, S., D.R. Siwak, R. Chai, C. LaValle, R.R. Seethala, L. Wang, K. Cieply, C. Sherer, C. Joy, G.B. Mills, A. Argiris, J.M. Siegfried, J.R. Grandis, and A.M. Egloff, *Tumor epidermal growth factor receptor and EGFR PY1068 are independent prognostic indicators for head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(8): p. 2278-89.
136. Maarof, N.N.N., A. Alsalahi, E. Abdulmalek, S. Fakurazi, B.A. Tejo, and M.B. Abdul Rahman, *Efficacy of Afatinib in the Treatment of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Cancers (Basel), 2021. **13**(4).
137. Sullivan, I. and D. Planchard, *Next-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors for Treating EGFR-Mutant Lung Cancer beyond First Line*. Front Med (Lausanne), 2016. **3**: p. 76.
138. Truong, D.H., V.K.H. Le, T.T. Pham, A.H. Dao, T.P.D. Pham, and T.H. Tran, *Delivery of erlotinib for enhanced cancer treatment: An update review on particulate systems*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2020. **55**.
139. Cheng, Y. and H. Tian, *Current Development Status of MEK Inhibitors*. Molecules, 2017. **22**(10).
140. Li, H., J.S. Wawrose, W.E. Gooding, L.A. Garraway, V.W. Lui, N.D. Peyser, and J.R. Grandis, *Genomic analysis of head and neck squamous cell carcinoma cell lines and human tumors: a rational approach to preclinical model selection*. Mol Cancer Res, 2014. **12**(4): p. 571-82.
141. Ngan, H.L., C.H. Law, Y.C.Y. Choi, J.Y. Chan, and V.W.Y. Lui, *Precision drugging of the MAPK pathway in head and neck cancer*. NPJ Genom Med, 2022. **7**(1): p. 20.

142. Xie, G., A. Zhu, and X. Gu, *Mitogen-activated protein kinase inhibition-induced modulation of epidermal growth factor receptor signaling in human head and neck squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2021. **43**(6): p. 1721-1729.
143. Chappell, W.H., L.S. Steelman, J.M. Long, R.C. Kempf, S.L. Abrams, R.A. Franklin, J. Bäsecke, F. Stivala, M. Donia, P. Fagone, G. Malaponte, M.C. Mazzarino, F. Nicoletti, M. Libra, D. Maksimovic-Ivanic, S. Mijatovic, G. Montalto, M. Cervello, P. Laidler, M. Milella, A. Tafuri, A. Bonati, C. Evangelisti, L. Cocco, A.M. Martelli, and J.A. McCubrey, *Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health*. Oncotarget, 2011. **2**(3): p. 135-64.
144. Britten, C.D., *PI3K and MEK inhibitor combinations: examining the evidence in selected tumor types*. Cancer Chemother Pharmacol, 2013. **71**(6): p. 1395-409.
145. Avraham, R. and Y. Yarden, *Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(2): p. 104-17.
146. Prahallad, A., C. Sun, S. Huang, F. Di Nicolantonio, R. Salazar, D. Zecchin, R.L. Beijersbergen, A. Bardelli, and R. Bernards, *Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR*. Nature, 2012. **483**(7387): p. 100-3.
147. Wang, R., G. He, M. Nelman-Gonzalez, C.L. Ashorn, G.E. Gallick, P.T. Stukenberg, M.W. Kirschner, and J. Kuang, *Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition*. Cell, 2007. **128**(6): p. 1119-32.
148. Wang, Z., M. Wang, J.S. Lazo, and B.I. Carr, *Identification of epidermal growth factor receptor as a target of Cdc25A protein phosphatase*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19470-5.

11. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények:

1. **Gurbi Bianka**, Brauswetter Diána, Péntes Kinga, Varga Attila, Krenács Tibor, Dános Kornél, Birtalan Ede, Tamás László, Csala Miklós: MEK Is a Potential Indirect Target in Subtypes of Head and Neck Cancers INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES. 24, 2782 (2023) doi:10.3390/ijms24032782 **IF: 4,900**
2. **Gurbi Bianka**, Brauswetter Diána, Varga Attila, Gyulavári Pál, Péntes Kinga, Murányi József, Zámbo Veronika, Birtalan Ede, Krenács Tibor, Becker David Laurence, Csala Miklós, Vályi-Nagy István, Peták István, Dános Kornél: The potential impact of connexin 43 expression on Bcl-2 protein level and taxane sensitivity in head and neck cancers – in vitro studies CANCERS 11: 12 Paper: 1848, 19 p. (2019) doi: 10.3390/cancers11121848 **IF: 6,126**

A disszertációtól független saját közlemények:

1. Czuczai Tamás, Murányi József, Móra István, **Gurbi Bianka**, Varga Attila, Papp Dávid, Schlosser Gitta, Csala Miklós, Csámpai Antal: Development of Novel Imipridones with Alkyne- and Triazole-Linked Warheads on the Tricyclic Skeleton, Showing Superior Ability to Eradicate PANC-1 and Fadu Cells Compared to ONC201. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 25: 23 Paper: 13176 (2024) doi: 10.3390/ijms252313176 **IF: 4,900 (2023)**
2. **Gurbi Bianka**, Dános Kornél, Birtalan Ede, Krenács Tibor, Kovács Borbála, Tamás László, Csala Miklós, Varga Attila: Potential Prognostic Role of Protein Kinase D Isoforms in Head and Neck Cancers. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 25: 19 Paper: 10274 (2024) doi: 10.3390/ijms251910274 **IF: 4,900 (2023)**
3. Murányi József, Duró Cintia, **Gurbi Bianka**, Móra István, Varga Attila, Németh Krisztina, Simon József, Csala Miklós, Csámpai Antal: Novel Erlotinib–Chalcone Hybrids Diminish Resistance in Head and Neck Cancer by Inducing Multiple Cell Death Mechanisms. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 24: 4 Paper: 3456, 18 p. (2023) doi: 10.3390/ijms24043456 **IF: 4,900**

4. Varga Attila, Nguyen Minh Tu, Péntzes Kinga, Bátaí Bence, Gyulavári Pál, **Gurbi Bianka**, Murányi József, Csermely Péter, Csala Miklós, Vántus Tibor, Sőti Csaba: Protein Kinase D3 (PKD3) Requires Hsp90 for Stability and Promotion of Prostate Cancer Cell Migration. CELLS 12: 2 Paper: 212, 15 p. (2023) doi: 10.3390/cells12020212 **IF: 5,100**
5. Pethő Lilla, Murányi József, Péntzes Kinga, **Gurbi Bianka**, Brauswetter Diána, Halmos Gábor, Csík Gabriella, Mező Gábor: Suitability of GnRH Receptors for Targeted Photodynamic Therapy in Head and Neck CancersINTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 20: 20 Paper: 5027, 17 p. (2019) doi: 10.3390/ijms20205027 **IF: 4,556**
6. Birtalan Ede, Dános Kornél, **Gurbi Bianka**, Brauswetter Diána, Halász Judit, Kalocsáné Piurko Violetta, Ács Balázs, Antal Bíborka, Mihályi Réka, Pató Anna, Fent Zoltán, Polony Gábor, Tímár József, Tamás László: Expression of PD-L1 on Immune Cells Shows Better Prognosis in Laryngeal, Oropharyngeal, and Hypopharyngeal Cancer. APPLIED IMMUNOHISTOCHEMISTRY & MOLECULAR MORPHOLOGY 26: 7 pp. e79-e85 (2018). doi: 10.1097/PAL.0000000000000590 **IF: 1,863**
7. Brauswetter Diána, **Gurbi Bianka**, Varga Attila, Várkondi Edit, Schwab Richárd, Bánhegyi Gábor, Fábián Orsolya, Kéri György, Vályi-Nagy István, Peták István: Molecular subtype specific efficacy of MEK inhibitors in pancreatic cancers. PLOS ONE 12: 9 Paper: e0185687, 13 p. (2017) doi: 10.1371/journal.pone.0185687 **IF: 2,766**
8. Murányi József, Varga Attila, **Gurbi Bianka**, Gyulavári Pál, Mező Gábor, Vántus Tibor: In Vitro Imaging and Quantification of the Drug Targetng Efficiency of Fluorescently Labeled GnRH Analogues. JOVE-JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS 2017: 121 Paper: e55529, 9 p. (2017) doi: 10.3791/55529 **IF: 1,184**
9. Brauswetter Diána, Dános Kornél, **Gurbi Bianka**, Félegyházi Fruzsina Éva, Birtalan Ede, Meggyesházi Nóra, Krenács Tibor, Tamás László, Peták István: Copy number gain of PIK3CA and MET is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. VIRCHOWS ARCHIV 468: 5 pp. 579-587., 9 p. (2016) doi: 10.1007/s00428-016-1905-1 **IF: 2,848**

13. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni volt és jelenlegi témavezetőimnek, Dr. Vántus Tibornak és Prof. Dr. Csala Miklósnak, hogy PhD munkásságom alatt támogatott, tanácsokkal látott el, lehetőséget nyújtott a legmodernebb módszerek megismerésére.

Köszönettel tartozom az MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport egykori vezetőjének, Prof. Dr. Kéri Györgynek a kutatásaim során nyújtott rengeteg segítségért, bátorításért, barátságáért és a lehetőségért, hogy munkacsoportjában dolgozhattam.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Molekuláris Biológiai Tanszékének jelenlegi, és volt igazgatójának Prof. Dr. Csala Miklósnak, Dr. Keszler Gergelynek és Prof. Dr. Bánhegyi Gábornak, hogy helyet és lehetőséget biztosítottak a munkám elvégzésére.

Hálával tartozom az MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport, illetve a Tumorbiológia Kutatócsoport tagjainak és a Semmelweis Egyetem Molekuláris Biológiai Tanszék dolgozóinak, Dr. Brauswetter Diánának, Dr. Pénzes Kingának, Tanai Henriettnek, Dr. Varga Attilának, Dr. Gyulavári Pálnak, Dr. Murányi Józsefnek és Dr. Keresztes Dávidnak mind a szakmai, mind pedig a baráti téren nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikája igazgatójának Prof. Dr. Tamás Lászlónak, aki nagyban segítette PhD munkásságomat. Kiemelten köszönöm Dr. Dános Kornél és Dr. Birtalan Ede segítségét, akikkel együtt dolgozhattam és kutathattam az évek során.

Köszönet illeti az I. Számú Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetéből Dr. Krenács Tibort, hogy laborjában végezhettem a szövettani festéseket. Köszönöm, hogy mindig szívesen látott és rengeteg ötlettel látott el.

Végezetül hálával és köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, hogy végig biztattak, támogattak PhD tanulmányaim folyamán.