Prediktív és prognosztikus molekuláris markerek szolid daganatokban

Doktori értekezés

Dr. Brauswetter Diána

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Peták István, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Törőcsik Beáta, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Tátrai Péter, Ph.D., szenior kutató

Szigorlati bizottság
elnöke: Dr. Tretter László, D.Sc., egyetemi tanár
tagjai: Dr. Csermely Péter, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Reményi Attila, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2017

Tartalomjegyzék

1 Rövidítésjegyzék ... 5

2 Bevezetés – Irodalmi háttér ... 9

2.1 Rosszindulatú daganatok jelentősége ... 10

2.1.1 Fej-nyaki és hasnyálmirigy daganatok kitüntetett helyzete világviszonylatban ... 11

2.1.2 Fej-nyaki és hasnyálmirigy daganatok kitüntetett helyzete Magyarországon ... 14

2.2 Anatómia és patológia ... 15

2.3 Legfontosabb etiológiai tényezők ... 17

2.3.1 Fej-nyaki daganatokban ... 18

2.3.1.1 Környezeti tényezők (Kémiai/fizikai, fertőzések) ... 18

2.3.1.2 Öröklött tényezők ... 20

2.3.2 Hasnyálmirigy daganatokban ... 20

2.3.2.1 Környezeti tényezők (kémiai/fizikai, fertőzések) ... 20

2.3.2.2 Öröklött tényezők ... 21

2.4 Molekuláris patológia ... 21

2.4.1 Fej-nyaki daganatok ... 21

2.4.2 Hasnyálmirigy daganatok ... 23

2.5 A daganat prognózisát meghatározó molekuláris tényezők ... 26

2.5.1 Fej-nyaki daganatokban leggyakrabban használt prognosztikai markerek ... 26

2.5.2 Hasnyálmirigy daganatokban leggyakrabban használt prognosztikai markerek ... 28

2.6 Célzott daganatterápiás lehetőségek és prediktív molekuláris markereik ... 29

2.6.1 Fej-nyaki daganatok ... 30

2.6.1.1 Standard, kemoterápiás lehetőségek ... 30

2.6.1.2 Engedélyezett (FDA, EMA által) célzott terápiás daganatellenes szerek ... 30

2.6.1.3 Lehetséges terápiás célpontok ... 32

2.6.2 Hasnyálmirigy daganatokban ... 34

2.6.2.1 Standard, kemoterápiás lehetőségek ... 34

2.6.2.2 Engedélyezett (FDA, EMA által) célzott terápiás daganatellenes szerek ... 34

2.6.2.3 Lehetséges terápiás célpontok ... 35

2.7 Precíziós onkológia és transzlációs medicina jelentősége a daganatterápiában ... 37

3 Célkitűzések ... 39

4 Anyag és módszerek ... 40

4.1 Szövettani mintákon alkalmazott módszerek ... 40

4.1.1 Fej-nyaki daganatok ... 40

4.1.1.1 Adatgyűjtés, betegek 40
4.1.1.2 TMA-blokk 42
4.1.1.3 Immunhisztokémia – manuális 43
4.1.1.4 Immunhisztokémia – gépi 45
4.1.1.5 Fluoreszcens in situ hibridizáció 46
4.1.1.6 HPV genotipizálás 47
4.1.1.7 Statisztikai analízis 48
4.1.2 Hasnyálmirigy daganatok 48
4.1.2.1 Adatgyűjtés, betegek 48
4.2 In vitro módszerek 49
4.2.1 Daganatos sejtvonalak származása és tenyésztésük 49
4.2.1.1 Hasnyálmirigy daganatos sejtvonalak 49
4.2.1.2 Fej-nyaki daganatos sejtvonalak 49
4.2.2 Tirozin-kináz inhibítorok 49
4.2.3 Életképesség mérések 50
4.2.4 Gyógyszer-szinergizmusok vizsgálata (Compusyn) 50
4.2.5 DNS izolálása sejtvonalakból és új-generációs szekvenálás 50
4.2.6 Western blot vizsgálat 51
4.2.7 Fluoreszcens immuncitokémia 53
5 Eredmények 54
5.1 Prediktív és prognosztikus biomarkerek vizsgálata fej-nyaki daganatokban 54
5.1.1 A *PIK3CA* és *MET* CNG gyakorisága 54
5.1.2 A *PIK3CA* és *MET* CNG prognosztikai szerepe 55
5.1.3 *PIK3CA* CNG összefüggése a $p16^{INK4}$-státusszal 58
5.1.4 A *PIK3CA* és *MET* CNG összefüggése a betegek klinikopatológiai paramétereivel 58
5.1.5 A *MET* CNG összefüggése a daganat EGFR expressziójával 59
5.1.6 $p16^{INK4}$-státusz lokalizációbeli különbségei és prognosztikai jelentősége fej-nyaki daganatokban 60
5.1.7 A HPV-sátutsz prognosztikai szerepe és a $p16^{INK4}$-festés specificitása ennek előrejelzésére 63
5.1.8 A dohányzás etiológiai szerepe a $p16^{INK4}$-pozitív fej-nyaki daganatos páciensek körében 65
5.1.9 Fej-nyaki daganatos sejtvonalak molekuláris háttere és tirozin-kináz inhibítor érzékenységük közötti összefüggés 67
5.1.10 A connexin 43 foszforilációja és membrán lokalizációja 70

5.2 Prediktív és prognosztikus biomarkerek vizsgálata hasnyálmirigy daganatokban ... 72

5.2.1 Hasnyálmirigy daganatos páciensek és sejtvonalak NGS eredményének vizsgálata ... 72

5.2.2 A sejtvonalak KRAS mutációja és MEK-inhibítor érzékenysége közötti összefüggés ... 73

5.2.3 A hasnyálmirigy daganatos sejtvonalak tirozin-kináz inhibítor érzékenysége molekuláris altípustól függő ... 76

6 Megbeszélés ... 79

6.1 Precíziós medicina: Molekuláris marker alapú kezelés jelentősége az onkológiában ... 79

6.1.1 Génkópiaszám változások szerepe a daganatok prognózisában és kezelésében (*MET* és *PIK3CA*) ... 79

6.1.2 $p16^{INK4}$-expresszió és HPV-pozitivitás magyar betegek fej-nyaki daganataiban ... 82

6.1.3 Progressziós markerek potenciális változása a daganat kezelése során – connexin 43 ... 84

6.2 Transzlációs medicina: Daganat sejtmodellek használata a rákkutatásban ... 86

6.2.1 Célzott terápiás ágensek eltérő hatásának lehetséges okai fej-nyaki daganatokban ... 86

6.2.2 Terápiás válasz előrejelzése eltérő molekuláris altípusba sorolt hasnyálmirigy daganatok esetében ... 87

7 Következtetések ... 92

8 Összefoglalás ... 94

9 Summary ... 95

10 Irodalomjegyzék ... 96

12 Saját publikációk jegyzéke ... 123

13 Köszönetnyilvánítás ... 125

14 Függelék ... 126

1 Rövidítésjegyzék

5-FU	5-fluorouracil
Abl	Abelson tirozin-kináz
Akt	Protein kináz B
ALK	anaplastic lymphoma kinase – anaplasztikus limfóma kináz
ARID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A – AT-gazdag interaktív domén tartalmú fehérje 1A
ASR	age-standardized rate – korstandardizált arány
BCR	B-sejt receptor
BSA	Bovine serum albumin – szarvasmarha szérum albumin
CASP8	caspase 8 – kaszpáz 8
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A - ciklin dependens kináz gátló 2A
CI	combination index – kombinációs index
CNA	copy number alteration – kópiaszám változás
CNG	copy number gain – kópiaszám emelkedés
COSMIC	Catalogue of somatic mutation in cancer
DAB	3,3'- diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
DTT	Ditiotreitol
E2F	E2F transzkripciós faktor
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	Epidermal Growth Factor – epidermális növekedési faktor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor – epidermális növekedési faktor receptor
EMA	European Medical Agency – Európai Gyógyszerügyi Hatóság
EMEM	Eagle's Minimum Essential medium
EML4	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 – echinoderm mikrotubulus asszociált fehérje 4

ERK	Extracellular signal-regulated kinase – extracelluláris szignál által szabályozott kináz
EXTREME	ErbituX in first-line Treatment of Recurrent or Metastatic head neck cancer – Erbitux a kiújult vagy áttétes fej-nyaki daganatok kezelésére
FAT1	Cadherin.related tumor suppressor homolog – kadherin-rokon tumor szuppresszor komológ
FBS	fetal bovine serum – magzati marha savó
FDA	Food and Drug Administration – az Egyesült Államok gyógyszer- és élelmiszerügyi hatóság
FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded – formalin-fixált, paraffinba ágyazott
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor – fibroblaszt növekedési faktor receptor
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
HGF	hepatocyte growth factor – hepatocita növekedési faktor
HGFR	hepatocyte growth factor receptor – hepatocita növekedési faktor receptor
HIER	Heat induced epitope retrieval – hőindukált epitóp feltárás
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma – fej-nyaki laphámrák
HPV	human papillomavirus – humán papillomavírus
HR	hazard ratio – relatív kockázat
HRAS	Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration – a maximális hatás felét kiváltó koncentráció
IgG1	immunglobulin G1
IHC	Immunohistochemistry – immunhisztokémia
IRF6	interferon regulatory factor 6 – interferon szabályozó faktor 6

KI	konfidencia intervallum
Ki-67	MKI67 – marker of proliferation Ki-67 – Ki-67 proliferációs marker
KMT2D	histone-lysine N-methyltransferase 2D – hiszton lizin N-metiltranszferáz 2D
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	mitogen-activated protein kinase – mitogén aktivált protein kináz
MEK	MAP2K = mitogen-activated protein kinase kinase 1 – mitogén aktivált protein kináz kináz 1
MET	HGFR
MLL3	mixed-lineage leukemiaprotein 3
mRNS	hírvivő „messenger” ribonukleinsav
mTOR	mammalian target of Rapamycin – a Rapamycin emlős célpontja
MZ	mycozap antibiotikum mix
NCBI	National Center for Biotechnology Information – az Egyesült Államok biotechnológiai információs központja
NFκB	Nuclear factor κB
NGS	Next Generation Sequencing – új-generációs szekvenálás
NRAS	neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NSCLC	non-small cell lung cancer – nem-kissejtes tüdőrák
OS	Overall survival – terjes túlélés
p16INK4	CDKN2A
PBS	phosphate buffered saline – foszfát pufferelt só (oldat)
PCR	Polimerase chain reaction – polimeráz láncreakció
PD-L1	programmed death-ligand 1 – programozott sejthalál ligand 1
PD1	programmed cell death protein 1 – programozott sejthalál fehérje 1
PDGFR	Platelet derived growth factor – vérlemezke eredetű növekedési faktor
PFS	Progression free survival – progressziómentes túlélés
PI3K	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát 3-kináz
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha - foszfatidilinozitol-4,5 – biszfoszfát 3-kináz alfa katalitikus alegysége
PKB	protein kináz B

PTEN	phosphate and tensin homolog – foszfát és tenzin homológ
Raf	rapid accelerated fibrosarcoma gén
Rb	Retinoblastoma
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SDS	Nátrium lauril-szulfát
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis, nátrium-lauril-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
Src	Szarkóma tirozin-kináz
SSC	Saline-sodium citrate – Nátrium-citrát puffer
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20 Tris pufferelt só (oldat) Tween 20-szal
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TERT	telomeráz reverz transzkriptáz
TMA	tissue microarray – szöveti mikrochip
TNM	tumor-node-metastais – daganatok stádium besorolására alkalmazott rendszer
TP53	tumor protein p53
Tris	tris-hirdoximetil-aminometán
UCCC	University of Colorado Cancer Center
UICC	Union for International Cancer Control
WHO	Word Health Organization - Egészségügyi Világszervezet

2 Bevezetés – Irodalmi háttér

Az elmúlt évtizedekben szemléletváltás következett be a daganatterápiában. A 20. század áttörést hozott a daganatok anatómiai (sebészi és radioterápia) és kemoterápiás kezelésében javítva a túlélést és az életminőséget. Azonban a magas toxicitás és sok - főként előrehaladott, metasztatikus - daganat (például hasnyálmirigy rák) esetében tapasztalt sikertelenség új, hatékonyabb és talán jobban tolerálható mellékhatás profilú kezelőszerek fejlesztését tette szükségessé. 1998-ban megjelent az első személyre szabott kezelés, az FDA engedélyezte a trastuzumab HER2-ellenes antitest használatát olyan emlőrákos betegek esetében, akik daganatában a HER2 fehérje túltermelődése mutatható ki. A Human Genom Projekt betekintést engedett az emberi örökítőanyagba és egyre több betegség, többek között a rosszindulatú daganatok esetében is megkezdődött a genetikai háttér felderítése [1, 2]. Ez a folyamat lehetővé tette, hogy daganat alcsoportokban specifikus célpontokat definiálhassunk, és azokat gátolva érhessünk el nagyobb hatékonyságot a daganatkezelésben. Ezeket az egy vagy néhány fehérjét nagy specificitással gátló kezelőszereket nevezzük célzott terápiás ágenseknek. A daganat alcsoportok azonban ritkán követik az anatómiát, hisztológiát, inkább egyéb biomarkereken (mutáció, expresszió, génkópiaszám változás), tehát a daganat molekuláris hátterén alapulnak [3, 4]. Az utóbbi években a klinikai vizsgálatok tervezésében is hasonló eltolódást figyelhetünk meg. A szövettani diagnózison, elhelyezkedésen alapuló vizsgálatok mellett lassan teret hódítanak a molekuláris biomarker alapú, úgynevezett genotípushoz illesztett („genotype matched”) klinikai vizsgálatok. Ezek a vizsgálatok a szövettani határokat átlépve mutációs, expressziós mintázat, vagyis célpontok alapján gyűjtik össze a betegeket egy-egy daganatellenes kezelőszer tesztelésére. 2016-ban Stockley és munkatársai kimutatták, hogy a genotípushoz illesztett klinikai vizsgálatokban részt vevő betegek túlélése szignifikánsan kedvezőbb volt, mint a hagyományos anatómiai/hisztológiai alapon besorolt társaiké [5]. Természetesen a klinikai szakmák anatómián alapuló különválásuk miatt a lokalizáción, szövettanon alapuló csoportosítás mindig részét képezi a terápiának, de fontos lehet feltárni azt, hogy az adott régió daganatai esetén mely biomarkerek vizsgálatát érdemes kezdeményezni, és milyen molekuláris marker alapú

csoportok különíthetők el. Ezek a markerek ugyanis a betegség kimenetele, prognózisa mellett meghatározhatják a terápia hatékonyságát (prediktív markerek).
A leírtak alapján érthető, hogy a beteget és a daganatot minél jobban megismerve, genetikai hátterüket minél alaposabban tisztázva lehetővé válik a legmegfelelőbb, személyre szabott daganatellenes kezelés kiválasztása. Ez utóbbi a precíziós medicina illetve precíziós onkológia tudományágának feladata.

2.1 Rosszindulatú daganatok jelentősége

A Globocan legutóbbi átfogó statisztikai adatai alapján 2012-ben 14,1 millió daganatos megbetegedést diagnosztizáltak, és 8,2 millió haláleset volt a ráknak tulajdonítható (a statisztikai adatok nem tartalmazzák a nem-melanóma típusú bőrdaganatokat). A rosszindulatú daganatos megbetegedés egyben a vezető haláloki tényezőt is képviseli mind a fejlett, mind a fejlődő országokban [6]. A WHO frissebb, 2015-ös mortalitási adatai alapján a stroke-ot (11,1%) megelőzve, az iszkémiás szívbetegséghez hasonlóan (15,5%) a halálesetek 15,5%-át okozza. Ez a 2015-ös évben 8,7 millió elvesztett emberéletet jelentett [7]. A két adatot megvizsgálva jól érzékelhető a mortalitás néhány év alatt bekövetkező emelkedése. Egy 2009-es Egyesült Államokban végzett tanulmány a daganat incidencia emelkedését 2010-től a 2030-as évig 45%-osra becsülte (2010-ben 1,6 millióról 2030-ra 2,3 millióra növekszik). Ennek a jelenségnek magyarázatául a fejlődő társadalmakban az utóbbi évtizedekben megfigyelhető demográfiai eltolódás szolgál, a 65 év feletti populáció aránya jelentős növekedésbe kezdett [8]. A populáció fokozatos elöregedése mellett a daganatos esetek számának abszolút gyarapodásához hozzájárul még a fejlődő országok népességének rohamos növekedése is. Ezen gazdaságilag kevésbé fejlett országokat jobban érintik azok az életviteli tényezők (dohányzás, táplálkozás, fizikai aktivitás), melyek köztudottan összefüggésbe hozhatók a daganatok megjelenésével [6].

Az európai mortalitási trendeket vizsgáló 2013-as tanulmány alapján bár általánosan elmondható, hogy a legtöbb daganattípus életkor-standardizált aránya csökken, a kontinensen belül, az országok között jelentős különbségek vannak. A kelet- és közép-európai régió országaiban (Oroszországot és Romániát kiemelve) kevésbé figyelhetők meg a kedvező változások. Ez a jelenség jól érzékelhető, ha összehasonlítjuk a férfiak 2005-2009 közötti daganatos halálozási adatait a legjobb prognózisú Svédországban

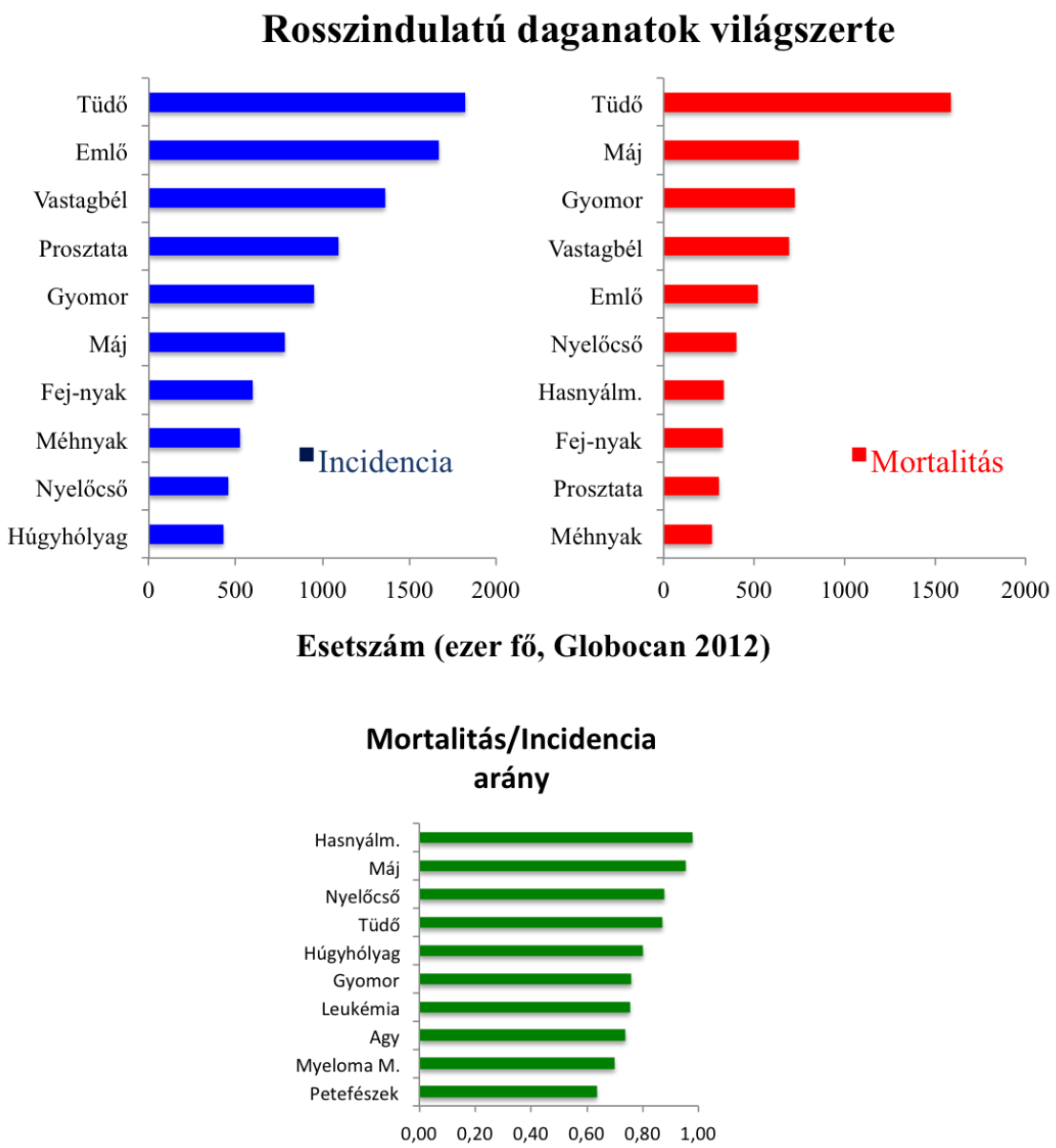
(112,9/100000) és a legrosszabbul teljesítő Magyarországon (235,2/100000). Több, mint kétszeres különbséget tapasztalunk [9].

2.1.1 Fej-nyaki és hasnyálmirigy daganatok kitüntetett helyzete világviszonylatban

A három leggyakrabban előforduló daganattípus évek óta változatlanul a tüdőrák, az emlő- illetve a vastagbél rosszindulatú daganata, melyet a prosztata és a gyomor malignus elváltozása követ (1. ábra). A halálozási adatok tekintetében azonban ez a sorrend már megváltozik, melyben nagy szerepe van a korai daganatszűrési lehetőségeknek. Bár a tüdődaganat ebben a tekintetben továbbra is vezető szerepet tölt be, azonban mind a máj, mind a gyomor rosszindulatú daganata megelőzi a vastagbél- és emlőrákot a Globocan 2012 mortalitási adatai alapján (1. ábra) [6, 10]. Egy 2014-es amerikai tanulmány demográfiai adatok és a korábbi évek tendenciájának figyelembe vételével előrevetítette a daganatos halálozásokat a 2020-as és 2030-as évekre [11]. Azt a meglepő eredményt kapták, hogy a halálozást illetően a hasnyálmirigy adenokarcinóma 2030-ra közvetlenül a tüdőrák mögé, a második helyre kerül majd. A hasnyálmirigy rosszindulatú daganatának különleges helyzetét és fontosságát az is mutatja, hogy ezen daganattípus esetén a legmagasabb a mortalitás/incidencia (M/I) érték: 0,98. Ez a mutató jól érzékelteti a hasnyálmirigy daganat továbbra is igen kedvezőtlen prognózisát (1. ábra).

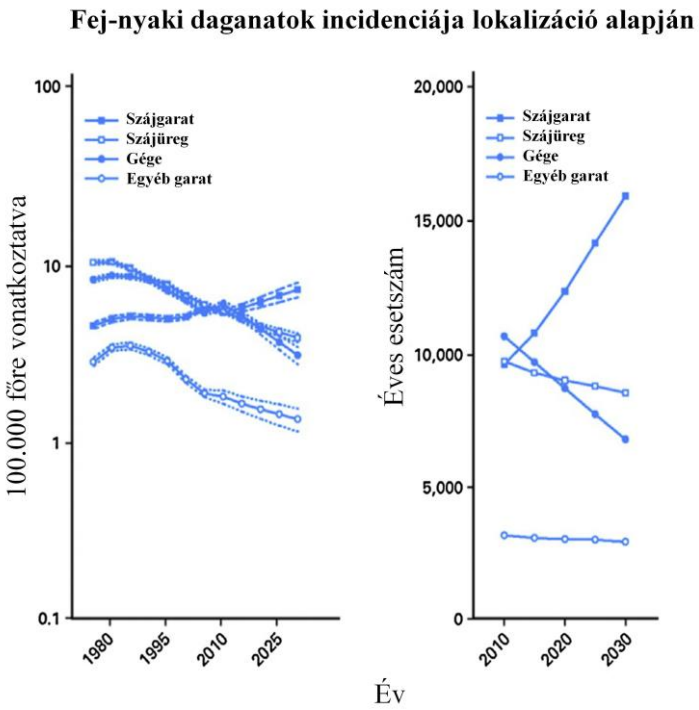
A hasnyálmirigy daganatok fontosságát magas letalitása mellett az is mutatja, hogy azon kevés daganattípus közé tartozik, amely korstandardizált mortalitása (bár országonként kisebb eltérések tapasztalhatók a tendenciában) legtöbbször növekedést mutat [9, 12]. A másik ilyen daganattípus Európában a nők tüdőrákja [9]. Ennek magyarázata a dohányzási szokások nemi sajátosságában keresendő. A dohányzás és a tüdőrák közötti ok-okozati összefüggésről szóló tanulmány 1950-ben jelent meg [13]. Az ezt követően bevezetett megszorítások hatására, közel 20 éves csúszással a dohányzással összefüggő daganatok száma is csökkenni kezdett. Nők esetében a cigaretta használatának kezdete időben a második világháború idejére tehető, sokkal későbbre, mint a férfiaknál. Így a Thun és munkatársai által 2012-ben közölt kutatás során is használt [14], 1994-ben felállított négystádiumú modellben (I.: dohányzási epidémia kezdete, II.: gyors emelkedés a cigaretta fogyasztásban, III.: csökkenő

tendencia a dohányzásban IV.: csökkenni kezdenek a dohányzással összefüggő halálozási számok) a nők esetén a IV. stádium jelentős csúszásban van a férfiakhoz képest. Ez okozza azt, hogy a dohányzással összefüggő daganatok mortalitása, mint a tüdőrák (illetve többek között fej-nyaki laphámrák és hasnyálmirigy adenokarcinóma), sem fordult még csökkenő irányba.



1. ábra: Rosszindulatú daganatok incidenciája és mortalitása világszerte a Globocan 2012-es adatai alapján: Mortalitás/incidencia adatok alapján kiemelkedik a hasnyálmirigy daganatok kedvezőtlen prognózisa.

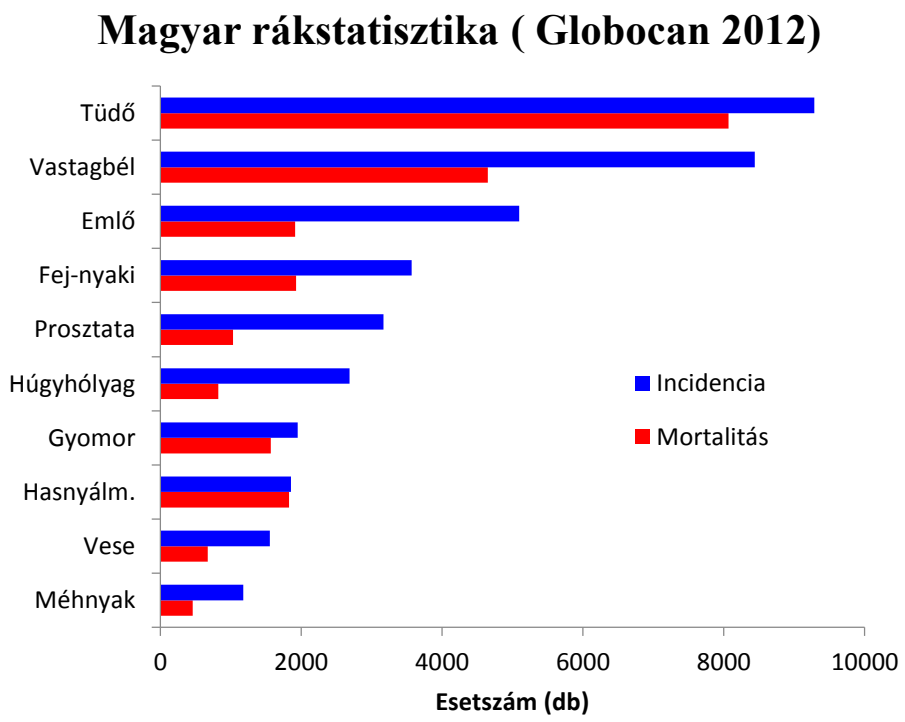
A fej-nyaki régió rosszindulatú elváltozásai a rangsorban csupán a hetedik helyen állnak, és a daganat mortalitása a férfiak és nők esetében is a tüdőrákéhoz hasonló tendenciát mutat. A dohányzási szokások változásával a gége, algarat és szájüreg daganatainak gyakorisága csökkenni kezdett. Azonban meglepő módon volt egy régió, ahol a malignitások előfordulása nemtől függetlenül emelkedést mutatott, ez a régió pedig a szájgarat (oropharynx) (2. ábra). A jelenség magyarázatát keresendő intenzív kutatás indult, melynek eredményeként 2000-ben Gillison és munkatársai igazolták az ok-okozati összefüggést a humán papillomavírus (HPV) és ezen régió daganatai között [15]. Felfedezésük óta nem lehet a fej-nyaki régió (főként szájgarat) danagatait úgy vizsgálni, hogy ne nyilatkoznánk valamilyen módon az adott daganat patogenezisének HPV-vel való összefüggéséről. Az amerikai (USA) előrejelzések alapján hamarosan az oropharynx rosszindulatú daganata lesz a leggyakoribb HPV által indukált daganattípus és emellett a felső légúti daganatok közül a legtöbbször előforduló [16].



2. ábra: Fej-nyaki daganatok incidenciájának változása az elmúlt évtizedekben és az elkövetkező évtizedekre előre vetítve: A szájgarati régió daganatainak előfordulása a többi régióétól elkülönülten meredeken emelkedik.

2.1.2 Fej-nyaki és hasnyálmirigy daganatok kitüntetett helyzete Magyarországon

Magyarország helyzete a tüdő-, vastagbél- és emlődaganatok tekintetében igen hasonló a világviszonylathoz. Azonban meglepő módon a negyedik leggyakoribb daganattípus hazánkban a fej-nyaki laphámrák, mely a mortalitást illetően a harmadik helyre ugrik fel közvetlenül az emlő és hasnyálmirigy daganat elé (3. ábra) [6]. A hasnyálmirigy daganatai bár a nyolcadik helyen állnak, M/I értékük hazánkban is 0,98, tehát legtöbbször fatális kimenetelűek.

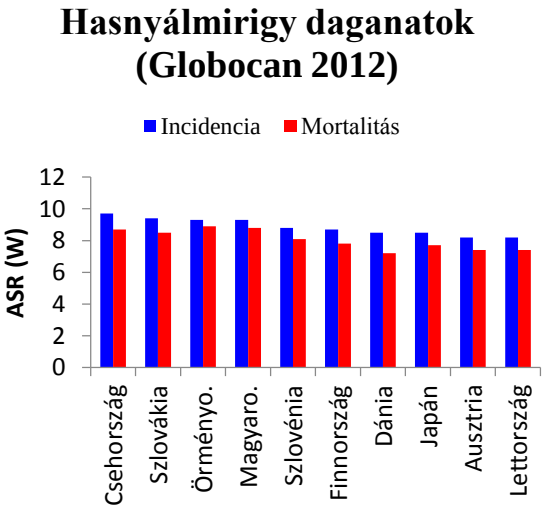


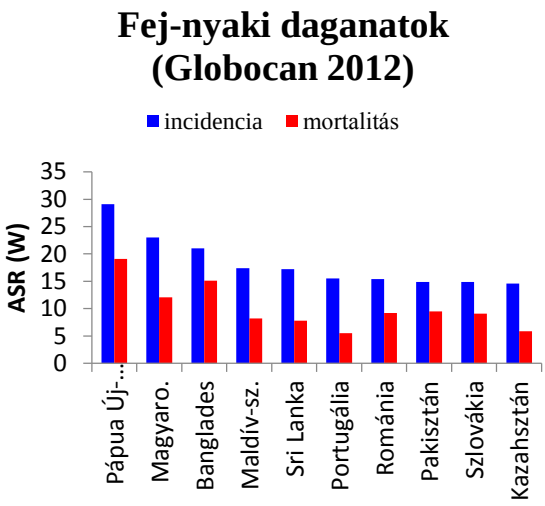
3. ábra: Rosszindulatú daganatok incidenciája és mortalitása Magyarországon a Globocan 2012-es adatai alapján: A fej-nyaki daganatok hazánkban a 4., míg a hasnyálmirigy daganatai a 8. leggyakoribb daganattípust képviselik.

A WHO és a Nemzeti Rákregiszter adatai alapján a hasnyálmirigy daganatok incidenciája és mortalitása hazánkban mindkét nem esetében növekszik [7, 17]. Mivel fej-nyaki daganatok pontos anatómiai lokalizáció szerinti elemzésére sajnos a WHO adatbázisa nem nyújt lehetőséget, így a Nemzeti Rákregiszter 2004 és 2014 között regisztrált eseteit dolgoztam fel a szájüregi, gége, algarat és szájgarati régiókra

vonatkozóan. A magyar adatok is tükrözik a világszerte tapasztalt változásokat. A fej-nyaki daganatban szenvedő nőket illetően minden régió esetén enyhe növekedést tapasztalunk, míg összességében (mindkét nem tekintetében) a szájgarati régió kivételével minden lokalizációban enyhe csökkenést tapasztalunk az éves esetszámban.

Azt, hogy ezzel a két daganattípussal kiemelten foglalkozzunk az is indokolja, hogy Magyarország kirívóan rossz helyen áll a világ összes országának adatait összehasonlító Globocan 2012 adatbázis alapján a daganatok incidenciáját és mortalitását vizsgálva egyaránt (4. ábra).





4. ábra: Hasnyálmirigy és fej-nyaki daganatok incidenciája és mortalitása a Globocan 2012-es felmérése során vizsgált országokban: Magyarország mindkét daganattípus esetében kedvezőtlen (2. és 4.) helyet foglal el.

2.2 Anatómia és patológia

Anatómia, lokalizáció

Fej-nyaki daganatok

A fej-nyaki daganatok (head and neck cancer) elnevezés tág értelemben minden fejen és nyakon megjelenő tumoros elváltozásra vonatkozik, kivételt jelentenek a szemüregi és központi idegrendszeri daganatok. Bár a régiót tekintve ebbe a kategóriába sorolhatnánk, szintén nem tartozik a fej-nyaki daganatok körébe a pajzsmirigy daganata igen eltérő patológiája és klinikuma miatt egyaránt. A fej-nyaki daganatok 90%-a

laphámrák (squamous cell carcinoma). Lokalizáció szerint ezen daganatok esetében az alábbi kategóriákat szokás elkülöníteni (forrás: UICC):

Szájüreg: A szájüreg részei: a bukkális mukóza, felső alveolus és gingiva (felső íny), alsó alveolus és gingiva (alsó íny), a nyelv elülső kétharmada, szájfenék.

Garat:

Orrgarat (nasopharynx): Az orrgarat hátsó-felső fala, a lágy- és kemény szájpad határától a koponyaalapig húzódik, alsó határa a lágyszájpad felső felszíne.

Szájgarat (oropharynx): A szájagarat elölről a nyelvgyök, vallecula, oldalról a garatmandula/tonsillaris garatívek, felülről a lágy szájpad alsó felszíne és uvula által határolt egység.

Algarat: A garat legalsó, nyelőcsőhöz közeli szakasza. Az algarat három részre osztható: 1) garat-nyelőcső átmenet (postcricoid régió), 2) sinus piriformis, 3) hátulsó garatfal.

Gége: A gégén belül három régiót szokásos elkülöníteni. A szupraglottikus régiót (epiglottis, kannaporc, aryepiglottikus redő, álhangszalag), glottikus (comissura anterior és hangszalag) és szubglottikus régiót.

Orr és Orrmelléküregek: Ebbe a régióba tartozik az orrüreg alsó, oldalsó fala és az orrsövény mellett az arcüreg és a rostacsonti üreg.

Nyálmirigyek: Három nagy nyálmirigyet és több, elszórtan elhelyezkedő kis nyálmirigyet különböztetünk meg. Nagy nyálmirigyek közé tartozik a fültőmirigy, az állkapocs alatti mirigy és a nyelv alatti mirigy.

Hasnyálmirigy daganatok

A hasnyálmirigy 12-15 cm hosszúságú retroperitoneális szerv, melynek leggyakoribb malignus elfajulása a hasnyálmirigy adenokarcinóma (ezt szokás általánosságban hasnyálmirigy ráknak nevezni). Az invazív adenokarcinóma (definíció szerint) mirigyeket formál és beszűri a környező szövetet. Több variánsát leírták már, amit az adenoszkvamózus, kolliod vagy signet sejtes carcinoma. A szerv második leggyakoribb tumortípusa a neuroendokrin tumor [18]. Dolgozatom további részében hasnyálmirigy daganat elnevezés alatt kizárólag az adenokarcinómákat értem.

Stádium, TNM

A daganat malignitásának és prognózisának egyik legmeghatározóbb tényezője a daganat kiterjedése a diagnózis pillanatában. Ez a tényező meghatározza a prognózis mellett a tumor kezelési protokollját is. A stádiumot 0-4-es skálás szokásos megadni: 0: nem invazív, in situ daganat, 1: lokális daganat, 2: lokális daganat, kiterjedtebb invázió (esetleg nyirokcsomó áttét) 3: lokális, de kiterjedt daganat, kiterjedt nyirokcsomó áttétek, 4: lokális daganat, nagyfokú invázió, távoli áttét. A stádium beosztásban daganattípusonként enyhe eltérés tapasztalható. A UICC időről-időre minden daganattípusra kiad egy pontosabb beosztást lehetővé tevő TNM-klasszifikációs rendszert. Ebben a rendszerben a T paraméter a primer tumorra jellemző adat (0: nincs, 1-4: nagyság, lokális kiterjedés meghatározása), az N paraméter a regionális nyirokcsomókat jellemzi (0: nincs áttét, 1-3: nyirokcsomó érintettség növekvő mértékben) és az M paraméter a távoli metasztázis jelenlétét írja le (0: nincs, 1: jelen van)

Hisztológiai differenciáltsági fok (grade)

A grade a daganatsejtek differenciáltságát jellemző paraméter, melynek a terápia és a prognózis meghatározásában/pontosításában lehet szerepe. Általában 1-3 (vagy 4) skálán szokásos meghatározni, ahol 1-gyel a legdifferenciáltabb (normál, nem daganatos szövethez legjobban hasonlító) és 3-as grade-del a differenciálatlan daganatsejteket jelölik.

2.3 Legfontosabb etiológiai tényezők

Régóta ismert tény, hogy a daganatok kialakulásában olyan genetikai elváltozásoknak, mutációknak van szerepe, melyek a tumorok számára növekedési előnyt hoznak létre. Ezen mutációk létrejöttében környezeti (életmódbeli), öröklött és egyes kutatások szerint véletlenszerű (az osztódások számából adódó) hatásoknak van jelentősége [19].

2.3.1 Fej-nyaki daganatokban

2.3.1.1 Környezeti tényezők (Kémiai/fizikai, fertőzések)

Dohányzás

A dohányfüstben 69 karcinogén ágens található, főbb toxikus vegyületek a nikotin, a szén-monoxid, a hidrogén-cianid, valamint aldehidek, alkének, és aromás vegyületek [20]. Tüdődaganatok esetén számtalan jelátviteli útvonal érintettségét, aktiválódását mutatták ki a dohányzással összefüggésben. Ilyen jelátviteli rendszer a Raf/MAPK, PI3K/Akt, NFκB és béta-adrenerg útvonalak [21]. A dohányzás, mint etiológiai tényező szerepe a daganatok patogenezisében már régóta ismert. Az elmúlt harminc évben a szájüregi és gégerákok kialakulása és a dohányzás közötti kapcsolat kutatásával több tanulmány is foglalkozott. Behatóan vizsgálták a különböző típusok (cigaretta, szivar, pipa), a dohányzás időtartamának és gyakoriságának meghatározó szerepét a daganatkeltésben [22-24]. Blot és munkatársai igazolták a dohányzás dózisfüggő rizikót fokozó hatását. Az enyhe cigarettafogyasztók esetében legfeljebb 1,5-szeres, míg a napi 1-2 dobozt is elszívok esetében akár 35-szörös rizikófokozódást mutattak ki a nemdohányzókhoz képest szájüregi és gégerákok kialakulására. A pipázás és szivarozás esetében leginkább a szájüregi régió volt érintett, itt közel háromszoros volt a daganat kialakulásának rizikója [22].

Alkoholfogyasztás

Az alkoholfogyasztás és a dohányzás gyakran együttesen fennálló jelenség a daganat kialakulása során. Az alkoholfogyasztás a dohányzástól függetlenül is megtriplázza a garat- és gégerák kialakulásának veszélyét [23]. Amennyiben az alkoholfogyasztás dohányzással társul, daganatkeltő hatásuk nem csupán összeadódik, hanem szinergista módon elősegítve a daganat keletkezését a rákrizikó megsokszorozódik [22, 24].

Táplálkozás

Az eddigi epidemiológiai tanulmányok alapján a gyümölcsökben és zöldségekben gazdag étrend csökkenti a fej-nyaki daganatok előfordulását [25]. Emellett a vörös illetve feldolgozott húsok bevitele közel másfélszeresre növeli a rákrizikót ebben a régióban [26]. Az állati eredetű termékeket, gabonákat és zsírokat egy kutatás szintén összefüggésbe hozta a gége rákos megbetegedésével [27].

Fertőzések

Humán papillomavírus (HPV)

A leginkább rákkeltő kockázattal bíró HPV törzsek (HPV16,18) gyakran vannak jelen és okoznak daganatos megbetegedést az anogenitális traktusban és ezen a két típuson felül még 13 HPV törzs sorolható a magas rákrizikójú kategóriába (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 és 82) [28]. A vírus két onkoproteinnel (E6 és E7) rendelkezik, melyek a p53 és retinoblastoma (Rb) fehérje inaktiválásán keresztül daganatképződéshez vezetnek [29]. A p53 mutáció igen gyakori fej-nyaki tumorokban [30], és bár a Rb fehérje mutációja viszonylag ritka, szabályozó fehérjéiben (TP16, cyclinD) gyakran mutatkozik eltérés [31]. A HPV ebbe a két útvonalba beavatkozva hasonló funkcionális változást okoz, mint a régóta jól ismert és gyakori mutációk. Gillison és munkatársai 2000-es cikkükben ok-okozati kapcsolatot mutattak ki az utóbbi évtizedekben folyamatosan növekvő incidenciájú szájgarati daganatok és a HPV fertőzés között [15]. 253 fej-nyaki daganatos szövet vizsgálatát végezték el. A HPV genomot PCR módszerrel, Southern blottal és in situ hibridizációval mutatták ki. Emellett a tumorok nagyobb részében elvégezték a TP53 gén szekvenálását is. Analízisük során összefüggést találtak a HPV pozitivitás és a szájgarati lokalizáció között. Ezek a daganatok alacsonyabb differenciáltsági fokkal (grade) rendelkeztek, bazaloid morfológiájuk volt, és ritkábban társultak alkolhol- vagy cigarettafogyasztással a beteg anamnézisében. Emellett a HPV pozitív daganattal rendelkező betegek szignifikánsan jobb prognózissal rendelkeztek, mint azon társaik, akik daganatmintájából a vírus nem volt kimutatható [15]. A HPV infekció jelenléte, és így a szájgarati régió rákos megbetegedése szignifikánsan összefügg a szexuális partnerek számával [32]. Az újonnan bevezetett HPV-oltások valószínűleg megelőzhetik a HPV-infekciót, és az ezzel összefüggő méhnyakrák mellett a szájgarati daganatok csökkenéséhez is vezethetnek [33].

A PCR és in situ hibridizációs módszerek költsége és eszközigénye miatt a rutin patológiai diagnosztikában gyakran használják a $p16^{INK4}$ immunhisztokémiai festést a HPV közvetett, indirekt markereként. Míg HPV E6 onkoproteinje a p53 fehérjét inaktiválja, addig az E7 fehérje feladata a pRb inaktiválása. Ennek hatására az E2F transzkripciós faktor felszabadul a pRb gátló hatása alól és több gén átírását is serkenti,

melyek közül az egyik a $p16^{INK4}$. A folyamat végeredménye tehát a $p16^{INK4}$ fokozott expressziója [34]. A használt módszerek pontossága és ezáltal alkalmassága a HPV kimutatására igen eltérő. Több összefoglaló publikáció is foglalkozott a $p16^{INK4}$ immunhisztokémia, HPV PCR, rtPCR, in situ hibridizáció és a módszerek kombinációjának HPV kimutatására vonatkozó szenzitivitásával és specificitásával [35, 36]. A $p16^{INK4}$ immunhisztokémiával szembeni legnagyobb kritika, hogy igen magas (100%-os) szenzitivitása mellett mindössze 80%-os specificitással rendelkezik a vírus kimutatását illetően. Smeets és munkatársai több módszert összehasonlító átfogó cikkükben a legmagasabb specificitási és szenzitivitási értékeket akkor kapták, ha a $p16^{INK4}$-immunhisztokémia mellett HPV PCR-t is alkalmaztak [37]. Lewis és munkatársai a magasabb specificitás elérése érdekében a $p16^{INK4}$ immunhisztokémiai pozitivitás határértékét 75%-os vagy afeletti festődési arányban javasolták megállapítani [38, 39].

Egyéb vírusok

Több kutatócsoport kimutatta az Eppstein-Barr vírus jelenlétét fej-nyaki daganatokban, [40, 41] azonban direkt szerepe a szájüregi rákok karcinogenezisében megkérdőjelezhető [42].

2.3.1.2 Öröklött tényezők

A fej-nyaki daganatok esetén az örökletes tényezők a környezeti faktorok mellett elenyésző jelentőségűek. Ennek ellenére több kutatócsoport megfigyelte a régió daganatainak családi halmozódását [43]. Azonban nem zárhatjuk ki a közös családi szokásokat, illetve a dohányfüst környezetre is gyakorolt negatív hatását az összképből [44].

2.3.2 Hasnyálmirigy daganatokban

2.3.2.1 Környezeti tényezők (kémiai/fizikai, fertőzések)

Dohányzás

Becslések szerint a dohányzás a hasnyálmirigy daganatok 25%-ában van jelen kóroki tényezőként [45]. A dohányzók esetében kétszer magasabb a hasnyálmirigy daganatok

kialakulásának esélye, mint a nemdohányzó populációban [46]. A karcinogenezisben a fej-nyaki daganatok esetében részletesebben tárgyalt vegyületeknek van szerepe [20].

Elhízás, táplálkozás, fizikai inaktivitás

Az elhízás pozitív, míg a közepes fizikai aktivitás inverz összefüggést mutat a hasnyálmirigy daganatok kialakulásával [47]. A vörös és feldolgozott húsok bevitele fokozott rákrizikóval társult a hasnyálmirigy esetében, míg a fokozott zsírbevitel esetében nem igazolódott összefüggés [48].

Alkoholfogyasztás

Az alkoholfogyasztás dohányzástól és korábban lezajlott hasnyálmirigy gyulladástól függetlenül is növeli a hasnyálmirigy daganatok kifejlődésének valószínűségét. A rizikófokozódás dózisfüggő módon következik be, míg a gyenge, közepes alkoholfogyasztás nem növeli a kockázatot, a fokozott napi alkoholbevitel szignifikánsan összefügg a magasabb rákrizikóval [49].

2.3.2.2 Öröklött tényezők

A családi ismétlődés régóta megfigyelt jelenség a hasnyálmirigy daganatok esetében [50]. A hasnyálmirigy tumoros elfajulása több örökletes daganatszindrómában megjelenik. Ilyen daganatszindróma a Peutz-Jeghers, Familial Atypical Multiple Mole Melanoma (FAMMM), Lynch szindróma. Emellett az örökletes emlő és petefészek daganatok esetében gyakori *BRCA1* és *BRCA2* mutációk is összefüggésbe hozhatók malignus hasnyálmirigy sejtszaporulat kialakulásával [51].

2.4 Molekuláris patológia

2.4.1 Fej-nyaki daganatok

A The Cancer Genome Atlas Network (TCGA) által publikált tanulmány 279 fej-nyaki daganatos (főként szájüregi, szájgarati és gége régióból) beteg mintáját dolgozta föl génmutációk és strukturális kromoszómális eltéréseket illetően [52]. Génkópiaszám változások (CNA) tekintetében a fej-nyaki daganatok (HPV negatívak és pozitívak egyaránt) a nem-kissejtes tüdőrákra (NSCLC) hasonlítottak. Teljes-genom analízisükkel a COSMIC adatbázisban is [53] reprezentált gének érintettségét mutatták ki annyi

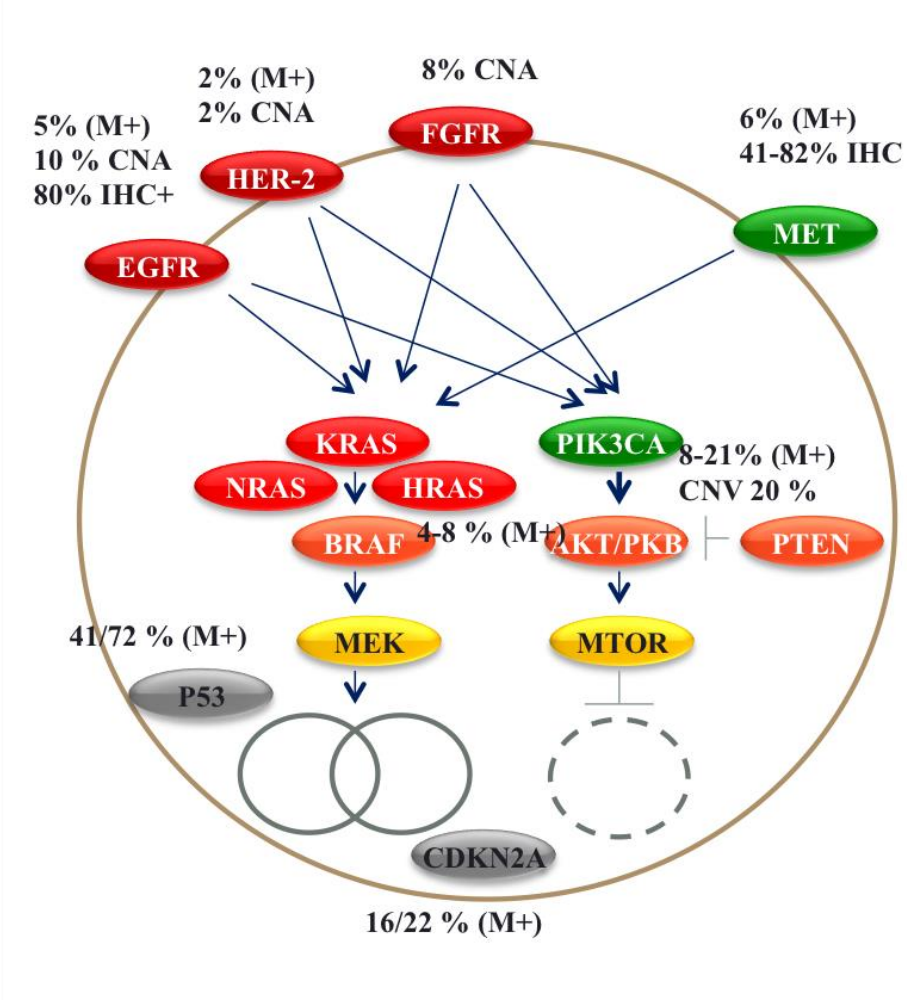
különbséggel, hogy a *TP53* gén mutációja sokkal gyakrabban fordult elő (41% helyett 72%), de így mindkét adathalmazban ez bizonyult a leggyakoribbnak. A korábbi vizsgálatokkal ellentétben nem találtak különbséget a HPV-pozitív és HPV-negatív daganatokban található mutációk száma között. A mutációk és CNA-k alapján alcsoport analízist végeztek, és így három főbb csoportot különítettek el: a főként mutációkon (*HRAS, PIK3CA, CASP8*), főként CNA-kon alapuló tumorok csoportját és az utóbbiból elkülönített harmadik csoportot, ahol a HPV pozitivitás és *EGFR* amplifikáció kölcsönösen kizárta egymást. A dohányzók körében szinte univerzális volt a *TP53* mutáció és a CDKN2A inaktivációja, és a cigarettafogyasztókra jellemző mutációs mintázat legszembetűnőbb a gége régiójában volt. Vizsgálatuk során a fellelhető mutációk, CNA-k gyakorisága alapján elkülönítettek HPV-negatív és HPV-pozitív predomináns útvonalakat.

Stransky és munkatársai korábban a TCGA által is alátámasztott mutációk mellett kiemelte a laphám differenciációban szerepet játszó gének gyakori mutációit is (*NOTCH1, IRF6, TP53*) [54].

A legfontosabb és leggyakoribb mutációkat és azok sematikus kapcsolatát jelátviteli útvonalakon keresztül az 5. ábrán és 1. táblázatban összegeztem.

1. táblázat: Fej-nyaki daganatok genetikai háttere: A leggyakrabban mutálódó gének a COSMIC adatbázis adatai alapján. A vad típusú gének által kódolt fehérje funkciója az NCBI adatbázisából származik [55, 56].

Mutáns gén	*Gyakoriság (%)*	*Vad típus feladata*
TP53	38	Tumor szuppresszor
TERT	14	Telomeráz reverz transzkriptáz
CDKN2A	13	Tumor szuppresszor
NOTCH1	12	Membrán receptor (jelátvitel)
FAT1	11	Tumor szuppresszor
PIK3CA	7	Protein kináz (jelátvitel)
CASP8	7	Kaszpáz
KMT2D	7	Hiszton metiláció
HRAS	6	Kis GTPáz fehérje (jelátvitel)



5. ábra: Fej-nyaki daganatokban előforduló legfontosabb, terápiás célpontul szolgáló jelátviteli utakat és azok módosulásai: Ahol két adat található, ott a COSMIC/*TCGA* eltérő eredményeit párhuzamosan tüntettem fel [52]. Az M+ a mutáció, míg az IHC az immunhisztokémiai pozitivitás jelenlétét jelöli.

2.4.2 Hasnyálmirigy daganatok

A hasnyálmirigy daganatok molekuláris patológiája igen jól feltárt, az összképet négy kiemelkedően gyakran mutálódó gén uralja, melyeket szokás „hegycsúcsoknak” is nevezni: *KRAS, CDKN2A, TP53* és *SMAD4* [57]. A *KRAS* mutációja kiemelkedően magas (70-90%-os) arányban van jelen ebben a daganattípusban, ezt követi a másik három gén 50% körüli mutációs rátával, majd a kiemelkedő génektől leszakadva a következő gén mutációs gyakorisága már csak 10% körüli (ezek pedig feltűnően a kromatin módosítás és DNS hibajavítás génjeit érintik) [58]. A *KRAS* mutáció igen

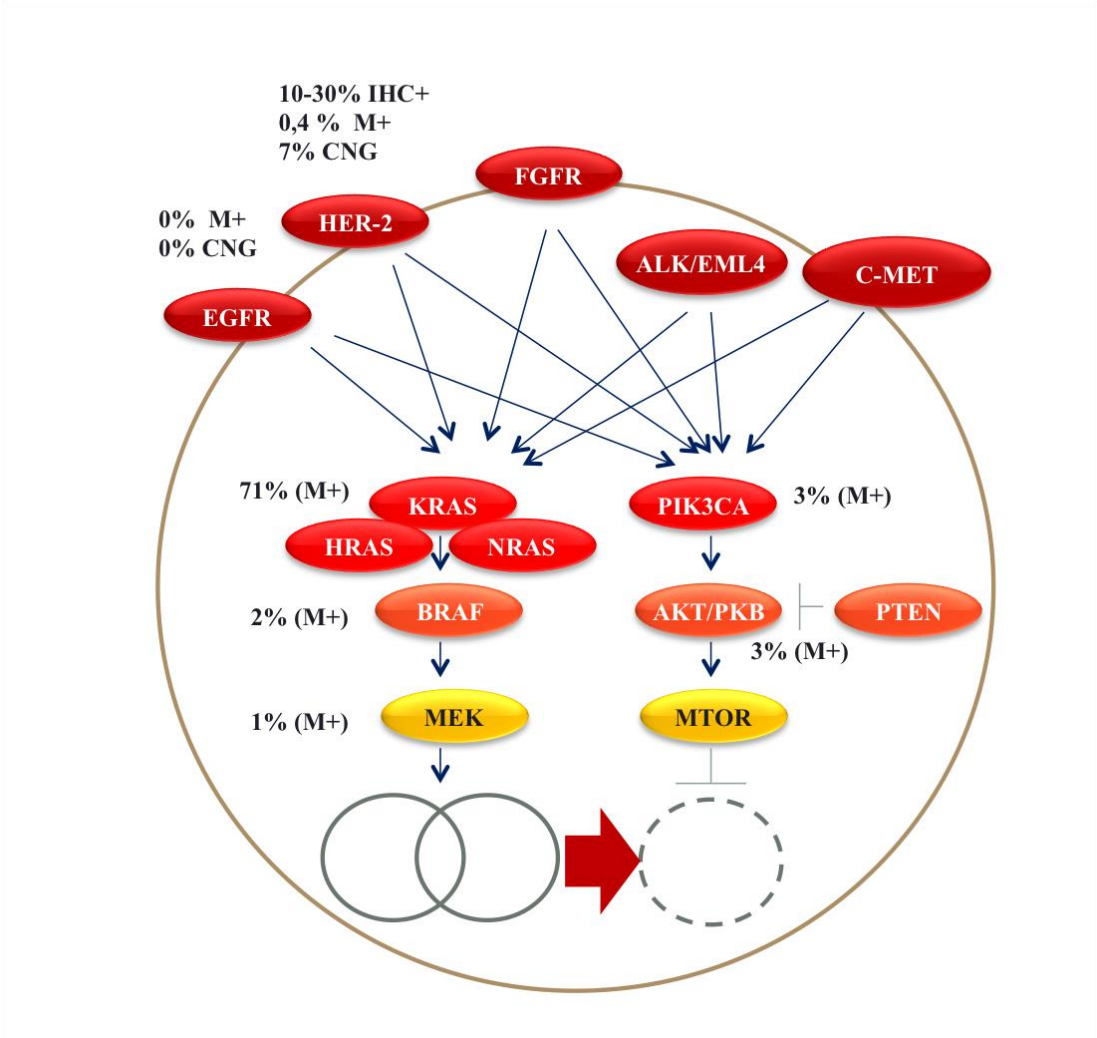
hamar bekövetkezik a tumorgenezis során, már a legkorábbi prekurzor léziókban is megtalálható (PanIN IA), majd ezt követi a CDKN2A mutációja a progresszió során, végül az invazívvá válás előtt a *TP53* és *SMAD4* mutáció [59].

Waddell és munkatársai 2015-ben mutációs mintázatuk alapján négy csoportba sorolták a hasnyálmirigy daganatokat: stabil (50-nél kevesebb strukturális variáció), lokálisan átrendeződött (fokálisan – egy-két kromoszómán – elhelyezkedő variációk), szétszórva átrendeződött (jellemzően sok, de 200 alatti kromoszóma sérülés) és instabil (200 feletti kromoszóma sérülés) [60]. Ez a csoportosítás tovább pontosíthatja a prognózist és a terápia előrejelzését.

A legfontosabb, gyógyszerfejlesztés célpontjául is szolgáló mutációkat és sematikus jelátviteli kapcsolataikat a 6. ábra és 2. táblázat mutatja.

2. táblázat: Hasnyálmirigy daganatok genetikai háttere: A leggyakrabban mutálódó gének a COSMIC adatbázis adatai alapján. A vad típusú gének által kódolt fehérje funkciója az NCBI adatbázisából származik [55, 56].

Mutáns gén	*Gyakoriság (%)*	*Vad típus feladata*
KRAS	71	Kis GTPáz fehérje (jelátvitel)
TP53	49	Tumor szuppresszor
CDKN2A	22	Tumor szuppresszor
SMAD4	20	Jelátvivő fehérje
ADID1A	6	Kromatin átrendeződés
MLL3	4	Hiszton metiláció
PIK3CA	3	Protein kináz (jelátvitel)



6. ábra: Hasnyálmirigy daganatokban előforduló legfontosabb, terápiás célpontul szolgáló jelátviteli utak és azok módosulásai: Az adatok a COSMIC adatbázisból származnak [55]. A CNG (copy number gain) a gén kópiaszám emelkedésére utal, az M+ a mutáció, míg az IHC az immunhisztokémiai pozitivitás jelenlétét jelöli.

2.5 A daganat prognózisát meghatározó molekuláris tényezők

2.5.1 Fej-nyaki daganatokban leggyakrabban használt prognosztikai markerek

HPV

A fej-nyaki daganatok HPV-státuszának prognosztikai szerepe igen ellentmondásos a szakirodalomban. Egyes vizsgálatok kedvezőbb prognózist mutattak ki a HPV-pozitív daganatokkal rendelkező betegek esetében [61], míg mások nem tudták alátámasztani ezt az elméletet [62]. A szájgarati régióban a HPV-pozitív daganatok egyértelműen jobb prognózissal rendelkeznek [63], és a progressziót követően is jobbak a túlélési esélyeik [64].

p53

A p53 tumorszuppresszor fehérjét kódoló gén mutációja igen gyakori azon daganatok esetében, melyek patogenezisében a dohányzás szerepe kiemelkedő. A dohányzók esetében igen szembetűnőek a G/T mutációk, melyek keletkezése a füst karcinogén anyagainak DNS-adduktképző hatásával magyarázható [65, 66]. Nem meglepő tehát, hogy a p53 mutációja fej-nyaki daganatok esetén is igen gyakori [30]. Mind alacsonyabb költsége, mind széleskörűbb elterjedése miatt a p53 immunhisztokémiát gyakran alkalmazzák a génben előforduló mutáció indirekt markereként [67]. Soland és munkatársai 2013-ban publikálták szakirodalmi áttekintő cikküket, melyben a leggyakrabban tanulmányozott markerek prognózissal való összefüggését vizsgálták szájüregi rákok esetében. Az általuk feldolgozott 11 tanulmányból 6 esetben találtak összefüggést a p53 expresszió és a prognózis között, míg további öt esetben nem sikerült ilyen kapcsolatot kimutatni. Kiemelném azonban, hogy a szignifikáns kapcsolatot feltáró cikkek esetén a p53 fokozott expressziója minden esetben rosszabb kimenettel volt összekapcsolható [68].

Ki-67

A Ki-67 hisztopatológusok által gyakran alkalmazott proliferációs marker, immunhisztokémiai (IHC) analízisét 1983 óta használják rutinszerűen [69]. A Ki-67 fokozott expressziója szignifikánsan összefügg a kezelésre adott kedvezőtlenebb válasszal, korai repalszussal szájgarati daganatok esetében [70]. A munkacsoportunk által 2014-ben közölt tanulmány alapján a vizsgált fej-nyaki daganatos betegek körében a Ki-67 negativitás szignifikánsan (p=0,0243) jobb prognózissal társult. Emellett összefüggést igazoltunk a Ki-67 pozitivitás és a TNM beosztás N paraméterével, mely a nyirokcsomó metasztázis jelenlétével, kiterjedésével függ össze. A Ki-67 pozitív daganatok esetében magasabb nyirokcsomó stádiumot igazoltunk (p=0,0067). A lokalizáció tekintetében is nagy eltéréseket tapasztaltunk. Míg az algarat tumorainak 93%-a mutatott Ki-67 pozitivitást immunhisztokémiai festéssel, addig a szájüregi daganatok és a gége glottikus régiója esetén ez az érték 50% körül mozgott [71]. Egy korábbi, 2011-es tanulmányunk során pedig az oropharynx región belül mutattunk ki expressziós különbséget. Míg a garatmandula, illetve nyelvgyöki régió esetén minden vizsgált daganat Ki-67 pozitív volt, a szájgarat egyéb régióiban (pl. lágy szájpad) a daganatok fele negatív volt Ki-67 immunfestéssel [71].

EGFR

Az EGFR széleskörűen vizsgált biomarker, számos daganat esetében kutatták prediktív és prognosztikus jelentőségét. Az EGFR membránfehérje az ErbB/HER fehérjecsalád tagja, melynek aktivációjakor foszforilációs kaszkád indul és a PI3K/Akt, MAPK/ERK és Jak/STAT jelátviteli útvonalakon keresztül részt vesz a proliferáció indukcióban, invázióban, metasztázis képzésben illetve az angiogenezisben is [72, 73]. Az EGFR aktivációja több elváltozáson keresztül is megvalósulhat, úgymint túltermelődéssel (overexpresszióval), az *EGFR* gén felsokszorozódásával (amplifikációval) vagy a fehérje aktiváló mutációjával. Fej-nyaki daganatok esetében mind kópiaszámbeli, mind fehérjeexpressziós változása gyakori jelenség [74, 75]. A fehérje túlprodukálása, illetve kópiaszám emelkedése és a túlélés közötti kapcsolatot már számos tanulmány vizsgálta [75-78]. Szabó és munkatársai szignifikáns összefüggést találtak a gén kópiaszám emelkedése illetve a fehérje overexpressziója és a betegek kedvezőtlenebb prognózisa között [75], míg másoknak nem sikerült összefüggést igazolni [77, 78].

Munkacsoportunk nem talált összefüggést az immunhisztokémiával kimutatott EGFR expresszió és a prognózis között 2014-ben publikált vizsgálata során [71].

Connexin 43

A connexinek – mint például a connexin 43 – sejtkapcsoló struktúrát (gap junction) formáló fehérjék, mely pórusképző réskapcsolatok fontos szerepet játszanak a sejt-sejt kommunikációban. Karcinogenezisben betöltött szerepük régóta ismert, mint ahogy szabályozó szerepük a proliferációban, apoptózisban, differenciációban úgyszintén [79]. Emlőrákok esetén diszfunkciójukat már több publikáció kapcsolatba hozta a daganatkeletkezéssel és progresszióval [80, 81]. Munkacsoportunk bizonyította a connexin 43 prognosztikus szerepét fej-nyaki daganatokban. A fehérjét jobban expresszáló tumorok esetében kedvezőbb betegség kimenetelt tapasztaltunk [82]. A connexin 43 foszforilációja része a legfontosabb poszttranszlációs módosulásainak. Foszforilált formái (P1, P2) körül-belül 45 kDa-nak megfelelő magasságban, a Cx43 még foszforilálatlan formájával együttesen gyakran felismerhetők Western blot analízis során [83]. A connexin 43 expresszió és foszforiláció bizonyítottan változik hasnyálmirigy daganatok progressziója során is [84]. Ezen sejtkapcsoló struktúra foszforilációját összefüggésbe hozták membránba helyeződésükkel és funkcionális változásukkal. A fehérje defoszforilációja gátolja a csatornák funkcióját, akadályozza kihelyeződésüket a sejtmembránba [85, 86].

2.5.2 Hasnyálmirigy daganatokban leggyakrabban használt prognosztikai markerek

p53

Mivel a hasnyálmirigy daganatok patogenezisében is jelentős szerepet kaphat a dohányzás, nem meglepő módon gyakori ezen fehérje mutáns változata ebben a régióban is. A COSMIC adatbázis alapján a hasnyálmirigy daganatok 42%-ában fordul elő p53 mutáció [53]. Két munkacsoport is igazolta, hogy immunhisztokémiával kimutatott p53 pozitivitás illetve szekvenálással igazolt mutáció kedvezőtlenebb prognózissal függ össze [87, 88]. Ennek ellenére számos egyéb tanulmányban nem találtak ilyen összefüggést [89].

p16 INK4

A CDK4 és CDK6 ciklinfüggő kináz a ciklin D-vel együttesen befolyásolja a Rb fehérje foszforilációját, melynek hatására az elongációs faktor 2 (E2F1) felszabadul a Rb gátló hatása alól, és proliferációt indukál. A p16^{INK4} tumorszuppresszor a CDK4 és 6 gátlásán keresztül meghatározó szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában [90]. Funkcióvesztése, alacsony expressziója gyakori jelenség hasnyálmirigy daganatoban és csökkent túlélési esélyekkel, nagyobb daganatmérettel, magasabb áttétképzési rizikóval hozható összefüggésbe [91].

2.6 Célzott daganatterápiás lehetőségek és prediktív molekuláris markereik

2004-ben a gefitinib EGFR-gátlószer elbukott két, tüdőrákos betegek esetében végzett klinikai vizsgálat során is, vagyis nem sikerült szignifikáns túlélésbeli különbséget kimutatni a gefitinibbel és a placebo szerrel kezelt csoport között [92]. Ugyanezen évben egy magyar, áttétes tüdő adenokarcinómában szenvedő, nemdohányzó nő gefitinib kezelést kapott daganatára, mely hatására rövid időn belül komplett remisszióba került. Később a molekuláris vizsgálatok kimutatták, hogy a beteg daganata deléciót hordozott az *EGFR* génben és annak amplifikációja is fellelhető volt mintájában [93]. Ezzel az esettel párhuzamosan több EGFR-mutációt hordozó tumornál mutattak ki remissziót ezen kezelőszer hatására, így a gefitinib forgalomban maradt molekuláris altípus specifikusan tüdődaganatok kezelésére [94]. Ez a példa is mutatja, mennyire fontos lehet egy kezelőszer kiválasztásában a megfelelő, hatást előrejelző/prediktáló molekuláris marker ismerete.

Napjainkban 51 célzott daganatterápiás szer (antitest vagy tirozin-kináz inhibítor) rendelkezik FDA vagy EMA engedéllyel és van forgalomban valamilyen szolid vagy hematológiai daganattípus esetében (Függelék, 1. táblázat) [95]. Bár a gátolt fehérje a legtöbb esetben pontosan meghatározott és specifikus célpont, azonban csak néhány esetben ismerünk olyan molekuláris markereket, melyekkel megjósolhatnánk és kiválaszthatnánk azt a betegpopulációt, ahol a gyógyszer hatásfoka a legmarkánsabb lenne. A gyógyszer hatásával összefüggő, prediktív markereket pozitív biomarkereknek, míg a rezisztencia fennállását jelzőket negatív biomarkereknek nevezzük.

2.6.1 Fej-nyaki daganatok

2.6.1.1 Standard, kemoterápiás lehetőségek

A fej-nyaki daganatok kezelésében nagy szerepe van a sebészi rezekciónak, mely az utóbbi évtizedekben nagy fejlődésen ment keresztül, szem előtt tartva a szerv és annak funkcióinak megőrzését. Korai stádiumú daganatok esetében így elegendő sebészi vagy sugárterápia alkalmazása, melyek hatékonysága megegyezik [96]. Lokoregionálisan előrehaladott daganatoknál a sebészi terápiát megelőző indukciós kemoterápia (vagy kemoirradiációs terápia) illetve a műtétet követő posztoperatív citotoxikus kezelés is szóba jön. A fej-nyaki daganatos megbetegedések kemoterápiás kezelésében leggyakrabban platinaszármazékokat (cisplatin és carboplatin), taxán vegyületeket (paclitaxel és docetaxel) és 5-fuorouracilt alkalmaznak, általában kombinációban [96]. Másodvonalbeli kezelésként alkalmazható a metotrexát kezelőszer is [96]. Recidív és/ vagy áttétes daganatok esetében lehetőség van a kemoterápiás kezelés cetuximabbal való kiegészítésére is [96, 97].

2.6.1.2 Engedélyezett (FDA, EMA által) célzott terápiás daganatellenes szerek

Cetuximab (Erbitux)

A cetuximab egy IgG1 humán-egér kiméra monoklonális antitest, mely az EGFR ligandkötő helyéhez kapcsolódik. Az EGFR overexpressziója gyakori jelenség fej-nyaki daganatokban [74, 75], így potenciális terápiás célpontnak tűnik. A cetuximab kezelőszerrel 2001 óta folynak különböző szintű klinikai vizsgálatok, hogy hatását fej-nyaki daganatok gyógyításában feltárják [98]. Bonner és munkatársai 2006-ban közölték klinikai vizsgálatuk eredményét, ahol radioterápiás kezelést alkalmaztak cetuximabbal kombinálva vagy önmagában 424 lokálisan kiterjedt fej-nyaki daganatos beteg esetében. Szignifikánsan kedvezőbb hatást találtak a cetuximabbal kombinált ágon, a betegek medián lokoregionális kontrollja majd 10 hónappal hosszabbnak adódott, mint az önmagában alkalmazott radioterápia esetében és progressziómentes túlélésük is kedvezőbb volt. Emellett azt figyelték meg, hogy az akneiform kiütés kivételével komolyabb mellékhatásokat nem okozott a terápia cetuximabbal való kiegészítése [97]. 2009-ben az EXTREME klinikai vizsgálatban kiújult vagy áttétes fej-nyaki daganatos betegeknél alkalmaztak első vonalban platina+5-fluorouracil kezelést

cetuximabbal kombinálva vagy anélkül. A fő kérdés az volt, hogy javít-e – a toxicitás számottevő növekedése nélkül – a betegek progressziómentes túlélésén a cetuximab bevétele a terápiás sémába. A vizsgálat eredménye igazolta, hogy a cetuximab alkalmazása minden szempontból előnyös volt a kemoterápiás kezelés mellett [99]. A 2014-ben publikált RTOG 0522 klinikai vizsgálat ugyanakkor nem igazolt túlélési vagy egyéb előnyt előrehaladott daganatok esetén, amennyiben a radioterápia és cisplatin mellett cetuximabot is alkalmaztak [100]. Sem az EXTREME, sem az RTOG 0522 vizsgálat során nem találtak összefüggést a daganatok EGFR expressziója és a cetuximab hatása között. A legfrissebb (2016-os) IMCL-9815 klinikai vizsgálat célul tűzte ki a $p16^{INK4}$-expresszió, HPV-státusz prediktív voltának vizsgálatát cetuximab + radioterápia és radioterápia sikerességének előrejelzésére. Az eredmények alapján a cetuximab alkalmazása $p16^{INK4}$- és HPV-státusztól függetlenül javította a klinikai kimenetelt [101].

Vastagbélrák esetében (ahol a cetuximab szintén törzskönyvezett hatóanyag) a KRAS mutáció negatív biomarkere a cetuximab terápia hatásosságának, vagyis a KRAS vad típussal rendelkező daganatok jobban reagáltak a terápiára [102]. Ez a mutáció azonban elenyészően ritka fej-nyaki daganatokban [53] és bár egy frissen közölt tanulmány összefüggésbe hozta a KRAS egy 3' nemtranszlálódó régióban található polimorfizmusát a cetuximabra adott válasszal [103] – és ez az eredmény áttörést jelenthet – de módszertani részei miatt kritikával kezelendő [104].

Ezek alapján látható, hogy a fej-nyaki daganatok esetén jelenleg még nem rendelkezünk megfelelő molekuláris markerrel a cetuximab kezelőszer hatásának előrejelzésére.

Pembrolizumab (Keytruda) és Nivolumab (Opdivo)

A Pembrolizumab és Nivolumab két, frissen törzskönyvezett immunterápiás hatóanyag kiújult és/vagy metasztatikus fej-nyaki daganatokban. Mindkét készítmény PD-1 ellenes antitest, mely blokkolja a kapcsolatot a PD-1 és ligandja, a PDL-1 között és javítja a betegek túlélését a standard terápiához képest [105, 106]. Merőben eltérő hatásmechanizmusuk miatt azonban az immunterápiás szerek ismertetésétől dolgozatom során eltekintek.

2.6.1.3 Lehetséges terápiás célpontok

EGFR

Az EGFR prognosztikus és terápiás célpontként játszott szerepe a monoklonális antitest, cetuximab részletezése során említésre került. Az antitest mellett kis molekulasúlyú tirozin-kináz gátlószerrel is gátolhatjuk az EGFR aktivitását, melyek közül jelenleg az erlotinib, gefitinib, lapatinib és afatinib van klinikai forgalomban. Az erlotinib és gefitinib szelektíven gátolja az EGFR receptort, míg a lapatinib az EGFR mellett a HER2 receptort is gátolja. Az afatinib irreverzíbilis pan-HER-gátlószer, ami az EGFR és HER2 receptorokon kívül a HER4-et is gátolja. A gefitinib és a lapatinib klinikai vizsgálatban nem hozott áttörést [107, 108]. A cisplatinnal kombinált erlotinib esetében jól tolerálható és a standard kemoterápiával összemérhető daganatellenes hatást mértek [109], és monoterápiában is gátolta a daganat progresszióját [110], de egyik kezelés alkalmazása sem hozott szignifikáns javulást. Egyedül az afatinib klinikai vizsgálata zárult viszonylagos sikerrel, az afatinib kezelés a metotrexáttal szembe állítva szignifikánsan hosszabb progressziómentes túlélést eredményezett. Az alcsoport analízis alapján a terápia prediktív markere a $p16^{INK4}$-negativitás [111].

MET

A MET tirozin-kináz receptor expressziója gyakori jelenség fej-nyaki daganatokban, különböző vizsgálatok szerint a tumorok 41-82%-ában túltermelődik [112]. Ez önmagában felveti a MET-inhibítorok használatának lehetőségét ebben a daganattípusban. Amplifikációjának, mutációjának szerepe az EGFR-gátlószerekkel szembeni rezisztencia kialakulásában kettős. A fehérje fokozott aktivációja egyrészt negatív prediktív faktor NSCLC-ben [113], bár más kutatások szerint ez csak nagyon magas génkópiaszám esetén áll fenn (több, mint 12 kópia/sejt) [114]. Másrészt a gefitinibbel és erlotinibbel szembeni másodlagos rezisztencia-mechanizmusok között gyakori a *MET* amplifikáció, mely fontos célponttá teszi ezt a fehérjét azokban az esetekben, ahol szerzett rezisztencia alakul ki EGFR-gátló terápiával szemben [115]. In vitro és in vivo adatok alapján a *MET* amplifikáció pozitív prediktív markere lehet a crizotinib kezelésnek [116, 117]. A foretinib MET-gátlószer azonban legfeljebb stabil betegséget, illetve minimális daganatcsökkenést eredményezett kiújult és/vagy áttétes

fej-nyaki daganatokban, így alkalmazása csupán kombinációs terápia részeként megfontolható [118].

FGFR1

Az FGFR1 receptor génjének amplifikációja a fej-nyaki daganatok 12%-ában van jelen [52], míg fokozott termelődése a tumorok 82%-át érinti [119]. Göke és munkatársai azt találták, hogy a gén kópiaszám változása nem, csak mRNS expressziója korrelál a daganatok FGFR-gátlószerre adott válaszával [120].

PI3K/Akt/mTOR

A *PIK3CA* az egyik leggyakrabban mutálódó onkogén a fej-nyaki daganatokban [52, 53, 121]. A helikáz domén mutációja mind HPV-pozitív, mind HPV-negatív tumorokban hasonlóan számottevő [121]. A TCGA adatbázisában a betegek 21%-a rendelkezett *PIK3CA* mutációval, 25%-uk egyben a gén kópiaszám emelkedésével is rendelkezett [52]. Emellett PTEN mutáció és deléció is befolyásolja az útvonal aktivitását [122]. A PIK3CA aktivációját összefüggésbe hozták NCI-60 daganatsejtek EGFR-gátlóval szembeni rezisztenciájával [123]. Emellett a vastagbél és méhnyak daganatokban előforduló PIK3CA mutáció cetuximab rezisztenciával társul [124, 125]. A PI3K-gátló buparlisib fázis II klinikai vizsgálatban szignifikánsan hosszabb túlélést eredményezett paclitaxellel kombinálva, mint a kemoterápiás kezelés önmagában, bár a mellékhatások súlyosabbnak bizonyultak. A most következő fázis III vizsgálatok fognak fényt deríteni a gyógyszer klinikai hasznára [126].

Src

Az Src citoplazma lokalizációjú fehérje túltermelődése agresszíven progrediáló daganathoz vezet a fej-nyaki régióban [127]. Gátlószere, a dasatinib multikináz inhibítor (Src, PDGFR, BCR-ABL, c-KIT) ugyanakkor elbukott a klinikumban [128]. Mivel korábbi vizsgálatok feltárták, hogy a Src overexpressziója MET aktiváláson keresztül erlotinib rezisztenciához vezet, felmerült a két szer (dasatinib és erlotinib) kombinálásának lehetősége [129]. Ez a stratégia sem járt sikerrel [130].

2.6.2 Hasnyálmirigy daganatokban

2.6.2.1 Standard, kemoterápiás lehetőségek

A hasnyálmirigy adenokarcinómák 50%-a már klinikailag előrehaladott, metasztatikus állapotban kerül felismerésre. Emellett a betegek 30-40%-ánál, bár a daganat csak lokálisan terjed ki, műtéti eltávolítása mégsem lehetséges. Ez a túlélési esélyeket az előbbi esetben 7-11 hónapra, míg az utóbbi esetben 11-18 hónapra korlátozza [131]. Műtéti eltávolítás csupán a betegek 20%-ánál jöhet szóba [132]. 1996-ban a gemcitabin nukleozid-analóg terápia bekerült a hasnyálmirigy daganatok terápiás protokolljába, mivel az addig alkalmazott 5-FU terápiánál hatásosabbnak bizonyult. Ez a medián túlélésben egy bő hónapos javulást jelentett (5,6 hónap gemcitabinnel vs. 4,4 hónap 5-FU-t alkalmazva) [133]. Ez a szer maradt az elmúlt húsz évben a hasnyálmirigy daganatok terápiájának alapkészítménye és a nem rezekálható, lokálisan kiterjedt malignitások elsőként választandó hatóanyaga [132]. Az évtizedek során természetesen rengeteg próbálkozás történt az előrehaladott hasnyálmirigyrák terápiás lehetőségeinek bővítésére, a túlélés javítására, azonban ezek nagy része negatív eredménnyel zárult [131, 132]. Csupán három esetben végződtek a klinikai vizsgálatok pozitív, bíztató eredménnyel. A gemcitabin + erlotinib [134], gemcitabin + Nab-paclitaxel (egy albuminhoz kapcsolt paclitaxel hatóanyag) kombinációk [135] és a FOLFIRINOX (oxaliplatin, irinotecan, fluorouracil és leucovorin kombinációja) [136] esetében. Jelentős javulást a progressziómentes és teljes túlélésben – a gemcitabin monoterápiával szemben – csupán a FOLFIRINOX kezelés ért el (PFS 6,4 vs. 3,3 hónap, OS 11,1 vs. 6,8 hónap), azonban az új kezelőszer-kombináció toxicitása nehezen tolerálhatónak bizonyult [136]. Emellett a legutóbbi vizsgálatok alapján gemcitabin terápiát követően, másodvonalban a FOLFOX6 terápiával (nanoliposzómás irinotecan fluorouracillal és leucovorinnal kombinálva) is kedvező hatást értek el tolerálható mellékhatás profil mellett [137].

2.6.2.2 Engedélyezett (FDA, EMA által) célzott terápiás daganatellenes szerek

Erlotinib

Jelenleg az egyetlen célzott daganatterápiás lehetőség hasnyálmirigy adenokarcinómában az erlotinib kis molekulasúlyú EGFR tirozin-kináz inhibítor. A szer

terápiás alkalmazása egy 2007-ben publikált klinikai vizsgálaton alapszik, ahol a gemcitabin és erlotinib kombinációjával kezelt betegcsoport teljes túlélésén egy bő hónapot javított a kontrol, csupán kemoterápiával kezelt ághoz képest [138]. Ez az eredmény csekély, de mindenképp figyelemre méltó, mivel minden más célzott terápiás szerrel való kombináció addig és azóta is kudarcot vallott.

Az egyetlen, a terápia sikerét előrejelző esemény a kezelés hatására létrejövő kiütés, molekuláris markerrel egyelőre nem tudták összefüggésbe hozni hatását. A vizsgálat ezen kívül nem igazolt összefüggést a szer hatása és a daganat EGFR státusza között sem [139].

2.6.2.3 Lehetséges terápiás célpontok

EGFR

Mivel az EGFR a hasnyálmirigy daganatok 40-70%-ában túltermelődik [140, 141], lehetséges gyógyszercélpontnak tekinthetjük. Az erlotinibet 2007-ben engedélyezték hasnyálmirigy daganatok terápiájában, míg az afatinib inhibítor kedvezően viselkedett sejtvonalakon végzett kísérletekben [142]. A *KRAS* mutációja azonban gyakran okoz rezisztenciát EGFR-gátlószerekel szemben, így – bár az erlotinib törzskönyvében nem szerepel korlátozás ezen a téren – a receptor tirozin-kináz gátlószerek alkalmazása a csupán relatív ritka KRAS vad típusú daganatokra korlátozódik [143]. A jelátviteli útvonalban a receptortól lejjebb elhelyezkedő, gyakran aktiválódó fehérjék miatt leginkább kombinációs terápiákban merül fel az EGFR-inhibítorok használata – mint az alább a KRAS esetében részletes ismertetésre kerül. Ugyanakkor még hiányoznak azok a markerek, melyekkel kiválasztható az a betegpopuláció, amelyiknek potenciálisan előnye származhat a monoterápiából [144].

KRAS

A *KRAS* mutáció kiemelkedő gyakorisága miatt kézenfekvő célpont hasnyálmirigy daganatok esetében. A KRAS direkt gátlása ugyanakkor nehézkes. A RAS fehérjék membránba helyeződéséhez a farnezil-transzferáz enzim aktivitása szükséges, így több próbálkozás irányult ezen enzim gátlására. Ezek az inhibítorok (tipifarnib, lonafarnib) egyelőre nem hoztak pozitív eredményt a klinikai vizsgálatokban [145]. Az eddigi vizsgáltok sikertelensége a kutatásokat az indirekt, jelátviteli úton lejjebb elhelyezkedő

fehérjék gátlása irányába terelte. Ilyen fehérje a MEK protein kináz, melynek számos gátlószerét (CI-1040, selumetinib, trametinib, PD0325901, refametinib) tesztelték már hasnyálmirigy daganatos betegek terápiájában. Ezekben a klinikai vizsgálatokban bár a MEK-gátlók a daganat remisszióját illetően valamennyivel jobban teljesítettek a standard kemoterápiához képest, a betegek túlélését nem hosszabbították meg statisztikailag szignifikánsan [58, 146, 147]. A gátlószerek hatástalanságára magyarázatot adhat egy 2012-ben, Prahallad és munkatársai által közölt vizsgálat, ahol a RAS/Raf/MEK/ERK útvonal gátlása (BRAF-inhibítor alkalmazásával) CDC25C fehérjén keresztül történő visszacsatolás révén az EGFR/PI3K/Akt útvonal aktiválódását eredményezte. A munkacsoport ezen a szálon elindulva szinergizmust mutatott ki a BRAF- és EGFR-inhibítorok között [148]. Az előbb említett mechanizmus létezését hasnyálmirigy daganatokban is igazolták és bizonyos esetekben MEK-inhibítorokat PI3K-gátlószerekkel kombinálva értek el szinergista a hatást [149, 150]. Azonban a tumorok közötti molekuláris mintázatbeli különbség, ami meghatározná ezen terápiás kombinációk hatását továbbra sem ismert.

PI3K/Akt

A PI3K/Akt útvonal gyakran aktiválódik hasnyálmirigy adenokarcinómákban, melynek egyik oka a PTEN alacsony szintje ezekben a daganatokban [151-154]. A clinicaltrials.gov adatbázis szerint több Akt-inhibítor (RX-0201, BKM120, triciribine) van jelenleg is klinikai vizsgálatban és az Akt egyik jelátviteli célpontját, az mTOR fehérjét gátló everolimus is jól szerepelt az eddigi vizsgálatokban [154].

MET

A MET tirozin-kináz receptor overexpressziója gyakori jelenség hasnyálmirigy daganatokban és összefügg a daganat agresszív viselkedésével [155]. Avan és munkatársai kimutatták, hogy MET-inhibítor crizotinib képes gátolni a hasnyálmirigy daganatokban egy őssejt-szerű sejtpopuláció növekedését és hatása gemcitabinnal kombinálva felerősödik [156].

Egyéb

A *KRAS* mellett leggyakrabban mutálódó másik három gén (*TP53, CDKN2A, SMAD4*) tumorszuppresszor fehérjéket kódol, így csupán indirekt módon lehetséges a funkciójuk kiesésekor aktiválódott útvonalak gátlása [58].

2.7 Precíziós onkológia és transzlációs medicina jelentősége a daganatterápiában

A humán genom publikációja óta eltelt bő 15 évben a szekvenálási módszerek gyorsasága jelentősen megnőtt és a költségek is megfizethetőkké váltak. Világszerte több kórházban kezdődtek meg rutinszerűen a több gén kódoló régióját lefedő genetikai vizsgálatok a leghatékonyabb terápia kiválasztása érdekében (precíziós medicina). Az új-generációs szekvenálás lehetővé tette több gén akár összes exonjának nagy lefedettséggel, egyszerre történő vizsgálatát. Akár több személyből származó daganat örökítőanyagának vizsgálata is lehetséges ugyanazon a chip-en egyedi „vonalkód”-ligálási technológia segítségével. Mára már több cég (Illumina, Thermo Fisher-IonTorrent) árul daganat specifikus géneket célzottan szekvenáló NGS-paneleket, mint az „IonTorrent Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel”-je (50 onkogén és tumorszuppresszor), „Comprehensive Cancer Panel”-je (több, mint 400 daganatokkal kapcsolatba hozható gén) vagy az Illumina „TruSeq Amplicon - Cancer Panel”-je. A genetikai hattér ilyen mértékű feltérképezésével azonban hatalmas adatmennyiség került a klinikusok birtokába, melyből a ténylegesen használható, terápiás relevanciával rendelkező információ kinyerése szinte lehetetlennek tűnhet [157]. A nyers genetikai információ mellett annak terápiás hasznáról szóló esettanulmányok is hasznos visszajelzést jelenthetnek a kutatók és klinikusok számára egyaránt, ami az adatbankok létrehozását, informatikai technológiák fejlesztését tette sürgetővé [158, 159].

Emellett, mivel egy génen belül több, a funkcióját legkülönbözőbb módokon módosító mutáció, túltermelődés, citogenetikai eltérés fordulhat elő, fontossá vált ezek minél pontosabb megismerése, mely in vitro módszerekkel lehetséges. Tehát egyre inkább úgy tűnik, hogy a klinikai kutatóknak a legnagyobb hatásfok érdekében kollaborálni kell az alapkutatás biológusaival, statisztikusaival és informatikusaival a daganatokban talált eltérések „driver”, azaz a daganat kialakulását/progresszióját irányító szerepének minél pontosabb megismerése érdekében. Az alapkutatásban talált megállapítások klinikai hasznát először in vitro daganatsejtes modelleken, majd állatmodelleken kell igazolni, mielőtt a tényleges kezelésbe építenék őket. Ezen preklinikai modellek feladata, hogy áthidalják a rést az alapkutatás és klinikai kutatás között, azaz „lefordítsák”, átalakítsák

az alapkutatás eredményeit a betegek számára is hasznosítható termékekké, módszerekké. Ezért is hívják ezt a tudományágat transzlációs medicinának [160].

3 Célkitűzések

Kutatásunk során archivált (formalin-fixált, paraffinba ágyazott, FFPE) daganatos szövetmintákat vizsgáltunk, mely lehetőséget nyújtott a daganatokban előforduló DNS/mRNS/fehérje szintű elváltozások pontosabb megismerésére. Segítségükkel meghatározhattuk a különböző lokalizációjú daganatok genetikai hátterét, feltárhattuk a lehetséges célpontokat, amik akár egy fej-nyaki vagy hasnyálmirigy tumorban – tehát lokalizációtól függetlenül is – azonosak lehetnek. A daganatos sejtvonalakon végzett in vitro kísérletek segítségével pedig vizsgálhattuk a talált célpontok gátlásának terápiás hatását.

A bemutatásra kerülő munka konkrét célkitűzései a következők voltak:

- **Archivált FFPE szövetminták vizsgálata** DNS/fehérje szinten a lehetséges molekuláris markerek irányába, melyek potenciális célpontok vagy prognosztikus illetve prediktív markerek lehetnek a daganatterápia során.

  Fluoreszcens in situ hibridizációs módszert alkalmazva kívántuk vizsgálni a *PIK3CA* és *MET* gének kópiaszám változását. Emellett célul tűztük ki a p16^{INK4}-immunhisztokémia és a HPV DNS-alapú detektálásának összehasonlítását, prognosztikus értékének vizsgálatát.
- **Sejtvonalak tanulmányozása**, genetikai hátterük pontos elemzése és használata a lehetséges tirozin-kináz gátlószeres kezelések hatásának modellezésére.

  Célul tűztük ki a használt sejtvonalakban előforduló mutációk meghatározását új-generációs szekvenálással. Vizsgálni kívántuk a fehérjeexpressziót és a jelátviteli útvonalak aktivitását.
- **Molekuláris biomarkereken alapuló alcsoportok meghatározása**, amelyben egy-egy kezelőszer vagy kezelőszer kombináció kiemelkedően jó hatásprofillal rendelkezik, majd ezek hatás- illetve rezisztencia mechanizmusainak feltárása.

  Életképesség vizsgálatokkal kívántuk meghatározni a sejtvonalak kezelőszer-érzékenységét. Rezisztencia esetén a mechanizmus feltárását, kombinációs kezelések kidolgozását tűztük ki célul.

4 Anyag és módszerek

4.1 Szövettani mintákon alkalmazott módszerek

4.1.1 Fej-nyaki daganatok

4.1.1.1 Adatgyűjtés, betegek

Fej-nyaki daganatos betegek archivált, formalin-fixált, paraffinba ágyazott tumor mintáit vizsgáltuk. A betegek 18 év felettiek voltak továbbá a nyálmirigy, orrgarati, orrmelléküreg és nem laphám eredetű daganatok eltérő patológiájuk és klinikumuk miatt kizárásra kerültek. Az elhelyezkedés alapján négy nagyobb régiót különítettünk el, úgymint cavum oris (szájüreg), oropharynx (szájgarat), hypopharynx (garat), larynx (gége). A laryngealis régió daganatait elhelyezkedés, kiterjedés alapján három alrégióra osztottuk, úgymint szupraglottikus, glottikus és transzglottikus tumorok. A klinikai adatokat a kórház elektronikus rendszeréből és kórlapokból gyűjtöttük ki.

1. kohorsz:

152 fej-nyaki tumorral rendelkező beteg tumormintájának vizsgálatát végeztük el, akiket 2000 és 2008 között kezeltek a Jahn Ferenc Kórház Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Osztályán. A betegek közel 80%-a előrehaladott stádiumú daganattal rendelkezett (3. táblázat).

3. táblázat: A betegek paraméterei a diagnózis időpontjában: Az 1. kohorsz esetén

Klinikopatológiai paraméterek	*Betegek (N=152), N (%)*
Nem	
Férfi	112 (73,7)
Nő	40 (26,3)
Életkor	58,65 intervallum: 36-86
Stádium besorolás	
T	
T1	19 (12,5)
T2	38 (25,0)
T3	52 (34,2)
T4	39 (25,7)
Nem elérhető	4 (2,6)
N	
N0	61 (40,1)
N1	35 (23,0)
N2	45 (29,6)
N3	7 (4,6)
Nem elérhető	4 (2,6)
M	
M0	136 (89,5)
M1	12 (7,9)
Nem elérhető	4 (2,6)

Klinikopatológiai paraméterek	*Betegek (N=152), N (%)*
Stádium	
I	14 (9,2)
II	18 (11,8)
III	42 (27,6)
IV	74 (48,7)
Nem elérhető	4 (2,6)
Grade	
I	19 (12,5)
II	92 (60,5)
III	36 (23,7)
Nem elérhető	5 (3,3)
Lokalizáció	
Szájüreg	10 (6,6)
Szájgarat	53 (34,9)
Algarat	32 (21,1)
Gége	55 (36,2)
Szupraglottikus	28 (18,4)
Glottikus	20 (13,2)
Transzglottikus	7 (4,6)
Nem elérhető	2 (1,2)

2. kohorsz:

124 fej-nyaki laphámrákkal rendelkező beteg tumormintájának vizsgálatát végeztük el, akik 2012 és 2014 között a Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikáján részesültek kezelésben. A betegek részletes adatait a 4. táblázatban összegeztük.

4. táblázat: A betegek paraméterei a diagnózis időpontjában: A 2. kohorsz esetén

Klinikopatológiai paraméterek	*Betegek (N=124), N (%)*
Nem	
Férfi	99 (79,8%)
Nő	25 (20,2%)
Életkor	60,36 intervallum: 41-91
Stádium besorolás	
T	
T1	22 (17,6%)
T2	36 (28,8%)
T3	32 (25,6%)
T4a	24 (19,2%)
T4b	10 (8,0%)
Nem elérhető	1 (0,8%)
N	
N0	59 (47,2%)
N1	19 (15,2%)
N2a	7 (5,6%)
N2b	19 (15,2%)
N2c	15 (12,0%)
N3	5 (4,0%)
Nem elérhető	1 (0,8%)
M	
M0	117 (93,6%)
M1	7 (5,6%)
Nem elérhető	1 (0,8%)

Klinikopatológiai paraméterek	*Betegek (N=124), N (%)*
Stádium	
I	16 (12,8%)
II	18 (14,4%)
III	24 (19,2%)
IVa	46 (36,8%)
IVb	14 (11,2%)
IVc	6 (4,8%)
Nem elérhető	1 (0,8%)
Grade	
I	10 (8,0%)
II	56 (44,8%)
III	44 (35,2%)
Nem elérhető	15 (12,0%)
Lokalizáció	
Szájüreg	3 (2,4%)
Szájgarat	46 (36,8%)
Algarat	27 (21,6%)
Gége	49 (39,2%)

4.1.1.2 TMA-blokk

Mindkét kohorsz esetén 7-7 TMA-blokk készült TMA Master készülék segítségével (3D HISTECH Kft., Magyarország). A blokkok 2 mm átmérőjű szövethengereket („core”) tartalmaztak. Minden beteg esetén 3-5 szövethenger kiszúrása történt

párhuzamosan, ezzel biztosítva az inhomogén minták minél pontosabb reprezentációját. A párhuzamos minták értékelésekor mindig a legmagasabb csoportbeosztást vettük figyelembe. Az elkészült blokkokból 4 µm vastag metszetek készültek adhéziós lemezre, melyeket a továbbiakban ismertetett vizsgálatokhoz használtunk fel.

4.1.1.3 Immunhisztokémia – manuális

A minták feliratozását követően deparaffinálást végzünk, mely során háromszor 3 perc xilolos áztatást, abszolút alkoholos öblítést és leszálló alkoholsort (96%-90%-70%) alkalmazunk küvettánként szintén három percig. A rehidrálási folyamatot három desztillált vizes öblítéssel zárjuk, ahol különösen ügyelünk a szövethengerek sértetlenségére.

Az endogén peroxidázok blokkolását a miattuk keletkező erőteljes háttér kiküszöbölésére alkalmaztuk. Ehhez 60 ml metanolhoz (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) üveg küvettába 1 ml 30%-os hidrogén-peroxid (Sigma Aldrich) oldatot mértünk és a lemezeket belehelyezve 15 percig inkubáltuk. Az inkubálást háromszori csapvizes, majd háromszori desztillált vizes öblítés zárja, állítja le.

Az elsődleges antitest minél effektívebb bekötődése érdekében szükség van az antigének feltárására. Erre több módszer állt rendelkezésünkre, melyek közül mi a HIER, avagy hőindukálta epitóp feltárási módszert alkalmaztuk. A minél egyenletesebb feltárás érdekében mikrohullámú melegítést használtunk (Whirpool JT 366 mikrohullámú készülék). A kiválasztott feltáró puffer oldatot (TRIS-EDTA) megfelelő koncentrációra hígítottuk és 500 ml-t töltöttünk belőle egy műanyag edénybe. Ebbe fektettük bele a lemeztartó állványba helyezett mintákat és fóliával lefedve 45 percig melegítettük a kiválasztott programon. A melegítés után a mintákat a puffer oldatban 10 percig hűlni hagytuk, majd háromszori desztillált vizes öblítést követően TBST oldatba helyeztük három percre.

A connexin 43 antitest esetén az effektívebb antigén-hozzáférés érdekében emésztést alkalmaztunk. Ehhez 49 ml desztillált vízhez 1 ml tripszint (Gibco) mértünk, melyet 10 másodpercig alkalmaztunk, majd a mintákat TBST oldatba helyeztük.

Az indifferens fehérjék blokkolását párásító állványban végeztük. Az állvány vájatait desztillált vízzel töltöttük fel, és a lemezeket a vízszintes mintatartó mélyedéseibe helyeztük. A lemezekre előzőleg egyenletesen 100 µl 5%-os TBS-ben (pH 7,4) oldott

BSA oldatot vittünk fel, amely így egyenletesen fedte a szövetmintákat. A mintákat az oldat párolgását elkerülendő lefedtük és az inkubációt 20 percig végeztük.

Az inkubációs idő leteltekor a blokkoló oldatot leitattuk a lemezekről és 100 µl 5%-os BSA oldatban megfelelő arányban kihígított (lásd 5. táblázat) elsődleges antitestet mértünk fel rájuk, amit egyenletesen eloszlattunk és figyelve a vízszintes elhelyezkedésre a párásító állványba helyeztük őket egy éjszakára (körülbelül 16 óra inkubáció).

Másnap az elsődleges antitest oldatot TBST-vel leöblítettük, és három percig mostuk. Ezután Novolink Post-Primary (nyúlban termelt anti-egér IgG) antitestet vittünk fel rájuk, és párásító állványon 30 percig inkubáltuk. Ezt ismételt TBST oldatos öblítés és mosás követte. Másodlagos antitestként 2 csepp Novolink Polymer (anti-nyúl poly-HRP IgG) oldatot használtunk 30 percig, melyet az inkubációs idő letelte után leöblítettünk.

A peroxidáz aktivitást UltraVision DAB kromogénnel tettük láthatóvá. Ehhez 100 µl DAB kromogén + szubsztrát oldatot alkalmaztunk 1:50 arányban hígítva mikroszkópos kontroll mellett a barna színreakcióig (5-10 perc). Deszillált vizes öblítést követően hematoxylin oldattal magfestést végeztünk, és a felszálló alkoholsoros dehidrálást követően xilolból kiemelve Surgipath fedőmédiummal fedtük. 24 órás száradás után a minták digitalizásra készek voltak.

5. táblázat: Immunhisztokémia során alkalmazott antitestek és hígításuk

Név	*p53*	*Ki67*	*p16^{INK4}*	*EGFR*	*Connexin 43*
Gyártó	Novocastra	DAKO	LabVision-Thermo	Ventana-Roche	Cell Signaling
Hígítás	1:400	1:1	1:400	1:1	1:100

Kiértékelés

Legalább három, minimum 200 tumorsejtből álló régiót vizsgáltunk.

A festett tumorsejtek százalékos aránya (Ki67, p53, p16^{INK4}, connexin 43), illetve az érintett tumorsejtek százaléka és festődésük intenzitásának szorzata (EGFR) alapján a 6. táblázatban összefoglalt csoportosításokat alkalmaztuk.

6. táblázat: Immunhisztokémiai festés kiértékelésekor elkülönített csoportok

Csoportok	*1*	*2*	*3*	*4*
Ki-67 *p53* *connexin 43*	<5 %	6-20%	21-60%	>61 %

Csoportok	*1*	*2*	*3*
EGFR	0-200	201-300	301-400

Csoportok	*1*	*2*
p16^{INK4}	<75 %	≥75 %

4.1.1.4 Immunhisztokémia – gépi

A p16^{INK4} antitest a rutin diagnosztikában alkalmazott, így esetében a 2. kohorsz folyamán gépi festés is rendelkezésünkre állt, mely növeli a reprodukálhatóságot és ezáltal jobban validálható.

Az immunhisztokémiai jelölést Benchmark XT IHC/ISH festőautomatával végeztük. A deparaffinálás EZ Prep (Ventana, Tucson, AZ, USA) oldattal történt, melyet az epitóp feltárás követett először 30 percig 95°C-on, majd 4 percig 100°C-on Cell Conditioning Solution pH 8 (Ventana) oldattal. Az endogén peroxidázok blokkolására UV inhibítor (Ventana) oldatot használtunk 6 percig 37°C-on. Az elsődleges antitestet (Clone CINtec E4H6, Ventana) 32 percig alkalmaztuk 37°C-on 1:100 hígításban. A másodlagos antitest, UV HRP UNIV MULT (Ventana) oldatot 8 percig használtuk szintén 37°C-on. A színreakció előhívása DAB kromogénnel történt (XT Ultraview DAB v3 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 digitalizáltuk.

4.1.1.5 Fluoreszcens in situ hibridizáció

A metszeteket az immunhisztokémiánál említett módon xilollal és leszálló alkoholsorral deparaffináltuk. Ezt követően citrát pufferrel (pH 6) 30 perces mikrohullámú hőindukált antigén feltárást végeztünk. A citrát pufferből kiemelve a lemezeket desztillált vízzel leöblítettük és 1-2 csepp pepszin oldatot oszlattunk el a szövetmintákon. A pepszines emésztés 37°C-on történt nedveskamrában 5 percig, majd a folyamatot SSC pufferes mosással állítottuk le. Felszálló alkoholsorral történt mosások után 10 µl közvetlenül, kettősen jelölt gén (*PIK3CA* és *MET*) + centromer (CEN3 és CEN7) specifikus próbát oszlattunk el a jelölendő felületen (PIK3CA: Zytovision ZytoLight SPEC PIK3CA/CEN3 Dual Color Probe, MET: Zytovision Zytolight SPEC MET/CEN7 Dual Color Probe), fedőlemezzel buborékmentesen fedtük és Fixogum ragasztócementtel szigeteltük mindegyiket a párolgás elkerülése végett. A mintákat Termobright hibridizáló (Abbott) nedveskamrában inkubáltuk 10 percig 75°C-on, majd egy éjszakán keresztül 37°C-on. Másnap a mintákat vízfürdőben előmelegített mosópufferben mostuk háromszor 5 percig. Felszálló alkoholsorral történő dehidrálás után pedig 15 µl DAPI (Vector Laboratories) fedőmédiummal magfestést végeztük. A szövetmintákat fedőlemezzel fedtük és a felesleges fedőmédiumot 10 perc inkubálás után leitattuk. A mintákat a szükséges szűrőkkel rendelkező szkennerrel digitalizáltuk. A szűrőváltás a lehetséges képpont elcsúszások elkerülése érdekében látóterenként (field of view) történt.

Kiértékelés:

40 nem átfedő sejtmagban megszámoltuk és regisztráltuk a piros (centromer specifikus/CEN) és zöld (gén specifikus/lókusz specifikus/L) jelek számát. A vizsgálatot két gyakorlott kiértékelő egymástól függetlenül végezte. Nem egyező eredmények esetén harmadik vizsgálót vontunk be, akit az előzetes besorolásokról nem tájékoztattunk. A csoportok megállapításában a UCCC-Cappuzzo kritériumrendszer alapján jártunk el, melyet több klinikai vizsgálatban is alapul vettek [161, 162]. A pontos besorolást a 7. táblázatban összegeztük.

7. táblázat: Fluoreszcens in situ hibridizációs vizsgálat során elkülönített csoportok

	L= 2/sejt	*L= 3/sejt*	*L= 4+/sejt*	*L/CEN*
Diszómia	> 90%			
Alacsony triszómia		≥ 10% < 40%	< 10%	
Magas triszómia		≥ 40%	< 10%	
Alacsony poliszómia			≥ 10% < 40%	
Magas poliszómia			≥ 40%	
Amplifikáció				≥ 2

A minták digitalizálása

A könnyebb archiválás, a mérés reprodukálhatósága és a kiértékelés könnyítése érdekében a mintákat Panoramic Scan és Midi készülékekkel, 20-40x objektívvel digitalizáltuk. A digitalizált minták kiértékelésében Panoramic Viewer program, azon belül pedig az adatbázis-kapcsolt TMA Modul szoftver volt segítségünkre. Ez a program a már előzetesen táblázatba foglalt klinikopatológiai adatokat kapcsolja a TMA metszet megfelelő core-jához.

4.1.1.6 HPV genotipizálás

A 2. kohorsz esetében HPV genotipizálást végeztünk. Ehhez az előzetes vizsgálatunk során $p16^{INK4}$-pozitívnak bizonyult FFPE mintákból DNS-t izoláltunk. Az extrakció QIAmp FFPE Tissue Kittel történt a gyártó által javasolt protokoll szerint (Qiagen, Németország). A magas-kockázatú HPV DNS kimutatását CONFIDENCE™ HPV teszt felhasználásával és HPV16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 genotipizálással a NEUMANN Diagnostics (Budapest, Magyarország) cég végezte el. Az általuk használt TaqMan-alapú real-time PCR (QuantStudio™6 Flex platform) módszer HPV16 és 18 törzseket

külön, míg a többi törzset egyidejűleg vizsgálja, majd pozitivitás esetén külön reakcióban genotipizálja.

4.1.1.7 Statisztikai analízis

A statisztikai analízist IBM SPSS Statistics for Mac v.22.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) szoftverrel végeztük. A betegségspecifikus túlélést a diagnózis időpontja és az utolsó konzultációs alkalom között eltelt időből határoztuk meg. Az eseményt megtörténtnek tekintettük betegséghez kapcsolódó halálozás esetén, vagy ha az egyén az utolsó vizsgálat alkalmakor nem volt tumormentes. A túlélés vizsgálatára Kaplan-Meier analízist használtunk log-rank teszttel és Cox-regresszió analízist. Az összefüggések vizsgálatára χ^2-próbát és Fisher-féle egzakt tesztet használtunk Monte Carlo szimulációval. 95%-os konfidencia intervallumot használtunk minden teszt esetében és egy összefüggést szignifikánsnak tekintettünk, amennyiben a p-érték 0,05 alattinak bizonyult.

4.1.2 Hasnyálmirigy daganatok

4.1.2.1 Adatgyűjtés, betegek

138 esetben, 2012 és 2016 között vizsgált hasnyálmirigy daganatos beteg szekvenálási adatait gyűjtöttük ki az Oncompass Medicine Hungay Kft. (Budapest, Magyarország) adatbázisából. 114 esetben új-generációs szekvenálás (NGS) történt (IonTorrent platform), mely 50 onkogén és tumor szuppresszor gén (8. táblázat) 207 amplikonját fedte le (Ion Ampliseq Cancer HotSpot panel v2), míg 24 esetben Sanger szekvenálás történt a KRAS 2-es exonja esetében.

8. táblázat: Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 által vizsgált 50 gén

ABL1	*BRAF*	*EGFR*	*FGFR1*	*GNAS*	*IDH2*	*KRAS*	*NPM1*	*PTPN11*	*SMO*
AKT1	*CDH1*	*ERBB2*	*FGFR2*	*GNAQ*	*JAK2*	*MET*	*NRAS*	*RB1*	*SRC*
ALK	*CDKN2A*	*ERBB4*	*FGFR3*	*HNF1A*	*JAK3*	*MLH1*	*PDGFRA*	*RET*	*STK11*
APC	*CSF1R*	*EZH2*	*FLT3*	*HRAS*	*KDR*	*MPL*	*PIK3CA*	*SMAD4*	*TP53*
ATM	*CTNNB1*	*FBXW7*	*GNA11*	*IDH1*	*KIT*	*NOTCH1*	*PTEN*	*SMARCB1*	*VHL*

4.2 In vitro módszerek

4.2.1 Daganatos sejtvonalak származása és tenyésztésük

4.2.1.1 Hasnyálmirigy daganatos sejtvonalak

Három hasnyálmirigy daganatos sejtvonalat használtunk in vitro kísérleteinkhez: MiaPaCa2, BxPC3 és Panc1. Mindhárom sejtvonal az ATCC sejtbankjából származott. A Panc1 sejtvonalat 10% FBS-t (fetal bovine serum, Lonza) és 1% antibiotikum mixet (MZ, MycoZap Plus-CL, Lonza) tartalmazó DMEM médiumban tenyésztettük, a MiaPaCa2 sejtvonal esetében az előbb említett médium még 2,5% lószérumot is tartalmazott (horse serum, Lonza), míg a BxPC3 sejtvonal tenyésztéséhez 10% FBS-t és 1% MZ-t tartalmazó RPMI médiumot használtunk. A sejtek fenntartása, tenyésztése és a kísérletek inkubációja egyaránt 37°C-on és 5% CO_2 tartalmú párásított termosztátban történt.

4.2.1.2 Fej-nyaki daganatos sejtvonalak

Vizsgálatainkhoz két fej-nyaki daganatos sejtvonalat használtunk: FaDu (származás: algarat, primer tumor) és Detroit 562 (származás: garat, metasztázis). Mindkét sejtvonal az ATCC sejtbankjából származott. A Detroit 562 sejtvonalat EMEM, míg a FaDu sejtvonalat DMEM médiumban növesztettük 10% FBS, 1% MZ antibiotikum mix és 0,1% hozzáadott nátrium-piruvát jelenlétében.

4.2.2 Tirozin-kináz inhibítorok

Munkánk során főként az FDA által már engedélyezett, klinikai használatban lévő szereket, esetleg fázis III klinikai vizsgálatban lévő tirozin-kináz gátlószereket használtunk. Az EGFR (HER-receptorcsalád) gátlószerei: afatinib (Selleckchem, München, Németország), erlotinib (Selleckchem), MEK-inhibítorok: trametinib (Selleckchem), refametinib (RDEA119, ChemieTek, Indianapolis, IN, USA), PD0325901 (ChemieTek) selumetinib (AZD6244, SYNthesis), Akt-gátlószer: triciribine (MK2206, ChemieTek), Src-inhibítor: dasatinib (Selleckchem) voltak.

4.2.3 Életképesség mérések

A sejteket a már említett körülmények között 80%-os konfluenciáig növesztettük. Ezt követően a sejteket 96 lyukú steril sejttenyésztő lemezekre (Perkin Elmer) raktuk ki úgy, hogy minden pozícióban 1000 sejt legyen 150 µl médiumban. A sejteket 24 órán át hagytuk letapadni, majd monoterápia esetén 5 µM-os, kombinációs terápia esetén 5+5 µM-os maximális koncentrációról indított csökkenő kináz-inhibíror hígítási sorral kezeltük meg. 72 óra inkubáció elteltével a sejtek életképességét CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Németország) segítségével állapítottuk meg. A lumineszcenciát BioTek Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader készülék segítségével mértük meg. A kísérleteket minden esetben legalább háromszor ismételtük meg. A görbék illesztése GraphPad Prism version 7.00 for Mac (La Jolla, CA, USA) szoftverrel történt.

4.2.4 Gyógyszer-szinergizmusok vizsgálata (Compusyn)

A lehetséges gyógyszer-szinergizmusokat és az 50%-os effektív dózisnál definiált kombinációs indexeket (CI) Compusyn programmal állapítottuk meg. A program a medián-effektus és a kombinációs index - isobologram elveken alapszik [163].
A program által generált kombinációs indexek 1-es érték alatt gyógyszer-szinergizmust jelölnek. Leginkább additív hatást jelent a 0,75 és 1 közötti CI érték, míg efelett antagonizmusról beszélünk. Kutatásunk során állandó (1:1) arányban alkalmazott hatóanyag kombinációkat használtunk.

4.2.5 DNS izolálása sejtvonalakból és új-generációs szekvenálás

A daganatos sejtvonalakból történő DNS kinyerésére azonos módszert alkalmaztunk, mint amely tumoros szövetminták esetén szokásos. Ezzel is igyekeztük összehasonlíthatóbbá tenni eredményinket. Megközelítőleg 500000 darab sejtet gyűjtöttünk be DNS izolálás céljából, melyet QIAamp DNA FFPE Tissue Kittel (Qiagen) végeztünk el a gyártó útmutatásai alapján. A DNS-könyvtárat Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával készítettük a gyártó által megadott protokollt követve. Röviden, 50 gén 207 génfragmentumának amplifikálását végeztük el multiplex PCR-rel (Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2, Thermo Fisher

Scientific). Az így kapott szekvenciákra részleges emésztés után speciális, úgynevezett „vonalkód” szekvenciákat ligáltunk (Ion Xpress™ Barcode Adapters), mely lehetővé teszi a különböző mintákból származó könyvtárak egyszerre történő szekvenálását. A könyvtárak megtisztítása a reagensektől Agencourt™ AMPure™ XP reagenssel történt, az eluálás DNáz-mentes vízzel történt, amely így nem zavarja a későbbi reakciók sikerességét. A tisztított könyvtárakat Agilent Bioanalyzer DNA chip (High Sensitivity DNA Kit, Santa Clara, CA, USA) segítségével kvantifikáltuk és 318 Chip-en Ion PGM készülékkel szekvenáltattuk meg a Sequomics Kft. laboratóriumában (Mórahalom, Magyarország). Az átlagos mintánkénti leolvasások száma 200000 vagy afeletti volt. Az előforduló génvariánsokat az Oncompass Medicine Kft. erre a célra fejlesztett szoftverével elemeztük kiszűrve az alacsony minőségű, álpozitív eredményeket.

4.2.6 Western blot vizsgálat

A sejteket 90%-os lefedettségig növesztettük 6-lyukú steril sejttenyésztő lemezen. Amennyiben a fehérjeexpresszió és foszforiláció vizsgálata volt a cél ezt követően, inhibítoros kezelés esetén 4/6 órás inkubációs idő után jégbe hűtött PBS-sel mostuk és lízis pufferben (50 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM NaF, 1 mM ditiotreitol, 1mM nátrium-ortovanadát and proteáz inhibítor keverék (Merck KgaA, Darmstadt, Németország)) kapartuk fel a sejteket, melyben további 30 percig jégen inkubáltuk. A lizátumokat 13000 *g*-n, 4°C-on 15 percig centrifugáltuk. A fehérjekoncentrációt Bradford méréssel határoztuk meg. SDS-PAGE segítségével 5-30 µg fehérjét szeparáltunk, majd PVDF membránra juttattuk át elektrotranszfer módszerrel. A membránokat a megfelelő arányban hígított elsődleges antitestekkel (9. táblázat) 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk, majd mosást követően HRP- (tormaperoxidáz)-konjugált másodlagos antitestbe (10. táblázat) helyeztük, melyben szobahőmérsékleten 1 órán keresztül inkubáltuk. A fehérjespecifikus csíkokat Western Lightning Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence szubsztrát segítségével (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) tettük láthatóvá és ImageJ v1.48 szoftverrel kvantifikáltuk.

A fej-nyaki daganatos sejtvonalakon végzett inhibítoros kísérletek esetén 24 órás éheztetés és 100 nM Epidermal Growth Factorral (EGF) 30 percig történő indukciót követően történt a sejtekből a fehérje kinyerése.

Minden mérést legalább háromszor ismételtünk meg azonos körülmények között.

9. táblázat: Western blot analízis során alkalmazott elsődleges antitestek

felismert fehérje	*gyártó*	*klón*	*katalógusszám*	*hígítás*
EGFR	Cell Signaling	D38B1	4267	1:4000
pTyr1068EGFR	Cell Signaling	D7A5	3777	1:1000
MET	Cell Signaling	L41G3	3148	1:2000
pTyr1234/1235 MET	Cell Signaling	D26	3077	1:1000
HER2	Cell Signaling	D8F12	4290	1:1000
pTyr1221/1222HER2	Cell Signaling	6B12	2243	1:1000
HER3	Cell Signaling	D22C5	12708	1:1000
pTyr1289HER3	Cell Signaling	D1B5	2842	1:1000
Akt	Cell Signaling	40D4	2920	1:4000
pSer473Akt	Cell Signaling	D9E	4060	1:2000
ERK 1/2	Cell Signaling	3A7	9107	1:8000
pThr202/Tyr204				
ERK 1/2	Cell Signaling	D13.14.4E	4370	1:4000
Src	Cell Signaling	36D10	2109	1:1000
pTyr416Src	Cell Signaling		2101	1:1000
connexin 43	Cell Signaling		3512	1:1000
α-tubulin	Sigma-Aldrich	DM1A	T9026	1:40000

10. táblázat: Western blot analízis során alkalmazott másodlagos antitestek

Specificitás	*gyártó*	*katalógusszám*	*hígítás*
Anti-nyúl IgG	Cell Signaling	7074	1:2000
Anti-egér IgG	Cell Signaling	7076	1:8000

4.2.7 Fluoreszcens immuncitokémia

A sejteket steril 24-lyukú sejttenyésztő lemezbe helyezett 12 mm-átmérőjű kerek fedőlemezekre növesztettük. Miután a kellő konfluenciát elérték, 4%-os pufferelt formalin oldattal fixáltuk őket. Háromszori PBS-sel történő mosást követően 0,1%-os TBS-ben hígított Triton-X oldattal 10 percig permeabilizáltunk, majd az oldatot PBS-es öblítéssel eltávolítottuk. Az indifferens fehérjék blokkolása 5%-os (m/V) BSA (bovine serum albumin) oldattal történt 30 percen keresztül. Az elsődleges antitesteket szobahőmérsékleten alkalmaztuk a megadott hígításban (11. táblázat). Másnap TBS-es mosást követően kétféle fluoreszcens másodlagos antitestet (12. táblázat) vittünk fel egyidejűleg a mintákra és hagytuk bekötni 1,5 órán keresztül. Végezetül a be nem kötött antitesteket eltávolító PBS-es mosást követően DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) magfestést alkalmaztunk, a mintákat Nikon Labophot 2 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk és Spot kamerával készítettünk reprezentatív felvételeket.

11. táblázat Fluoreszcens immuncitokémia során alkalmazott elsődleges antitestek

felismert fehérje	*gyártó*	*klón*	*katalógusszám*	*hígítás*
connexin 43	Cell Signaling		3512	1:100
α-tubulin	Sigma-Aldrich	DM1A	T9026	1:40000

12. táblázat Fluoreszcens immuncitokémia során alkalmazott másodlagos antitestek

felismert fehérje	*gyártó*	*katalógusszám*	*hígítás*
Alexa-Fluor 488 anti-egér	Thermo Fischer	A11001	1:500
Alexa-Fluor 546 anti-nyúl	Thermo Fischer	A110035	1:500

5 Eredmények

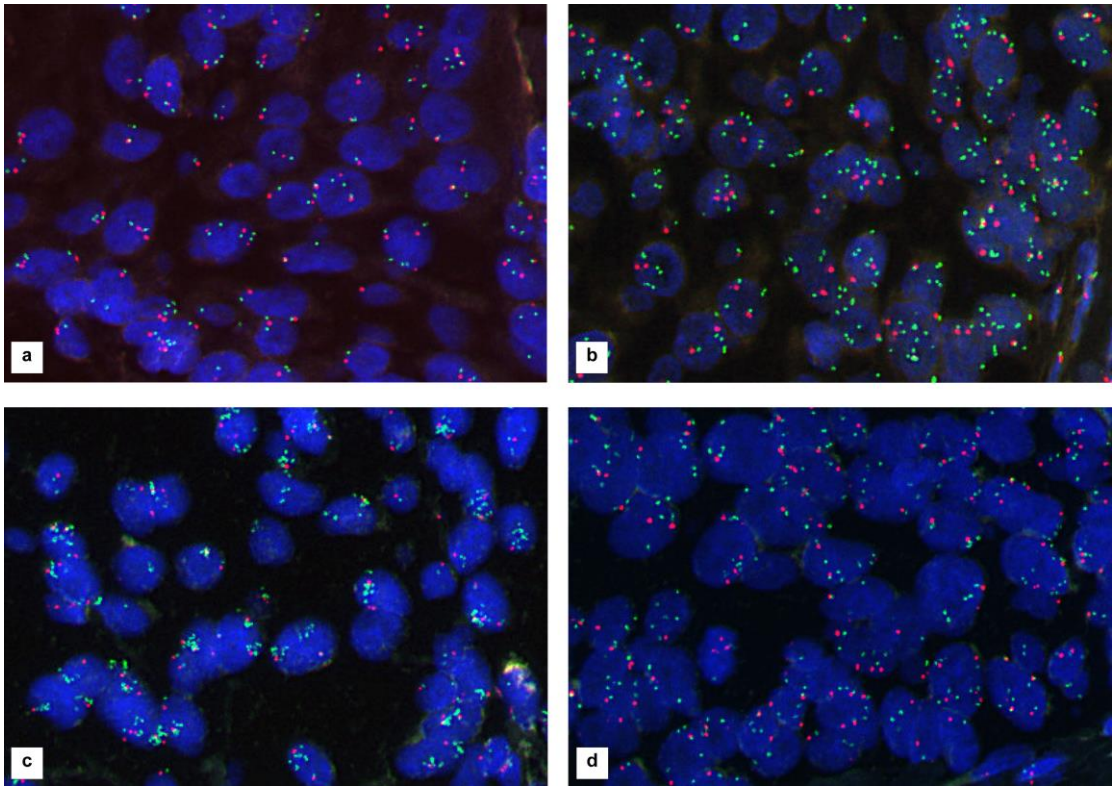
5.1 Prediktív és prognosztikus biomarkerek vizsgálata fej-nyaki daganatokban

5.1.1 A *PIK3CA* és *MET* CNG gyakorisága

Fluoreszcens in situ hibridizációs módszer alkalmazásával a fej-nyaki daganatos minták közül 7 esetben (5%) *PIK3CA* és 3-as kromoszóma diszómiát, 35 esetben (26,5%) alacsony triszómiát, 3 esetben (2%) magas triszómiát, 55 esetben (42%) alacsony poliszómiát és 26 esetben (20%) magas poliszómiát mutattunk ki. Hat szövetminta (4,5%) esetében valódi amplifikációt figyelhettünk meg. A *MET* gént illetően 26 esetben (20%) diszómiát találtunk az említett gén és a 7-es kromoszómára vonatkozóan, alacsony triszómia 58 (44%), míg magas triszómia 3 (2%) esetben igazolódott. A poliszómiás daganatos minták közül 37 (28%) alacsony, míg 7 (5%) magas arányban hordozta az említett elváltozást. A *MET* gén tényleges amplifikációját egyetlen esetben sem sikerült igazolnunk. (13. táblázat) A fluoreszcens in situ hibridizációs vizsgálat reprezentatív mikroszkópos képei a 7. ábrán láthatók.

13. táblázat: A FISH-vizsgálat során elkülönített csoportok: A betegeket a UCCC-Cappuzzo kritériumrendszer alapján az alább látható hat csoportba osztottuk. Bekeretezve a kópiaszám emelkedéssel rendelkező (CNG) kategóriába sorolt csoportok láthatók: *MET* gén esetében alacsony és magas poliszómia, míg *PIK3CA* esetében magas poliszómia és amplifikáció.

	***MET*, N (%)**	***PIK3CA*, N (%)**
Nincs adat	21(13,8)	20 (13,2)
Diszómia	26 (17,1)	7 (4,6)
Alacsony triszómia	58 (38,2)	35 (23,0)
Magas triszómia	3 (2,0)	3 (2,0)
Alacsony poliszómia	**37 (24,3)**	55 (36,2)
Magas poliszómia	**7 (4,6)**	**26 (17,1)**
Amplifikáció	**0 (0)**	**6 (3,9)**



7. ábra: Fluoreszcens in situ hibridizációs vizsgálat reprezentatív mikroszkópos felvételei: PIK3CA gén (zöld) és 3-as kromoszóma centroméra (piros) esetén a) normál génkópiaszám b) és c) PIK3CA amplifikáció d) PIK3CA és 3-as kromoszóma poliszómia

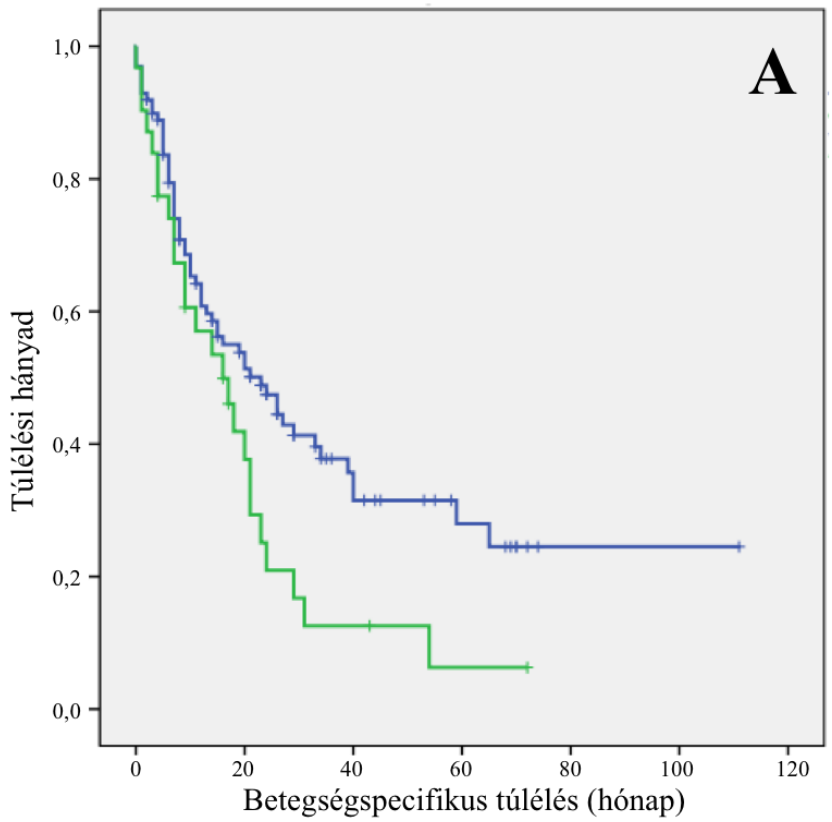
5.1.2 A *PIK3CA* és *MET* CNG prognosztikai szerepe

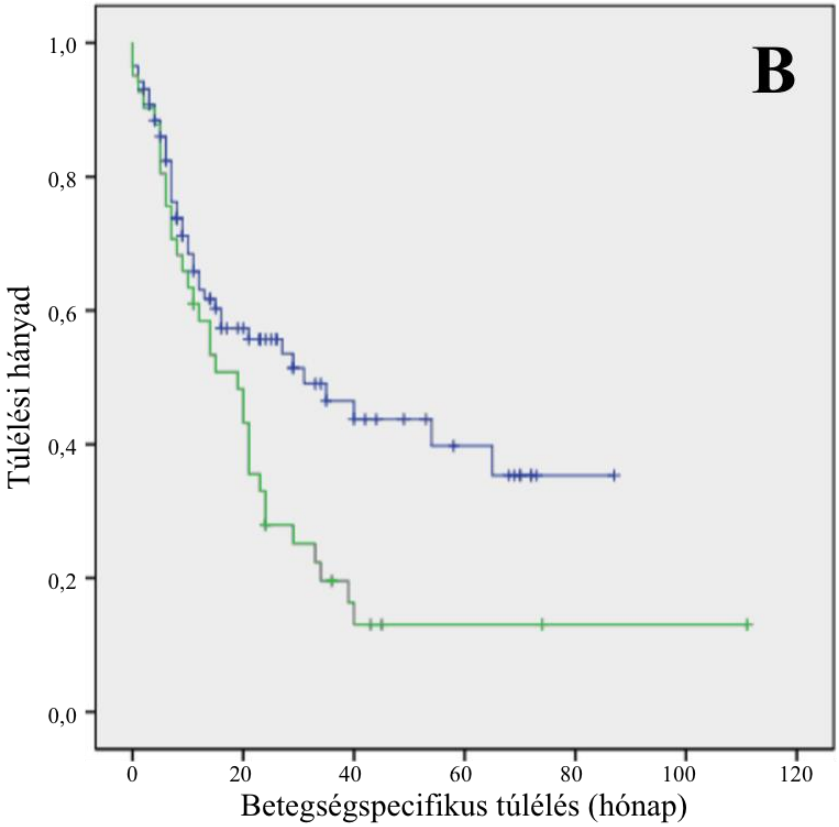
A UCCC-Cappuzzo kritériumrendszer alapján 6 csoportot különítettünk el. Hogy érzékelhetővé tegyük a különböző csoportok betegségspecifikus túlélésbeli különbségét, Kaplan-Meier analízist használtunk log-rank teszttel és Cox proporcionális hazard regressziós modellt alkalmaztunk. A grafikonon a többitől szignifikánsan elkülönülve futott a *PIK3CA* amplifikációval és magas poliszómiával rendelkező esetek túlélési görbéje. Ezen citogenetikai elváltozások esetén a betegek szignifikánsan rosszabb prognózissal rendelkeztek, mint az alacsony poliszómiával, alacsony és magas triszómiával vagy normál génállománnyal rendelkező társaik. A *MET* gén esetében kutatásunk során nem találtunk valódi génamplifikációt, de a magas poliszómiás kategóriába sorolt betegek mellett az alacsony poliszómiával rendelkezők esetében is

szignifikánsan kedvezőtlenebb prognózist igazoltunk a többi csoporthoz (alacsony és magas tirszómia illetve diszómia) képest.

Megfigyeléseinket alapul véve a génstátusz prognosztikai szerepe alapján két csoportot különítettünk el. A *PIK3CA* gén esetében a magas poliszómiával és az amplifikációval rendelkező eseteket neveztük magas kópiaszámúaknak (copy number gain, CNG), míg a *MET* gén esetében a magas poliszómiával rendelkező esetek mellett az alacsony poliszómiával rendelkezőket is ebbe a kategóriába soroltuk.

Szignifikáns összefüggést találtunk a *MET* és *PIK3CA* génstátusz és a betegségspecifikus túlélés között. A normál génstátusszal rendelkező (CNG nélküli) betegek esetében szignifikánsan hosszabb túlélést, kedvezőbb prognózist állapítottunk meg. (MET: 31 vs. 19 hónap; p=0,013 és PIK3CA: 23 vs. 16 hónap; p=0,037, 8. ábra)





8. ábra: Kaplan-Meier túlélési görbe normál (kék) és emelkedett génkópiaszámmal (CNG, zöld) rendelkező betegek esetében: A) *PIK3CA* és B) *MET* génekre vonatkozóan

5.1.3 *PIK3CA* CNG összefüggése a p16^{INK4}-státusszal

Szignifikáns összefüggést találtunk az alacsony p16^{INK4} -expresszió (75% vagy azalatti) és a *PIK3CA* gén kópiaszám emelkedése között, míg a *MET* gén esetében ugyanez az összefüggés nem adódott szignifikánsnak (14. táblázat). Ez a megfigyelés utalhat arra, hogy a HPV-negatív daganatok a *PIK3CA* gént gyakrabban sokszorosítják fel, mint a HPV infekcióval rendelkezők.

14. táblázat: Összefüggés a p16^{INK4} immunhisztokémiai festődés és *PIK3CA/MET* CNG között: A *PIK3CA* génkópiaszám emelkedése szignifikánsan gyakoribb volt a p16^{INK4}-negatív esetekben.

	p16^{INK4} IHC		**p-*érték***
	negatív	**pozitív**	
PIK3CA Normál	72	27	***p*=0,036**
PIK3CA CNG	29	3	
Nincs adat	13	7	
MET Normál	61	26	***p*=0,279**
MET CNG	34	9	
Nincs adat	17	4	

5.1.4 A *PIK3CA* és *MET* CNG összefüggése a betegek klinikopatológiai paramétereivel

χ^2-próba és Fisher teszt használatával elemeztük az összefüggést a klinikopatológiai paraméterek (tumor stádium, grade, lokalizáció, TNM) és a vizsgált gének kópiaszám változása között.

A grade és stádium vizsgálatakor nem találtunk szignifikáns összefüggést a *PIK3CA* és *MET* gének citogenetikai státuszával.

Nem találtunk szignifikáns összefüggést a négy major lokalizáció és a vizsgált genetikai elváltozás között, habár az algarat esetében gyakoribb volt a kópiaszám emelkedéssel rendelkező betegek száma a többi lokalizációhoz képest (p=0,09). A gége régió daganatai közül a glottikus daganatok esetében szignifikánsan kevesebb *PIK3CA* és

MET CNG-s esetet találtunk, mint a supraglottikus daganatok esetében (Fisher-féle egzakt teszttel vizsgálva PIK3CA p=0,036; for MET p=0,033) A vizsgált paraméterek, festések Cox-regresszió analízisének eredményei a 15. táblázatban kerülnek ismertetésre.

15. táblázat: Egyváltozós Cox-regresszió analízis: a klinikopatológiai paraméterek, biomarker expresszió és gén kópiaszám emelkedés esetén fej-nyaki daganatos betegekre vonatkozóan

Paraméter	***p-érték***	***HR***	***95% KI***	
			Alsó	**Felső**
Kor	0,860	1,038	0,689	1,562
Stádium	0,000	1,754	1,346	2,285
Grade	0,004	1,650	1,176	2,316
Lokalizáció	0,000	0,750	0,639	0,881
EGFR	0,004	0,512	0,326	0,804
p16^{INK4}	0,416	0,814	0,496	1,336
Ki-67	0,217	1,447	0,805	2,601
MET CNG	0,013	1,179	1,130	2,801
PIK3CA CNG	0,037	1,650	1,031	2,642

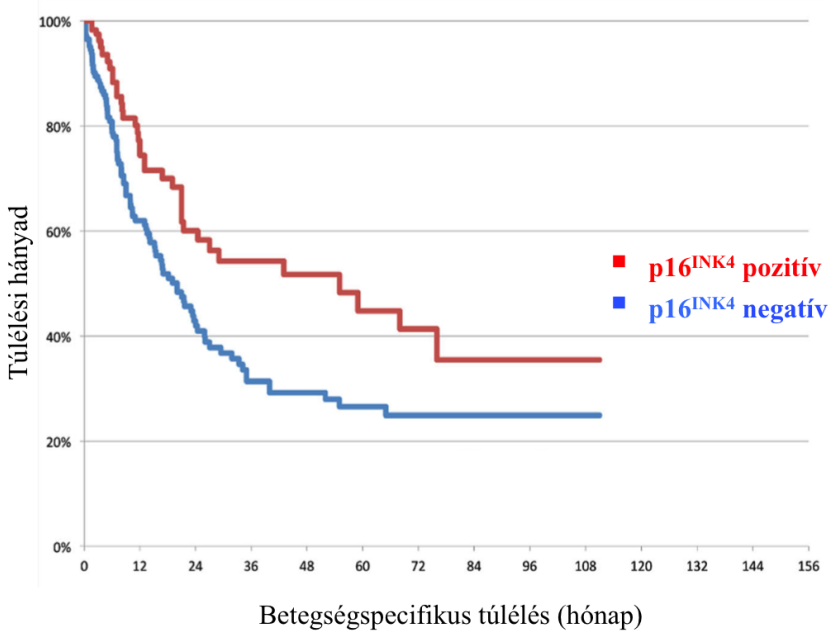
5.1.5 A *MET* CNG összefüggése a daganat EGFR expressziójával

Háromcsoportos rangsorolási rendszert alkalmaztunk az EGFR immunhisztokémiai festés intenzitásának megítélésére. Az alacsony és közepes intenzitású festéssel ellentétben a magas proteinexpressziót mutató mintákban alacsonyabb arányban volt jelen *MET* génkópiaszám emelkedés (p=0,019). A *PIK3CA* esetében nem találtunk szignifikáns kapcsolatot az EGFR proteinexpresszióval. A Ki-67 beosztás esetén egyik gén kópiaszám növekedése sem volt összefüggésbe hozható a proliferáció intenzitását tükröző festődéssel (PIK3CA p=0,1, MET p=0,123). Nem találtunk összefüggést a vizsgált CNG-k és a p53 immunhisztokémiai pozitivitás között sem.

5.1.6 p16^{INK4}-státusz lokalizációbeli különbségei és prognosztikai jelentősége fej-nyaki daganatokban

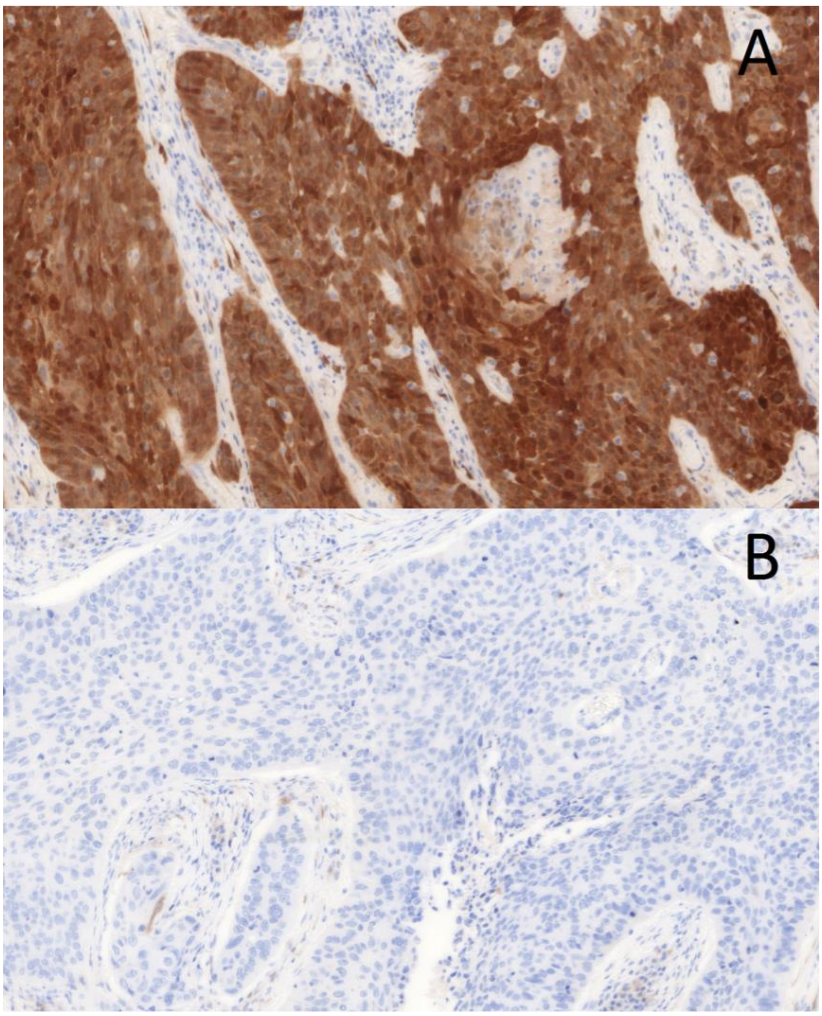
Az 1. kohorsz betegeit is tartalmazó, de annál nagyobb esetszámú, korábbi kutatásunk során a daganatok p16^{INK4} expresszióját egy korábbi beosztás szerint vizsgáltuk, mielőtt megjelent volna a 75%-os homogén mag és/vagy citoplazma festődésre vonatkozó ajánlás. Ebben az esetben a Ki-67 festés során is alkalmazott immunfestődési százalékokat használtuk, tehát 21% feletti festődés esetén soroltuk a daganatot a p16^{INK4}-pozitív kategóriába. Tapasztalataink alapján azonban a p16^{INK4}-immunhisztokémia esetében ritkán beszélhetünk intermedier festődésről, legtöbbször vagy alig festődő vagy igen erőteljes festődést mutató mintákkal találkozunk. Emiatt eredményeinket a 2. kohorsz esetében alkalmazott, szigorúbb kiértékeléssel összehasonlíthatónak tartjuk.

A korábbi vizsgálat során szignifikáns összefüggést találtunk a betegek túlélése és a p16^{INK4}-státuszuk között. A p16^{INK4}-pozitív betegek szignifikánsan jobb medián túléléssel rendelkeztek, mint a p16^{INK4}-specifikus immunreakcióval nem festődő tumorral rendelkezők (medián túlélés 55 hónap vs. 20 hónap, p=0,0049, 9. ábra).



9. ábra: p16^{INK4}-státusz és a betegségspecifikus túlélés összefüggése (1. kohorsz): A Kaplan-Meyer görbéket összehasonlítva a p16^{INK4}-pozitív betegek (piros görbe) túlélése szignifikánsan jobb volt, mint a p16^{INK4}-negatívaké (kék görbe).

A 2. kohorszban 110 beteg esetében ítéltük meg úgy, hogy a szövethengerek festődése megfelelően értékelhető. A 110 esetből 19 (17,3%) bizonyult p16^{INK4}-pozitívnak (75%-kos vagy afeletti tumorsejt festődési arány). A p16^{INK4}-expresszió pozitív és negatív besorolást kapott szövetmintáinak reprezentatív mikroszkópos felvétele a 10. ábrán látható. A legmagasabb arányú pozitivitást a szájgarat tumorai között tapasztaltuk, míg a többi régió daganatai alacsonyabb arányban (gége: 4,8%, algarat: 4,2%) vagy egyáltalán nem (szájüreg: 0%) tartalmaztak p16^{INK4}-pozitív daganatmintát. A lokalizációbeli eltérések szignifikánsnak bizonyultak (p<0,001). Az immunhisztokémiai festés reprezentatív mikroszkópos felvételei a 10. ábrán láthatók.

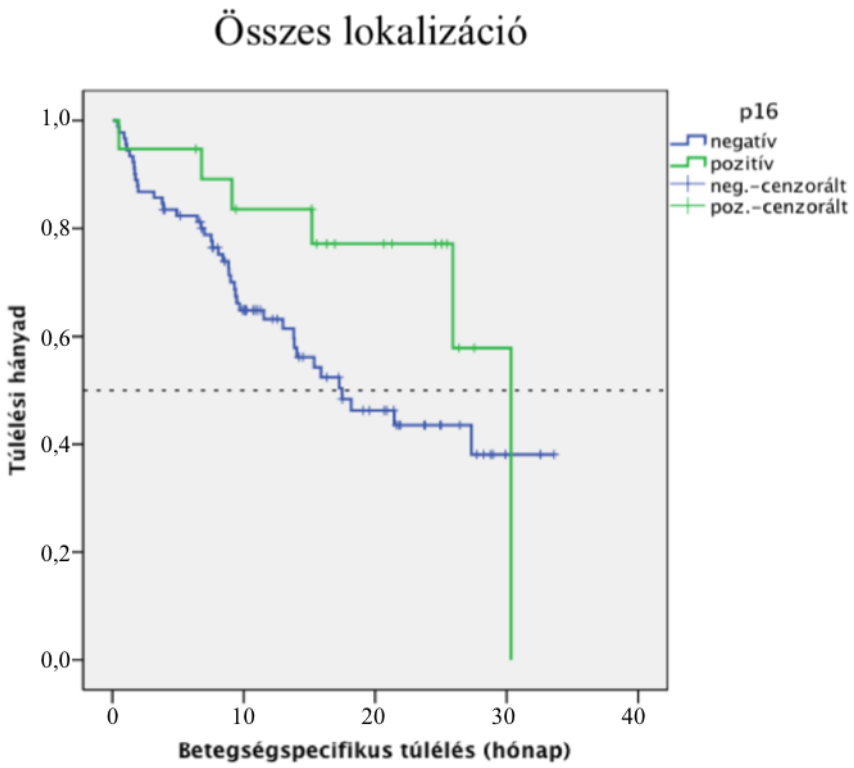


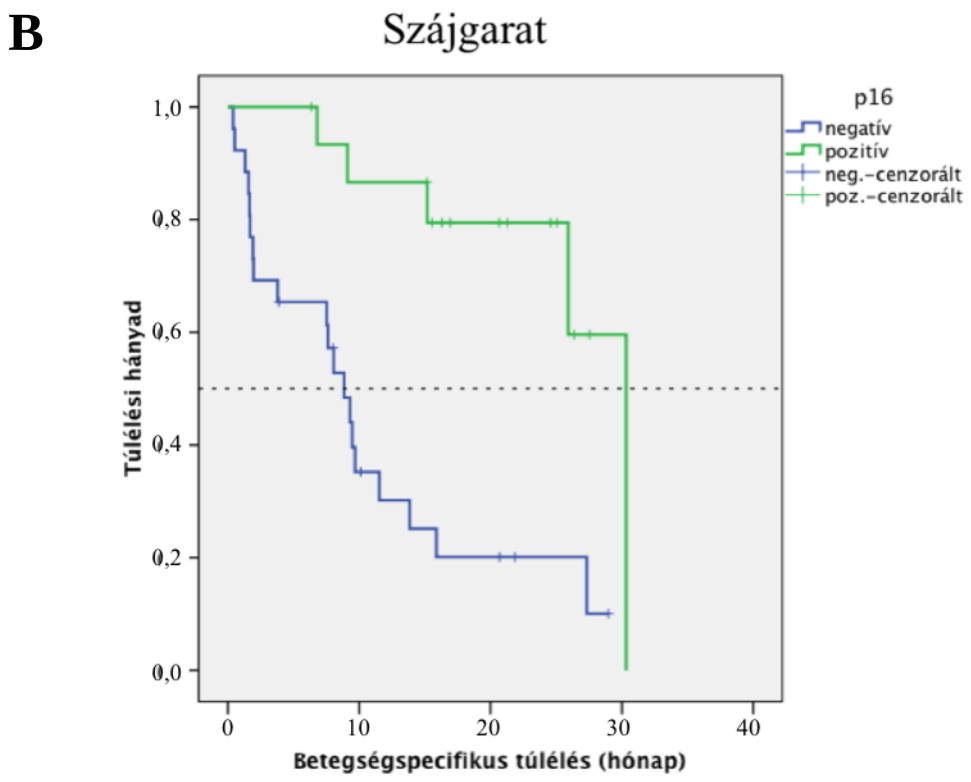
10. ábra: Reprezentatív mikroszkópos felvétel a p16^{INK4} immunhisztokémiai festéséről: A) p16^{INK4}-pozitív szövetminta (a daganatsejtek festődési aránya 75% vagy afeletti) B) p16^{INK4}-negatív szövetminta (gyakorlatilag nem figyelhető meg festődő tumorsejt)

Amikor a prognosztikai analízis során az összes elhelyezkedést vizsgáltuk, az első publikációnk eredményeivel ellentétben nem találtunk szignifikáns eltérést a p16^{INK4}-festődött és p16^{INK4}-negatív daganattal rendelkező személyek betegségspecifikus túlélésében (medián túlélés: 17,5 vs. 30,3 hónap, p=0,107 log-rank teszttel; Cox-regresszió: HR: 0,5 (95% CI: 0,212-1,181), p=0,114, 11A. ábra)

Ezzel szemben, ha a vizsgálat során kiemeltük a szájgarat daganatait és ezen lokalizációban megvizsgáltuk a p16^{INK4}-pozitív és negatív daganattal rendelkező páciensek betegségspecifikus túlélését, szignifikáns különbséget állapítottunk meg. A p16^{INK4}-pozitív szájgarati daganatok esetén szignifikánsan jobb prognózist találtunk a p16^{INK4}-negatív esetekhez képest (medián túlélés: 30,3 vs. 8,8 hónap, p<0,001 log-rank teszttel; Cox-regresszió: HR: 0,175 (95% CI: 0,059-0,520), p=0,002, 11B. ábra). Nem találtunk összefüggést a daganatok p16^{INK4}-kifejeződése és a T, N és M státusz, stádium, hisztológiai differenciáltsági fok és a beteg kora között. Ez a megfigyelés mind a szájgarati, mind az összes lokalizációt együttvéve igaz volt.

A





11. ábra: Kaplan-Meier túlélési görbe: p16^{INK4}-negatív (kék) és p16^{INK4}-pozitív (zöld) daganattal rendelkező betegek esetében A) az összes tumorlokalizációra és B) a szájgarati régióra vonatkozóan

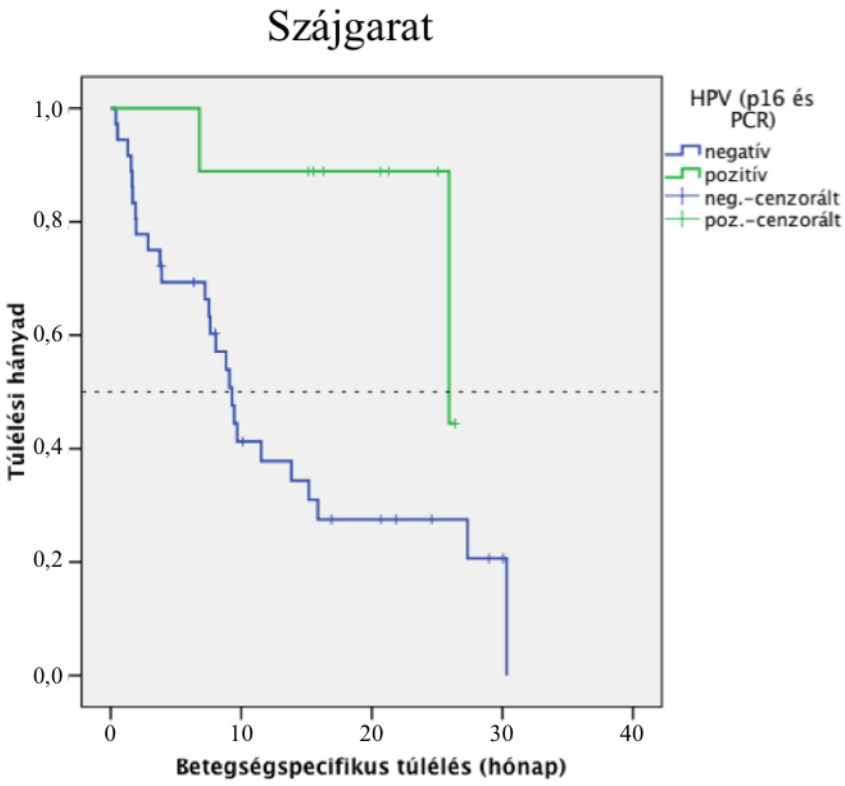
5.1.7 A HPV-sátutsz prognosztikai szerepe és a p16^{INK4}-festés specificitása ennek előrejelzésére

A p16^{INK4}-pozitív esetekben DNS-t izoláltunk és real-time PCR módszerrel HPV-kimutatást végeztünk rajtuk 7 magas kockázatú HPV altípusra vontkozóan (HPV 16,18,31,33,45,52 és 58). A 19 darab p16^{INK4}-pozitív esetből 9 beteg daganatmintájában tudtuk kimutatni a kórokozót (HPV-pozitív esetek), melyből 8 esetben a leggyakoribb HPV altípus, a 16-os volt jelen. A fennmaradó egy tumormintában a HPV 33-as altípusát mutattuk ki. Minden HPV-pozitív minta a szájgarati régióból származott (16. táblázat). Ez 21,4%-os HPV- pozitivitási arányt jelent ebben a régióban (9/42). Azonban a p16 HPV-pozitivitást prediktáló specificitása a szájüregi régióban is csupán 56,3%-nak adódott (a szájgarati régióban 16 p16-pozitív esetből 9-nél mutattuk ki a kórokozó jelenlétét).

A HPV-pozitív szájgarati tumorral rendelkező betegek betegségspecifikus túlélése szignifikánsan jobb volt, mint a HPV-negatív esetekben (p16-negatív és p16 pozitív, de HPV PCR negatív) (medián túlélés: 25,9 vs. 9,5 hónap, *p*=0,024 log-rank teszttel; Cox-regresszió: HR: 0,217, 95% CI: 0,051-0,932, *p*=0,04, 12. ábra)

16. táblázat: A p16^{INK4} -pozitivitás és a HPV-pozitivitási arány különböző elhelyezkedésű daganatok esetén

		Szájgarat	***Gége***	***Algarat***	***Szájüreg***	***Total***
	N (%)	42 (38,2%)	42 (38,2%)	24 (21,8%)	2 (1,8%)	110 (100%)
p16^{INK4}-pozitív	N	16/42	2/42	1/24	0/2	19
	%	38,1	4,8	4,2	0	17,3
HPV-pozitív	N	9/42	0/42	0/24	0/2	9
	%	21,4	0	0	0	8,2



12. ábra: Kaplan-Meier túlélési görbe: HPV-negatív (PCR és p16-státusz alapján, kék) és HPV⁻pozitív (zöld) daganattal rendelkező betegek esetében a szájgarati régióban

5.1.8 A dohányzás etiológiai szerepe a p16^{INK4}-pozitív fej-nyaki daganatos páciensek körében

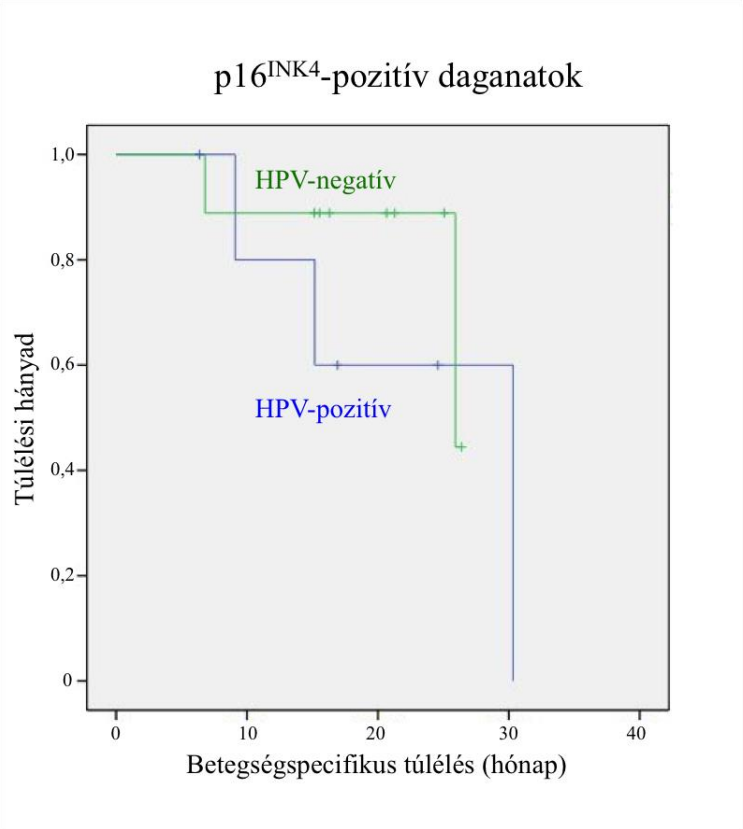
Mivel igen nagy arányban figyeltünk meg HPV-negatív eseteket a p16^{INK4}-immunhisztokémiával pozitivitást mutató minták között, megvizsgáltuk a dohányzási szokásokat a p16^{INK4}-pozitív betegek esetében HPV-pozitív és HPV-negatív alcsoportokra bontva őket. Érdekes módon a HPV-pozitív betegek körében nem találtunk a felmérés pillanatában is dohányzó egyént, és 55,4%-uk betegtörténetében nem is fordult elő ez a tényező. Máshonnan megközelítve a HPV-negatív betegek 67,7%-a vallotta magát a kérdőív kitöltésekor is dohányzónak, míg mindösszesen 7% volt, aki sosem dohányzott.

A csoportok között tapasztalt különbség szignifikáns volt a dohányzás tekintetében (Fisher-féle egzakt teszt: p=0,002), míg az alkoholfogyasztási szokásaikat illetően nem találtunk számottevő eltérést a HPV-pozitív és negatív esetek között.

16. táblázat: Dohányzás és HPV-státusz közötti összefüggés p16^{INK4}-pozitív betegek esetében

Dohányzási szokások		*Soha*	*Régen*	*Jelenleg is*
p16^{INK4} +	**HPV PCR -**	7%	25,3%	67,7%
	HPV PCR +	55,6%	44,4%	0,0%

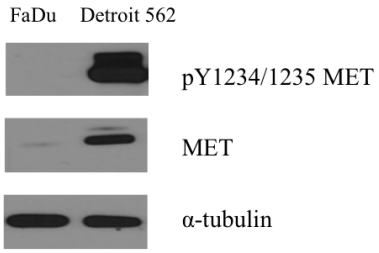
Emellett érdekes módon nem találtunk szignifikáns estérést a p16^{INK4}-pozitív daganattal rendelkező betegeket vizsgálva a HPV-asszociált és HPV-negatív esetek túlélésében (13. ábra, $p > 0{,}05$). Ez szintén utalhat arra, hogy a kiváltó tényezőtől, mechanizmustól függetlenül (hogy az HPV-fertőzés vagy egyéb mutációk, epigenetikai tényezők hatására történik) a p16^{INK4}-expressziója a prognózist meghatározó tényező.



13. ábra: p16^{INK4}-pozitív betegek Kaplan-Meier túlélési görbéi HPV-pozitív és HPV-negatív esetekben

5.1.9 Fej-nyaki daganatos sejtvonalak molekuláris háttere és tirozin-kináz inhibítor érzékenységük közötti összefüggés

Munkánk következő szakaszában olyan fej-nyaki daganat sejtvonalakat kerestünk, amelyek minél jobban modellezik a betegmintákban feltárt genetikai profilokat.
Western blot analízissel elvégeztük a FaDu és Detroit 562 sejtvonalak fehérjeexpressziós és foszforilációs vizsgálatát EGFR/pEGFR, HER2/pHER2, HER3/pHER3, MET/pMET, Akt/pAkt, Src/pSrc, ERK1/2/pERK1/2 fehérjéket illetően (a pontos foszforilációs helyek megnevezése a 9. táblázatban található). A vizsgált sejtvonalak mutációi régóta ismertek a legfontosabb géneket illetően. A sejtvonalak molekuláris genetikai hátterét és MET-expresszióbeli különbségét a 14. ábra mutatja be.
A FaDu és Detroit 562 sejtvonalak esetében a ErbB/HER-fehérjecsalád expresszióját tekintve hasonló eredményt kaptunk, a FaDu esetében tapasztaltunk enyhén magasabb aktivitást, de ez a különbség nem volt jelentős. A legszembetűnőbb különbség a MET-expresszióban és még inkább a MET-aktivitásában adódott, ami a Detroit 562 esetében jelentősebb. Emellett a receptoroktól lejjebb elhelyezkedő fehérjék esetén (Akt, Src, ERK) sem találtunk nagyobb eltérést az expresszió, foszforiláció terén. Elmondható tehát, hogy a két sejtvonal expressziója a vizsgált fehérjék közül főként a MET kifejeződésében és aktivitásában tér el.

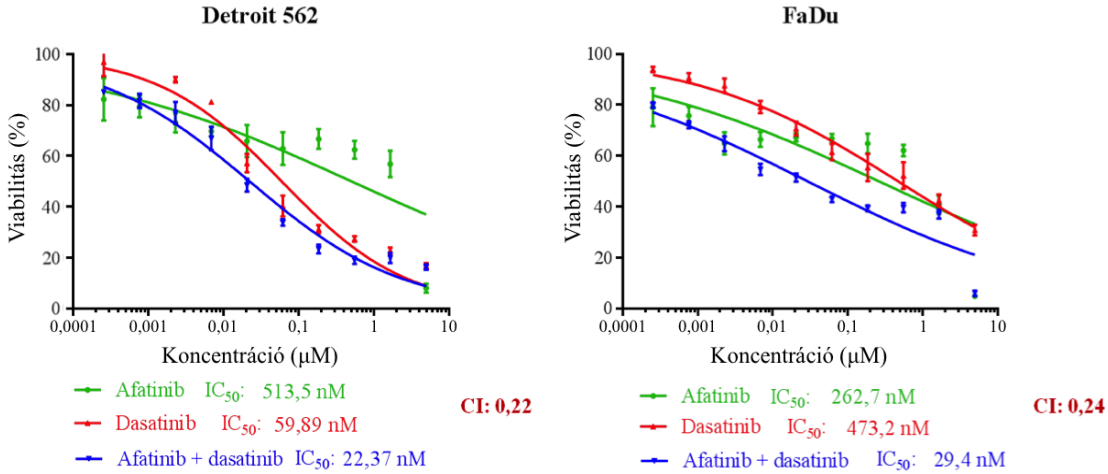


Mutáns gén	FaDu	Detroit 562
TP53	R248L	R175H
PIK3CA		H1047R

14. ábra: A vizsgált fej-nyaki daganatos sejtvonalak legfontosabb molekuláris eltérései: Mindkét sejtvonal TP53 mutációt hordoz, emellett a Detroit 562 aktiváló PIK3CA mutációt is. A két sejtvonal expressziós profilja a vizsgált fehérjéket illetően közel azonos, kiemelkedő azonban MET-expressziós és -aktivációbeli eltérésük.

A kis molekulasúlyú, tirozin-kináz inhibítoros kezelés során kisebb, kétszeres különbséget tapasztaltunk a sejtvonalak afatinib érzékenységében, a Detroit 562

PIK3CA mutáns és MET overexpresszáló sejtvonal esetében magasabb IC_{50} koncentrációt mértünk. A dasatinib (multikináz-, főként Src-gátlószer) kezelés tekintetében azonban az előbbinél jóval nagyobb volt az eltérés a FaDu és a Detroit 562 sejtvonalak növekedésgátlásában. A Detroit 562 sejtvonalon majdnem egy nagyságrenddel kisebb IC_{50}-koncentrációt mértünk. A két kezelőszer 1:1 arányú kombinációja pedig mindkét esetben szinergista hatást ért el (15. ábra), azonban ez a Detroit 562 esetében nem jelentett jelentős dózisredukciót a dasatinib monoterápiához képest.

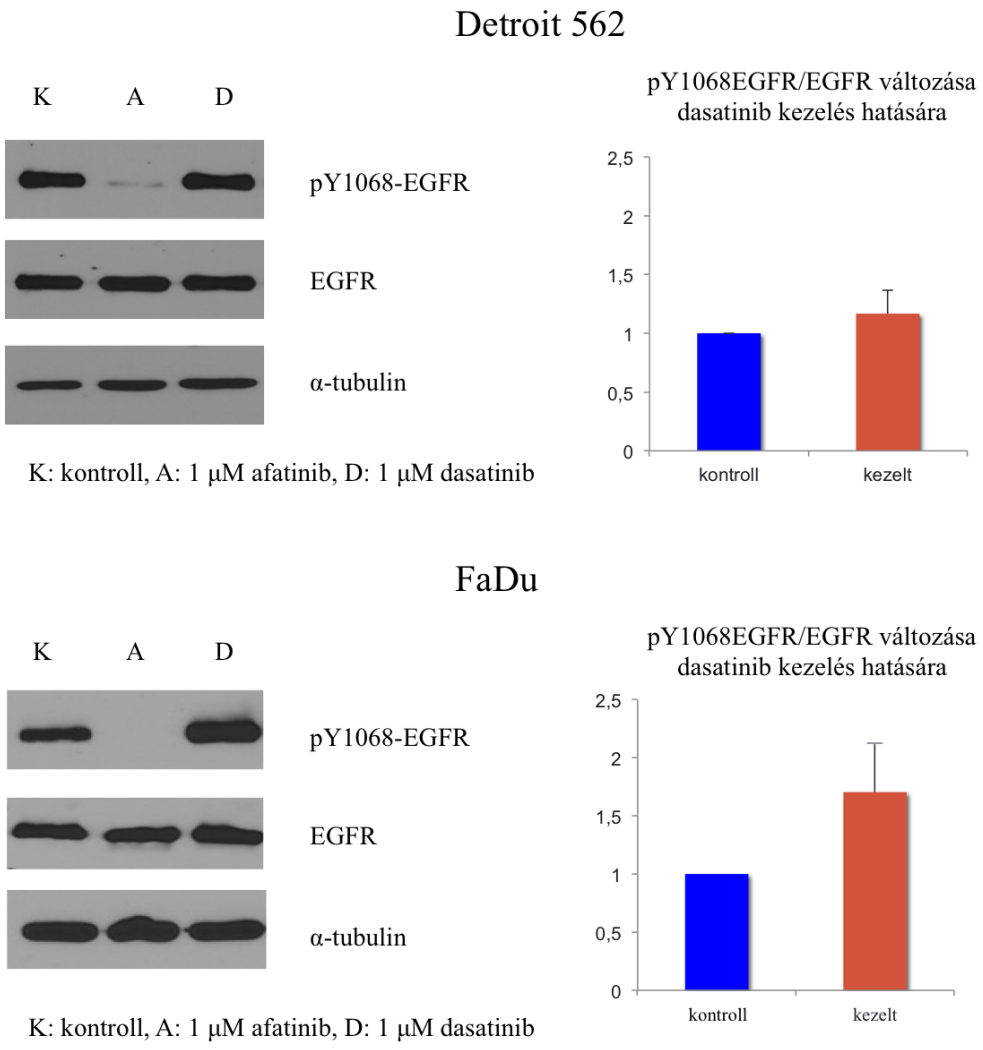


15. ábra: A vizsgált fej-nyaki daganatos sejtvonalak inhibítor érzékenysége afatinib és dasatinib kezelőszerre: Mindkét sejtvonal esetében szinergizmust tapasztaltunk a két kezelőszer kombinációjakor, azonban ez a Detroit 562 esetén nem jelentett jelentős dózisredukciót a dasatinib monoterápiával szemben.

Amikor megvizsgáltuk az EGFR fehérje foszforilációjának változását 1 μM dasatinib kezelés hatására a FaDu sejtvonalon, azt figyeltük meg, hogy a relatív EGFR-foszforiláció átlagosan közel duplájára nőtt, míg a Detroit 562 esetében ez a változás nem volt jelentős (16. ábra). A jelátvitelben lejjebb elhelyezkedő, általunk vizsgált fehérjék (Akt, ERK) aktivitása egyik esetben sem változott lényegesen. Ezért azt feltételezzük, hogy a HER-család minden tagját jelentős mértékben expresszáló FaDu esetében emiatt a visszacsatolás miatt tapasztalunk szinergista hatást a két kezelőszer között kombinációban alkalmazva. A dominánsan MET-függő Detroit 562 esetén a visszacsatolásnak nincs mérvadó szerepe, a dasatinib monoterápia önmagában

célravezető lehet. A monoterápia sikere az Src fehérje MET aktiváló képességében keresendő, míg a FaDu esetében a MET-receptor blokádja a jelátviteli utak átrendeződésén keresztül az EGFR irányába tereli az aktivitást.

Annak tisztázására, hogy a visszacsatolás milyen fehérjén keresztül történik és hogy az Src-fehérje vagy valamilyen más célpont (a dasatinib multi-kináz gátlószer volta miatt) váltja ki az EGFR aktiválódását további, géncsendesítéses és protein array vizsgálat szükséges.



16. ábra: Reprezentatív Western blot ábra és három független kísérlet kvantifikációja FaDu és Detroit 562 sejtvonalak dasatinib kezelése esetében: A FaDu sejtvonal vizsgálata során dasatinib kezelés hatására az EGFR-aktivitás közel kétszeresére növekedett, míg Detroit 562-nél a változás nem volt jelentős (átlagosan 1,16-szoros).

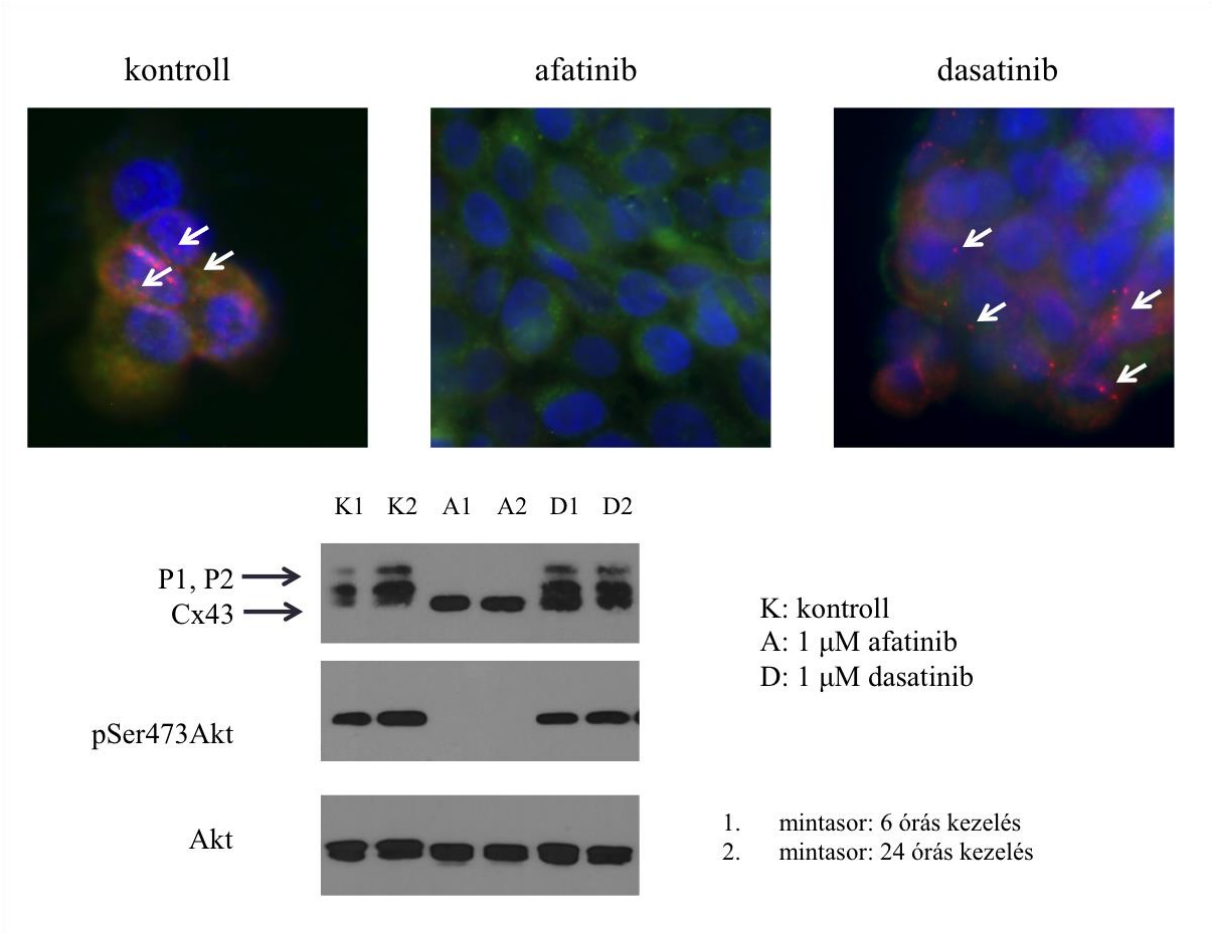
5.1.10 A connexin 43 foszforilációja és membrán lokalizációja

Megvizsgáltuk a korábbi munkánk során prognosztikus értékűnek ítélt connexin 43 fehérje expresszióbeli és foszforilációs változását a FaDu fej-nyaki daganatos sejtvonalon az általunk potenciális terápiás ágensnek ítélt dasatinib és afatinib kezelőszerek esetében. Ehhez a sejteket 1 μM kezelőszerrel inkubáltuk 6 és 24 órán keresztül és ezt követően az elkészített sejtlizátumból Western blot analízist végeztünk. Ennek során azt találtuk, hogy a kontroll és dasatinibbel kezelt sejtek esetében a totál-connexin 43 fehérjérespecifikus jel felett két másik is jelen van (P1 és P2), míg az afatinib esetében ez a második jel eltűnik és csupán a foszforilálatlan fehérje van jelen a lizátumban (17. ábra). Más munkacsoportok korábban bizonyították, és ezt az antitest gyártója is megerősítette, hogy ezek a számfeletti csíkok a connexin 43 fehérje foszforilált formái [85]. A vizsgált foszforilációs helyek többek között az Akt-fehérje célpontjai. Western blot analízisünk során azt találtuk, hogy az afatinib teljesen legátolja az Akt fehérjét, míg a dasatinib kezelést követően az Akt továbbra is számottevő aktivitást mutat. A tapasztalt foszforilációs változás tehát az afatinib kezelőszer Akt-gátló hatásának tudható be. Balla és munkatársai óriássejtes csonttumorok esetében azt tapasztalták, hogy a connexin 43 csökkent foszforilációja esetén kevesebb fehérje helyeződik ki és stabilizálódik a membránban.

Annak vizsgálatára, hogy hogyan változik a connexin 43 fehérje membránba helyeződése afatinib és dasatinib kezelés hatására fluoreszcens immuncitokémiát végeztünk. Ehhez a fedőlemezen tenyésztett sejteket 6 órás kezelőszer inkubációnak tettük ki, majd a módszerek fejezetben leírt módon elvégeztük a fluoreszcens immunreakciót. A reprezentatív mikroszkópos ábrán látható, hogy a kontroll és dasatinibbel kezelt sejtminták esetében érzékelhetően több connexin 43 plakkot látunk, mint az afatinibbel kezelt sejtek esetében (17. ábra). Az elégtelen feltárás és a FaDu sejtvonal nagy sejtmag/citoplazma aránya miatt azonban nem látjuk a foszforiláció csökkenése miatt a sejten belül esetlegesen felhalmozódott, foszforilálatlan fehérjét.

Fontos megjegyeznünk, hogy bár az esetszám nem reprezentatív, de 4 beteg esetében rendelkezésünkre állt FFPE minta a daganatból kezelés előtt és a kezelés után kiújult recidívából. Ebből három esetben TPF (paclitaxel–cisplatin–5-Fluorouracil (5-FU)) kezelés történt, aminek hatására két esetben csökkent, egy esetben pedig nem változott a connexin 43 expressziója a sejtmembránban. Így mindenképp érdemes a többi

hatóanyag, illetve a paclitaxel rövid és hosszú távú, connexinek kifejeződésére/kihelyeződésére gyakorolt hatásának vizsgálata a daganatos sejtvonalak esetében.



17. ábra: Reprezentatív mikroszkópos felvétel és Western blot analízis connexin 43 (Cx43) fehérje foszforilációjának és membrán lokalizációjának vizsgálatára: Afatinib kezelés hatására a connexin 43 fehérje foszforilációja eltűnik és 6 óra kezelést követően a membrán lokalizáció is látványosan lecsökken. Ezt a jelenséget az afatinib Akt-gátló hatásának tudhatjuk be. A nyilak a connexin 43 plakkokat jelölik.

5.2 Prediktív és prognosztikus biomarkerek vizsgálata hasnyálmirigy daganatokban

5.2.1 Hasnyálmirigy daganatos páciensek és sejtvonalak NGS eredményének vizsgálata

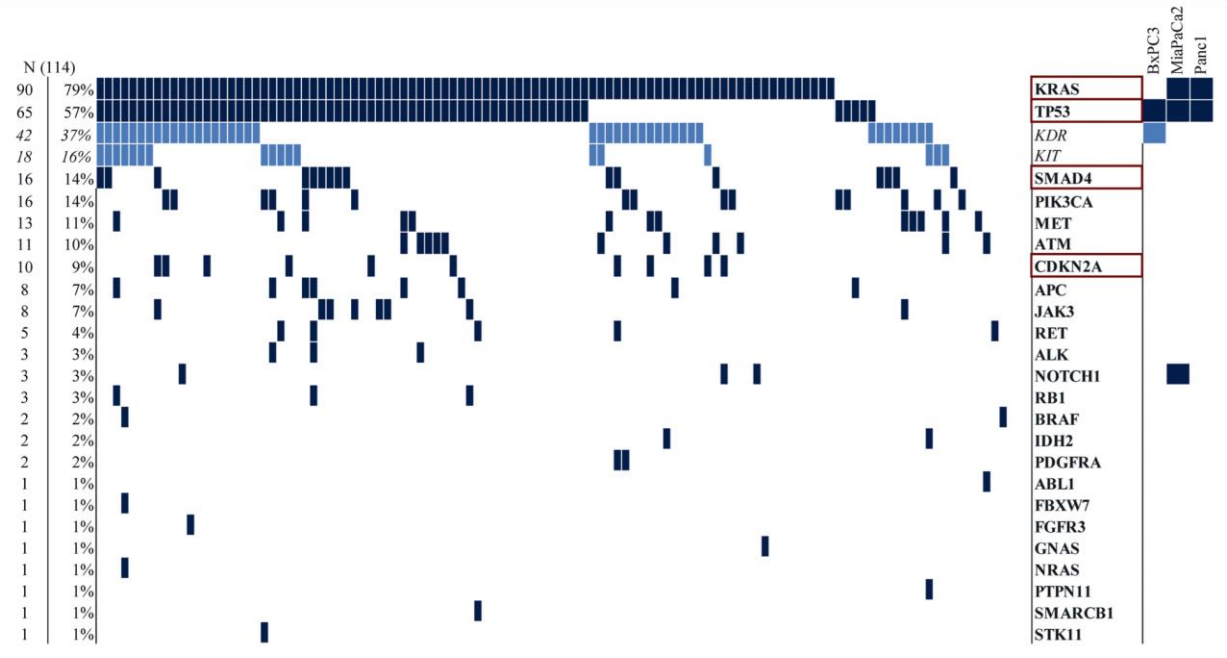
A 138 vizsgált DNS-szekvenálási reakció mindegyikében megtörtént a KRAS onkogén leggyakrabban előforduló (hotspot) mutációinak vizsgálata. 114 esetben a vizsgálathoz 49 másik gén új-generációs amplikon szekvenálási adatai is rendelkezésünkre álltak, míg 24 beteg esetében csupán az említett gén vizsgálata történ meg Sanger-szekvenálással. Új-generációs szekvenálással 114-ből 90, míg Sanger szekvenálással 24-ből 16 esetben találtunk mutációt a sérülékeny régiókban. Összesítve tehát 106/138 esetben, a daganatok több, mint háromnegyedében igazolható volt KRAS mutáció. A leggyakoribb elváltozás a 2-es exon 12-es kodonjának glicin/aszparaginsav cseréje volt (G12D, 43/138), ezt követi a valin (G12V) és az arginin (G12R). 9 esetben volt érintett a 3-as exonban található 61-es kodon, 1-1 alkalommal a 13-as és 19-es kodonok, míg 2/138 daganat glicin/cisztein (G12C) aminosevcserét hordozott a 12-es kodonban.

Az új-generációs szekvenálással vizsgált daganatminták esetében rendelkezésünkre állnak további gének amplikonjainak szekvencia analízis adatai is. A négy, hasnyálmirigy daganatban leggyakrabban mutálódó gént illetően *TP53* mutáció 64/114 (56%), *SMAD4* mutáció 16/114 (14%), míg *CDKN2A* mutáció 10/114 (9%) daganatminta esetében igazolódott.

Ezen négy „hegycsúcsnak” is nevezett gén mutációja illetve azok együttes előfordulása a betegminták és sejtvonalak esetében a 18. ábrán látható.

Az in vitro vizsgálatokhoz három általánosan használt sejtvonalat alkalmaztunk: MiaPaCa2, Panc1 és BxPC3. A rajtuk elvégzett új-generációs szekvenálási reakció eredményeként a következő mutációkat igazoltuk: MiaPaCa2 (homozigóta mutáció KRAS G12C, p53 R248W, NOTCH1 L2457V), Panc1 (homozigóta mutáció a p53 R273H és heterozigóta mutáció KRAS G12D), BxPC3 (homozigóta mutáció p53 Y220C és KDR Q472H). A főbb drivereket érintő mutációs mintázat alapján a használt sejtvonalak a vizsgált betegek 44,4%-át (51/114) reprezentálják (18. ábra).

Fontos megjegyezni, hogy a BxPC3 sejtvonal esetén is kimutatott KDR Q472H mutációt további 42/114 esetben megtaláltuk a tumoros mintákban is. Emellett megemlítendő, hogy a MiaPaCa2 sejtvonalban jelen lévő NOTCH1 mutáció nem funkcionális fehérjerészt érint és ezidáig nem igazolták semmilyen hatását a fehérje aktivitására, míg a KDR fehérjében talált Q472H mutációt korábban megfigyelték melanómás betegek tumormintáiban, ahol csíravonalbelinek bizonyult és emelkedett KDR foszforilációval társult.



18. ábra: Hasnyálmirigy daganatok és sejtvonalak új-generációs szekvenálási adatai: A kódoló régióban előforduló (misszenz, nonszenz, kereteltolódásos) mutációk a vizsgált 50 gén esetében (sorok), a minták (oszlopok, N=114) jelölésükkel reprezentálják a mutációk együttes előfordulását. A csíravonalbeli mutációkat eltérő színnel jelöltük. Piros kerettel jelöltük a COSMIC adatbázis alapján legjelentősebb négy gént, melyet a daganatsejtekkel való összehasonlításban figyelembe vettünk.

5.2.2 A sejtvonalak KRAS mutációja és MEK-inhibítor érzékenysége közötti összefüggés

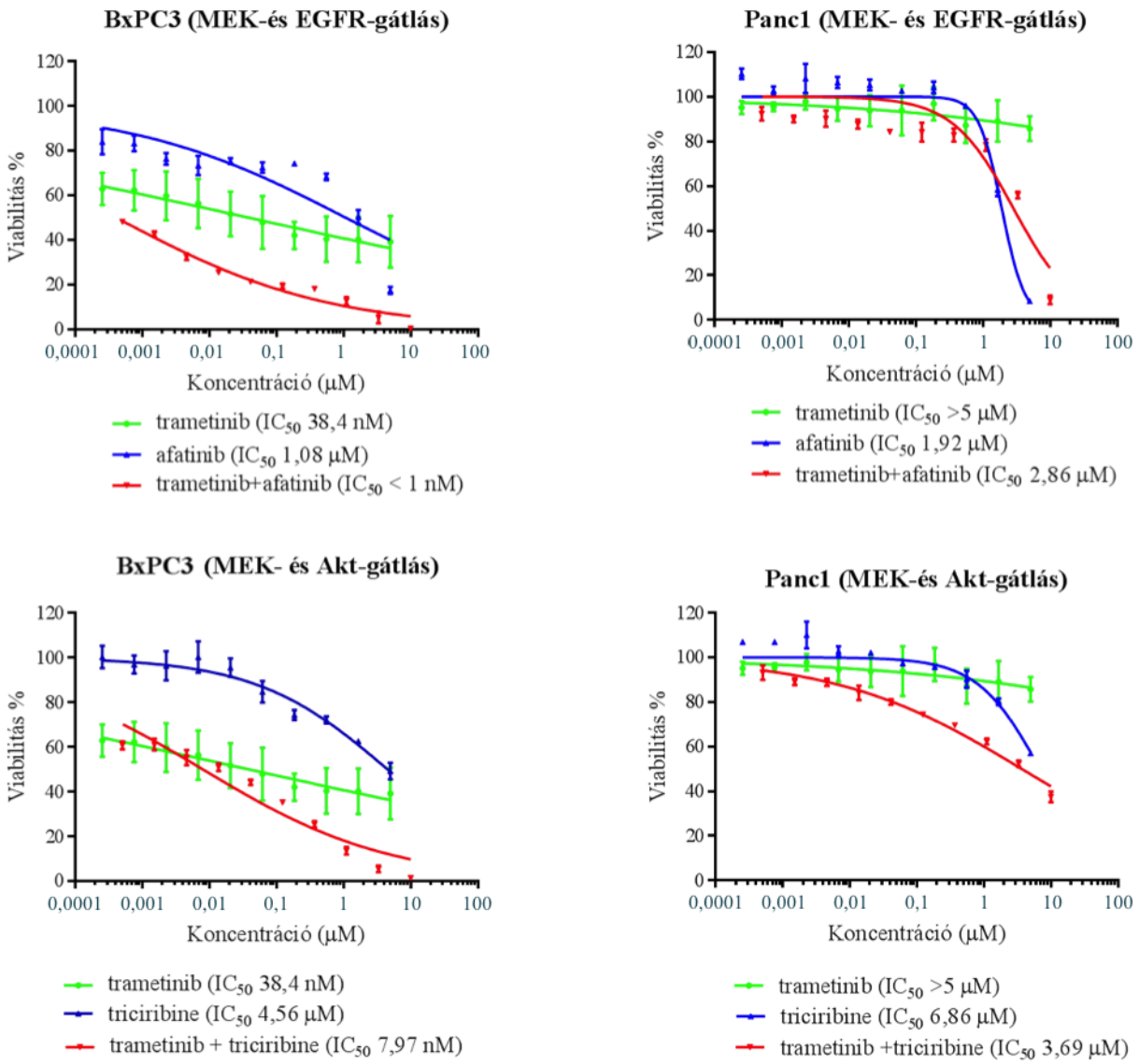
Megvizsgáltuk négy, elterjedten használt MEK-inhibítor gátló hatását a három karakterizált sejtvonalon. In vitro modellünkben a MiaPaCa2 sejtvonal kiemelkedően nagy érzékenységet mutatott a MEK-gátlószerekkel szemben, viszont a Panc1 sejtvonalon mindegyik hatástalannak bizonyult. A BxPC3 sejtvonalon a

kezelőszereknek a MiaPaCa2 sejtvonalnál tapasztaltnál valamivel gyengébb hatása volt. A legalacsonyabb IC_{50} koncentrációt akkor tapasztaltuk, mikor a sejteket trametinib MEK-inhibítorral inkubáltuk (18. táblázat). A MiaPaCa2 sejtvonalon tehát a trametinib már monoterápiában is erősen daganatellenes, akár klinikumban alkalmazható hatást produkál.

A jobb hatás, klinikumban is alkalmazható terápiás dózis elérése és a toxicitás esetleges csökkentése érdekében a legjobb hatásfokú trametinibet a BxPC3 és Panc1 sejtvonalakon EGFR-inhibítorral kombináltuk. Mivel in vitro körülmények között az afatinib dózisa in vitro jobban tolerálhatóbbnak bizonyul, mint az FDA által hasnyálmirigy daganatok esetén törzskönyvezett erlotinib (18. táblázat), így ezt alkalmaztuk a trametinibbel kombinációban. A dózisredukció mellett szinergista hatást értünk el a KRAS vad típusú BxPC3 sejtvonalon, míg a Panc1 esetében csupán additív volt a két kezelőszer együttes hatása (19. táblázat). Emellett megvizsgáltuk a trametinib hatását triciribine Akt-inhibítorral kombinálva is (19. ábra). A két kezelőszer együttes alkalmazása mind a BxPC3, mind a Panc1 sejtvonalon szinergista hatást ért el. Azonban a Panc1 sejtvonal esetében a szinergista hatás ellenére sem sikerült in vivo tolerálható kezelőszer koncentrációt elérni.

18. táblázat: A vizsgált hasnyálmirigy daganatos sejtvonalak inhibítor érzékenysége életképesség vizsgálatuk alapján: IC_{50} étrékek MEK-, EGFR-, és Akt –inhibítorokra vonatkozóan MiaPaCa2, BxPC3 és Panc1 sejtvonalakon.

	MiaPaCa2	**BxPC3**	**Panc1**
MEK-inhibítorok			
PD0325901	30 nM	380 nM	>5 μM
selumetinib	130 nM	1270 nM	>5 μM
refametinib	140 nM	830 nM	>5 μM
trametinib	<0,3 nM	38 nM	>5 μM
EGFR (HER-család)-inhibítorok			
erlotinib	>10 μM	2,24 μM	>10 μM
afatinib	1,19 μM	1,03 μM	1,92 μM
Akt-inhibítorok			
triciribine	8,83 μM	4,56 μM	6,9 μM



19. ábra: Hasnyálmirigy daganatos sejtvonalak inhibítor érzékenysége: IC_{50} görbék MEK-inhibítor (trametinib), Akt-inhibítor (triciribine) és EGFR-inhibítor (afatinib) monoterápiás illetve MEK+Akt (1:1)-/ MEK+EGFR (1:1) -inhibítor kombinációs kezelés esetén BxPC3 és Panc1 sejtvonalakon, a görbék GraphPad Prism version 7.00 for Mac (La Jolla, CA, USA) szoftver felhasználásával készültek.

19. táblázat: Szinergizmus igazolása kombinációs kezelések esetében: A különböző, 1:1 arányban alkalmazott gyógyszerkombináció IC_{50} koncentrációja BxPC3 és Panc1 sejtvonalakon, illetve Compusyn programmal megállapított kombinációs index értékek ugyanazon gyógyszerkombinációk esetében.

IC_{50} koncentráció		*afatinib*	*triciribine*
trametinib	***BxPC3***	<1 nM	7,97 nM
	Panc1	2,86 µM	3,69 µM

Kombinációs index (CI)		*afatinib*	*triciribine*
trametinib	***BxPC3***	0,11	0,59
	Panc1	0,79	0,23

5.2.3 A hasnyálmirigy daganatos sejtvonalak tirozin-kináz inhibítor érzékenysége molekuláris altípustól függő

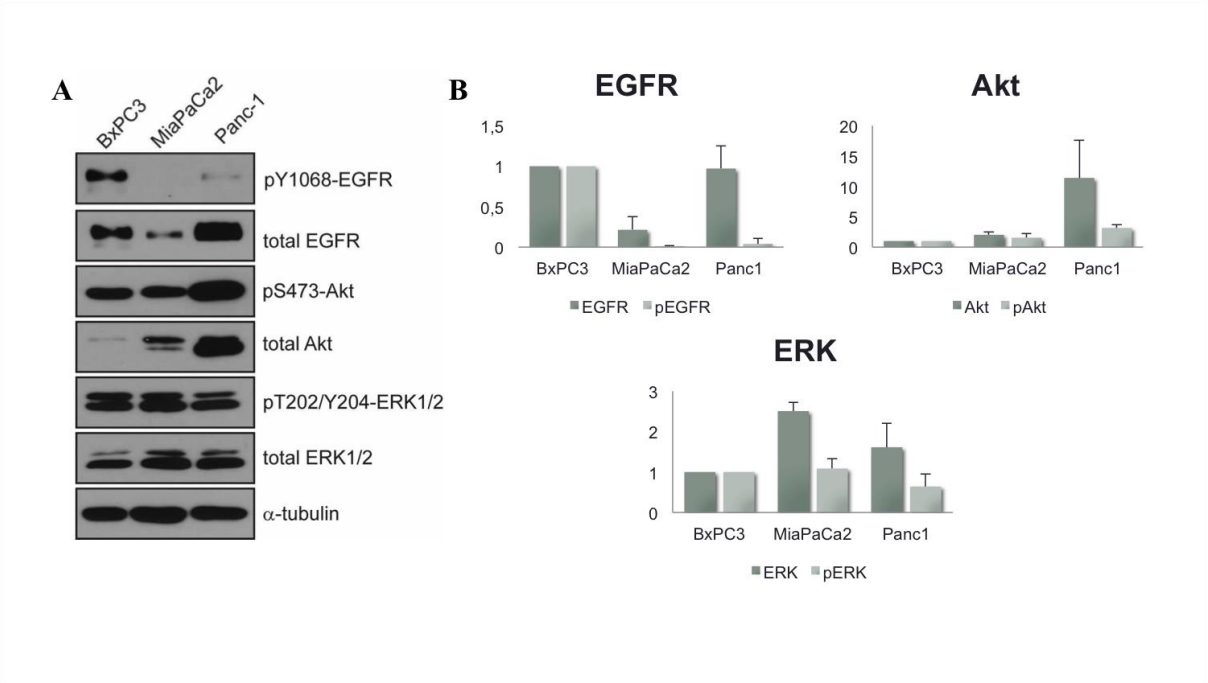
Western blot analízissel elvégeztük a három sejtvonal fehérjeexpressziós és foszforilációs vizsgálatát EGFR/pTyr1068EGFR, Akt/pSer473Akt és ERK/ pThr202/pTyr204 ERK1/2 proteinekre vonatkozóan (20. ábra). A Panc1 és BxPC3 sejtvonalak rendelkeztek a legkiemelkedőbb EGFR expresszióval, azonban csupán a BxPC3 sejtvonal esetén volt kimutatható számottevő aktiváció is. A MiaPaCa2 sejtvonal rendkívül alacsony EGFR-fehérjeszintet mutatott a többi sejtvonalhoz viszonyítva. A Panc1 sejtvonal esetében az Akt fehérje expressziója mellett foszforilációja is jelentősnek bizonyult. Az ERK aktivitás legalacsonyabbnak a G12D mutáns Panc1 sejtvonal esetében mutatkozott.

A KRAS G12D mutációja esetén tüdőrákos és vastagbél sejtvonalakban szakirodalmi adatok alapján a PI3K/Akt jelpálya aktivitásbeli növekedése jelentősebb, mint a MEK/ERK jelátviteli útvonalé. G12C mutáció esetében épp fordítva, a MEK/ERK jelpálya aktivitása a számottevőbb. Vad típusú gén esetén a két jelpálya jelentősége közel azonos [164, 165]. Ezt a megfigyelést tükrözi és alátámasztja az általunk használt hasnyálmirigy daganatos sejtvonalak jelátviteli aktivitása is.

A MiaPaCa2 sejtvonal genetikai háttere szerencsés mutációs és expressziós együttest hordoz. A KRAS G12C mutáció főként a MEK/ERK jelpályát aktiválja és az extrém alacsony EGFR expresszió és aktiváció elhanyagolható visszacsatolásos Akt aktivációhoz vezet a trametinib kezelést követően. Így esetében a trametinib monoterápia elegendő.

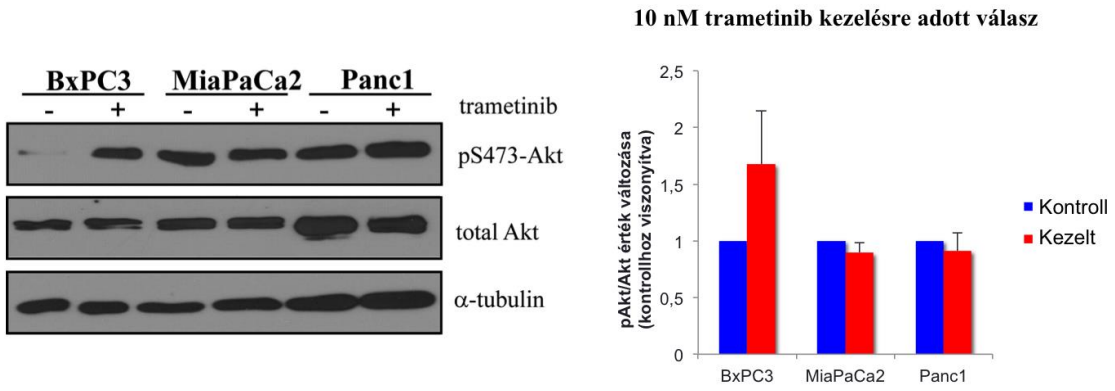
A Panc1 sejtvonal esetében a PI3K/Akt jelpálya jelentős aktivitásával érthetővé válik, hogy ebben az esetben a trametinib egyedül a triciribine Akt-inhibítorral együttesen alkalmazva ér el szinergista hatást.

A BxPC3 sejtvonal nem hordoz KRAS mutációt. Esetében a MEK/ERK és PI3K/Akt jelpálya hasonlóan fontos, de kiemelkedő EGFR aktivitása miatt a MEK-ERK-EGFR negatív visszacsatolási kör fontos szerephez jut. Így a MEK-gátló trametinib alkalmazásakor az EGFR foszforilációja megnő, átterelve a jelátviteli folyamatot a EGFR-PI3K-Akt jelpályára. Ebben az esetben tehát mindkét kombinációval dózisredukció érhető el.



20. ábra: Protein expressziós és foszforilációs analízis hasnyálmirigy daganatos sejtvonalakon: A) EGFR és pY1068 EGRF, Akt és pS473 Akt, ERK1/2 és pT202/pY204 ERK analízise SDS-page/Western blot módszerrel. (B) A fehérje expresszió és foszforiláció szintje a KRAS vad típusú BxPC3 sejtvonalhoz viszonyítva. Az összes fehérje mennyiség kontrolljaként α-tubulint alkalmaztunk. A grafikonokon legalább három független kísérlet eredményének átlagai láthatók.

Ezt követően megvizsgáltuk a trametinib kezelőszer EGFR-Akt útvonalra gyakorolt hatását a feltételezett visszacsatolási mechanizmuson keresztül (21. ábra). Hipotézisünkkel egybecsengő módon a MiaPaCa2 sejtvonal esetében nem találtunk változást az Akt fehérje aktivitásában a kontroll mintához képest. Ezzel szemben az aktív EGFR fehérjét túltermelő BxPC3 sejtvonal kiemelkedően magas Akt aktivációval reagált ugyanezen kezelésre. A Panc1 sejtvonal Akt aktivitása a kezelt és kontrol mintákban egyaránt jelentős volt, ami a kezelés hatására nem változott. Ez az eredmény egybecseng azzal a megfigyelésünkkel, hogy egyedül a MiaPaCa2 sejtvonal volt érzékeny trametinib MEK-inhibítor monoterápiára.



21. ábra: Hasnyálmirigy daganatos sejtvonalak válasza trametinib kezelésre: Totál-Akt és Akt aktivációs szint (pS473) Western blot analízissel vizsgálva. Az összes fehérje mennyiség kontrolljaként α-tubulint alkalmaztunk.

6 Megbeszélés

6.1 Precíziós medicina: Molekuláris marker alapú kezelés jelentősége az onkológiában

6.1.1 Génkópiaszám változások szerepe a daganatok prognózisában és kezelésében (*MET* és *PIK3CA*)

Régóta ismert, hogy a MET receptor tirozin-kináz fehérje fontos szerepet játszik a daganatsejtek osztódásában, túlélésében, mozgásában és inváziójában. Szerepe több tumortípus, többek között a fej-nyaki daganatok patogenezisében is felmerül, így potenciális terápiás célpont lehet [166]. Seiwert és munkatársai immunhisztokémiával jelentős MET expressziót mutattak ki a fej-nyaki daganatok 85%-ában, míg qPCR módszerrel magas génkópiaszámot (4-10 kópia/sejt) a tumorok 65%-ában találtak [167]. Emellett a MET fehérjének jelentőséget tulajdonítanak fej-nyaki tumorok őssejt-szerű daganatsejtjeinek szaporodásában is [168].

A *MET* génamplifikáció lehetséges prediktív biomarkere a crizotinib ALK/ROS-1/MET tirozin-kináz inhibítor terápia sikerének, mely újabb bizonyítéka annak, hogy a MET fehérjének vezető, irányító (driver) szerepe van számos daganat kifejlődésében [169]. Emellett nem-kissejtes tüdőrákok másodlagosan kialakult EGFR-gátlószerrel, gefitinibbel szembeni rezisztenciája kialakulhat a *MET* gén amplifikációján és ezáltal új domináns jelátviteli útvonal aktivációján keresztül is [115]. A MET aktiváció szerepe az EGFR-ellenes kezelésre már meglévő, elsődleges rezisztenciában csak igen magas (sejtenként 12 feletti) kópiaszám esetén jöhet szóba [114, 170]. Turke és munkatársai ugyanakkor már a kiinduláskor is jelen lévő *MET*-amplifikált klónokat mutattak ki azokban a daganatokban, amelyekben később, a terápia során alakult ki az EGFR-inhibítorral szembeni érzéketlenség. Ez utóbbi bizonyíték lehet a kezelés hatására kialakuló klonális szelekcióra, mely során az inhibítor érzéketlen, *MET*-amplifikált daganatsejtek felszaporodnak a tumorban, így az ismételten növekedésnek indulhat [171].

Vizsgálatunk során egyik betegmintában sem találtunk kromoszómán belüli *MET* amplifikációt. Ez az eredmény ellentmond a korábban szájüregi rákokban találtaknak

[172]. Összefüggést mutattunk ki viszont az alacsony és magas kópiaszám (kópiaszám növekedés) és a betegség kedvezőtlenebb kimenetele között. Ez az eredmény egybecseng az Ach és munkatársai által közöltekkel, ahol hasonló összefüggést igazoltak nyálmirigy daganatokban [173]. Ezek az esetek qPCR módszerrel nem lettek volna detektálhatók vagy helytelen módon az amplifikált kategóriába sorolták volna őket. A FISH módszert gyakran éri kritika szubjektivitása miatt, mivel a kiértékelés mikroszkóppal történik, azonban a qPCR módszerrel ellentétben a FISH képes a tumoron belüli heterogenitás észlelésére. Ez utóbbi tulajdonsága pedig képessé teszi arra, hogy kisebb, eltérő génstátusszal rendelkező sejtpopulációkat is ki tudjon mutatni.

A PIK3CA a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát 3-kináz (PI3K) katalitikus p100α alegységét kódolja, mely az egyik leggyakrabban mutálódó és gyakran felsokszorozódó onkogén többek között a fej-nyaki daganatokban is [174]. Különféle tumorok vizsgálata alapján kijelenthető, hogy a *PIK3CA* génben előforduló pontmutációnak nincs befolyása a túlélésre [175], de jobban előrejelzi a PI3K-inhibítorok kedvező hatását, mint az amplifikáció [122]. A szakirodalom szerint a PIK3CA mutációval rendelkező daganatok kevésbé érzékenyek az EGFR-gátló kezelésre [124, 125], azonban az amplifikáció szerepe ezen a téren még nem tisztázott. A kiértékelésre és kategorizálásra vonatkozó algoritmus a *PIK3CA* esetében még nem olyan kiforrott és pontosan definiált a szakirodalomban, mint a HER-2 vagy EGFR gének esetében. A leggyakrabban alkalmazott módszer ebben az esetben is a qPCR, mely önmagában nem képes a poliszómia és valódi amplifikáció elkülönítésére.

Korábban összefüggést mutattak ki a *PIK3CA* amplifikáció és a nyirokcsomó metasztázis megléte (N) és a daganat kiterjedése (T paraméter) között, azonban ez a tanulmány csupán 33 fej-nyaki daganatos beteg vizsgálatát tartalmazta [176]. Suda és munkatársai kimutatták, hogy a qPCR módszerrel megállapított *PIK3CA* kópiaszám emelkedés nyirokcsomó metasztázissal nem rendelkező fej-nyaki daganatos betegeknél kapcsolatban áll a tumor korai kiújulásával [177]. Az általunk végzett kutatásban nem csupán az amplifikált esetekben, de a magas poliszómiával rendelkező tumoroknál is kedvezőtlenebb túlélést tapasztaltunk.

Szignifikáns összefüggést találtunk a daganat kiterjedése (T paraméter) és a *PIK3CA* génkópiaszám között, azonban ugyanezt az összefüggést a nyirokcsomó metasztázist vagy távoli metasztázist illetően nem igazoltuk. Az előbbi megfigyelés tulajdonítható

annak is, hogy a 3q kromoszómális régió felsokszorozódása a daganat progressziójának egy késői eseménye [178]. Nem találtunk összefüggést a négy főbb elhelyezkedést illetően a daganat lokalizációja és a *PIK3CA* gén kópiaszámának emelkedése között, azonban meg kell említenünk, hogy az algarati régióban bár nem szignifikánsan (p=0,09), de határozottan gyakrabban fordult elő. Mivel munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a többi elhelyezkedéssel összehasonlítva ezen régió daganatainak van a legrosszabb prognózisa [71], így az algarati régióban kimutatható lehetséges célpontok jelentős változást hozhatnak a fej-nyaki daganatok prognózisában. A gége daganatai esetén a glottikus alrégióban viszont szignifikánsan kevesebb *PIK3CA* kópiaszám emelkedést találtunk, amely alátámasztja a munkacsoportunk által korábban igazolt expresszióbeli elkülönülését és lehetséges magyarázat a daganat többi régióhoz képest jobb prognózisára [71].

Az EGFR fehérje túltermelődése a fej-nyaki daganatok közel 90%-ában megfigyelhető, azonban a cetuximab kezelésre adott pozitív válasz mindössze 10-13%-os. Az emelkedett EGFR-expresszió prognosztikus jelentőségét korábban igazolták ezen tumortípus esetében [75]. Kutatásunk során szignifikáns, fordított összefüggést igazoltunk a *MET* CNG és magas EGFR-expresszió között. Ez a megfigyelés többek között azért is érdekes, mivel a *MET* és *EGFR* gének egyaránt a 7-es kromoszómán (bár más karján) helyezkednek el. A jelenség magyarázatára három lehetséges indoklást találtunk:

(1) A UCCC kritériumrendszer a génspecifikus jeleket veszi figyelembe kategóriák felállításában, emiatt a poliszómiás esetekben lehetséges, hogy a sejtben a kromoszóma specifikus jelek száma a génre specifikusakénál alacsonyabb volt.

(2) Az EGFR FISH és IHC eredmény nem mindig egybecsengő. Bár néhány tanulmány igazolt közöttük összefüggést [75], mások nem tudták alátámasztani ezt a megfigyelést [179]. Tehát a kérdés továbbra is nyitott, lehetséges, hogy az emelkedett EGFR expressziót a kópiaszám változáson túl egyéb szabályozó mechanizmusok is alakítják.

(3) Végül, bár a *MET* esetében már 10%-os poliszómia is fontosnak bizonyult, a magas EGFR expresszióval rendelkező minták esetében a tumorsejtek 80%-a esetén intenzív immunreakciót találtunk.

Az EGFR-expresszió és *MET* CNG között talált fordított összefüggést okozhatja a daganat MET onkogén dependenciája is, mely negatív visszacsatolás révén csökkenti az

EGFR útvonal jelentőségét a patogenezisben. Ez a megfigyelés további bizonyítékot jelenthet a MET szerepére a klinikopatológiai tulajdonságok kialakításában a *MET* CNG-vel rendelkező alcsoportban.

A p16^{INK4}-fehérje expressziója gyakran használt közvetett jelzője a HPV-fertőzésnek. Fej-nyaki daganatokban közel 100%-os szenzitivitással és 80-85%-os specificitással bír [180]. Munkánk során fordított összefüggést igazoltunk a p16^{INK4}-expresszió és a *PIK3CA* CNG között, ami fontosabb szerepet tulajdoníthat a *PIK3CA* CNG-nek p16^{INK4}-negatív/ HPV-negatív daganatokban. A TCGA nemrég publikált adatai alapján a 3q26/28 régió – amely a *PIK3CA* gént is tartalmazza – kópiaszám emelkedése gyakori volt a dohányzással összefüggő fej-nyaki tumorokban. Ezen túl mindössze két *MET* amplifikációval rendelkező daganatot találtak, de minkét esetben kimutatható volt a dohányzás, mint kiváltó tényező. Kutatásunk során bár nem találtunk szignifikáns összefüggést a p16^{INK4}-expressziós és a *MET* CNG között, azonban elmondható, hogy a p16^{INK4} -negatívak között nagyobb arányban fordultak elő. Meg kell említeni azonban, hogy a TCGA adatbázisában leginkább szájüregi és gége daganatok találhatók, csupán kevés a szájgarati és algarati régióból [52].

A Ki-67 a sejtosztódás szokásos markere. A proliferáció összefügg a daganat agresszív viselkedésével és terápiára adott válaszával [71]. Bár a *MET* és *PIK3CA* egyaránt fontos szabályozói a sejtosztódásnak, mégsem figyeltünk meg összefüggést CNG-jük és a Ki-67 expresszió között.

6.1.2 p16^{INK4}-expresszió és HPV-pozitivitás magyar betegek fej-nyaki daganataiban

Számtalan publikáció számol be a humán papillomavírus növekvő prevalenciájáról fej-nyaki daganatokban. Chaturvedi és munkatársai növekvő incidenciát mutattak ki a nők szájgarati, szájüregi és tüdő daganata esetében, míg a fiatal férfiak körében egyedül a szájgarati régió daganatait érintette ez a tendencia [181]. Ez az eredmény is alátámasztja a HPV-fertőzés hatását a szájgarati daganatok növekvő előfordulására. A Castellsagué és munkatársai által közölt adatok alapján a HPV pozitivitás aránya 24,3%-os a szájgarati régióban HPV-DNS/p16^{INK4}-expressziós kettős teszt alkalmazásával vizsgálva [182]. Kutatásunk során 21,4%-os HPV-pozitivitást mutattunk ki az szájgarat daganatai között p16^{INK4} IHC/HPV DNS PCR együttes alkalmazásával. A többi

lokalizációt illetően nem találtunk mindkét módszerrel pozitív kategóriába sorolható daganatot.

Habár továbbra sincs megegyezés a szakemberek között, hogy mely módszerrel történjen a HPV kimutatása [183, 184], Sache és munkatársai az alkalmazott nyolc lehetséges módszer illetve módszer kombináció közül a legmagasabb specificitást és szenzitivitást a p16^{INK4} IHC és HPV DNS PCR együttes alkalmazásával tudta elérni [185]. Munkánk során a két javasolt módszert egyidejűleg alkalmazva igen magas arányban mutattunk ki p16^{INK4}-pozitív/HPV-negatív daganatokat. Ez megmagyarázható egyrészt a retinoblastoma (pRb) jelpálya érintettségével a dohányzó betegekben, másrészt nem vizsgált HPV-törzsek szerepével a karcinogenezisben.

A p16^{INK4}- és HPV DNS-pozitív esetekben egyaránt szignifikánsan jobb prognózist mutattunk ki, mint a p16^{INK4}-negatív és HPV DNS-negatív csoportban. Már mások is megfigyelték az indukciós kemoterápia és kemoradioterápia nagyobb hatásfokát HPV-pozitív betegekben [186]. Figyelembe véve a sebészi beavatkozás és a kemoradioterápia jelentős mellékhatásai mellett a HPV-asszociált tumorral rendelkező betegek fiatalabb életkorát, rengeteg klinikai vizsgálat irányul a terápia intenzitásának lehetőség szerinti csökkentésére és a toxicitás mérséklésére. Ang és munkatársai a szájgarati daganatokat alacsony, közepes, magas rizikójú csoportokba sorolták HPV-státuszuk, dohányzási szokásaik, a daganatstádium és nyirokcsomó státusz alapján [63]. O'Sullivan és munkatársai kockázatbecslő rendszer használatát ajánlják a HPV-státuszt figyelembe véve [187]. Ezek a klasszifikációs ajánlások segíthetnek, a terápia intenzitásának csökkentésében anélkül, hogy veszélyeztetnénk a pozitív klinikai kimenetelt. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a p16^{INK4}-pozitivitás pontosabban elkülönítette a prognosztikus csoportokat, mint a p16^{INK4}/HPV DNS PCR kettős pozitivitás. Bár dolgozatomnak nem képezi részét ezen markerek prediktív szerepének vizsgálata, összegzésként el kell mondanom, hogy mind a p16^{INK4}-pozitív, mind a p16^{INK4}/HPV DNS PCR kettős pozitív daganatoknak kedvezőbb volt a neoadjuváns kemoterápiára adott válasza.

A dohányzás és az alkoholfogyasztás a fej-nyaki daganatok ismert kockázati tényezője. Ng és munkatársai publikációjukban a dohányzási szokások mérséklődését mutatták ki. A népesség növekedésével a dohányzók abszolút száma azonban továbbra is szignifikánsan emelkedik [188]. Ebből fakadóan a dohányzás továbbra is fontos

daganatkeltő ágensnek számít. Korábbi közleményünkben a magyarországi fej-nyaki daganatos és egészséges egyének dohányzási szokásait vizsgáltuk, mely során azt tapasztaltuk, hogy a fej-nyaki daganatosok 88%-a dohányzott, míg az egészségesek esetén ez az arány 54%-nak bizonyult [189]. Ezek a megfigyelések alátámasztják, hogy a dohányzás, mint rákkeltő tényező hatásával továbbra is számolnunk kell. A fej-nyaki daganatok heterogén etiológiája miatt pedig figyelembe kell vennünk annak a lehetőségét, hogy a HPV patogén hatása és a dohányzás vagy alkoholfogyasztás hatása egyidejűleg áll fenn. Munkánk során azt figyeltük meg, hogy a dohányzás gyakoribb volt a HPV-negatív betegek esetében, de a HPV-hez köthető daganattal rendelkező betegek esetében is 44,4%-volt ezen káros szenvedély előfordulási gyakorisága. Utóbbi esetben számolnunk kell mindkét tényező hatásával. Érdekes módon a $p16^{INK4}$-pozitív/HPV DNS PCR-negatív betegek 93%-ának anamnézisében fordult elő a dohányzás, ami alátámasztja a dohányzás pRb jelátviteli útvonalra kifejtett, feltételezett mutagén hatását.

A TCGA legfrissebb adatai alapján szignifikáns eltérés van a HPV-negatív és HPV-pozitív daganatok molekuláris hátterében [52]. Ezt támaszthatja alá az a kutatási eredményünk is, hogy a *PIK3CA* génkópiaszám és $p16^{INK4}$-expresszió között szignifikáns összefüggés áll fenn. Ezek a különbségek a mutációkban vagy strukturális eltérésekben lehetővé teszik számunkra, hogy a fej-nyaki daganatokon belül molekuláris alapon alcsoportokat hozhassunk létre. Eredményeink hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a klinikai vizsgálatokba célzottan bevont, előszelektált populációt pontosabban behatárolhassuk és segítenek a legmegfelelőbb, leghatásosabb terápiás lehetőség kiválasztásában.

További, több intézet bevonásával történő, nagy esetszámmal végzett vizsgálatok szükségesek, hogy validáljuk a $p16^{INK4}$ fehérjeszint független prognosztikai értékét, és bevezethetővé váljon a mindennapi klinikai gyakorlatba.

6.1.3 Progressziós markerek potenciális változása a daganat kezelése során – connexin 43

A connexin 43 egy régóta vizsgált sejtkapcsoló struktúra, melynek expressziója összefüggést mutat egyes daganatok prognózisával, progressziójával [80, 81]. Korábbi publikációnkban összefüggést találtunk a connexin 43 fehérje expressziója és a fej-

nyaki daganatok prognózisa között. Az alacsonyabb expresszióval rendelkező daganatok esetében szignifikánsan rosszabb volt a betegség kimenetele. [82]

Fej-nyaki daganatos sejtvonalon végzett Western blot vizsgálatunk során már 6 órás afatinib kezelés hatására (a connexin 43 kihelyeződési ciklusa igen rövid, 5 óra körüli) megfigyeltük a P1 és P2 foszforilációs helyekre specifikus csíkok eltűnését. Balla és munkatársai az általunk alkalmazottal (Cell Signaling, katalógusszám: 3512) azonos antitestet használtak, és a gyártó információja illetve PhosphocytePlus adatbázis (www.phosphosite.org) alapján úgy találták, hogy antitestünk a Ser369, Ser372 és Ser373 foszforilációs helyeket ismeri fel [85]. Ezek a foszforilációs helyek az Akt-fehérje ismert szubsztrátjai és defoszforilált állapotban a csatorna működése gátolt, míg foszforilált állapotban a csatorna nyitását, membránba helyeződését eredményezik [85, 86].

Immuncitokémiai vizsgálatunk során afatinib kezelés hatására a connexin 43 specifikus plakkok eltűnését figyeltük meg a sejtmembránból. A dasatinib kezelés hatására nem találtunk változást sem Western blot vizsgálattal, sem fluoreszcens mikroszkópiával a kontroll mintához képest. Mivel a felismert foszforilációs helyek módosítása az Akt-fehérje aktivitásához köthető, és az afatinib kezelés hatására (a dasatinib kezeléssel szemben) az Akt S473 foszforiláció csökkent, feltételezhetően ez a mechanizmus vezetett a megfigyelt változáshoz. A jelenség mechanizmusának pontos tisztázása és szerepe a daganat biológiájának, progressziójának változásában további kísérleteket igényel.

Ugyanitt meg kell jegyeznünk, hogy a 2., fej-nyaki daganatos kohorsz vizsgálata során néhány esetben rendelkezésünkre állt a kezelés előtti állapotból és utána a kiújult daganatból is archivált szövetminta. Bár az esetszám nem reprezentatív, elmondható, hogy a standard kezelést követően (paclitaxel, cisplatin, 5-FU) nagyobb arányban találtunk a kiújult daganatban csökkent connexin 43 kifejeződést a sejtmembránban. Bár a hosszú távú kemoterápia hatását nem vizsgáltuk sejtvonalakon, a klinikai mintákon észlelt változás további irányt ad a kutatásunknak. Ugyanis ez a tendencia vélhetőleg a terápia hatására alakul ki, így további, nagyobb esetszámon történő vizsgálatot tervezünk a terápia és a connexin 43 expresszió/foszforiláció kapcsolatának tényleges bizonyítására.

6.2 Transzlációs medicina: Daganat sejtmodellek használata a rákkutatásban

6.2.1 Célzott terápiás ágensek eltérő hatásának lehetséges okai fej-nyaki daganatokban

Fej-nyaki daganatok esetében a célzott terápiás lehetőségek igen korlátozottak, továbbra is intenzív kutatás folyik a lehetséges kezelőszerek, megfelelő molekuláris markerek és terápiát előrejelző hatásuk tisztázására.

Az agresszív viselkedésű fej-nyaki daganatokban gyakran aktiválódó Src fehérje ideális célpontnak tűnhet [127], azonban gátlószere a dasatinib hatástalannak bizonyult a klinikai vizsgálatokban [128]. Mivel az erősen aktív Src-vel rendelkező daganatokban EGFR-gátlószerrel szemben rezisztenciát figyeltek meg [129], felmerült a két útvonal együttes gátlása (erlotinib+dasatinib), azonban ez a próbálkozás is kudarcba fulladt [130].

Az általunk vizsgált sejtvonalak esetében a Detroit 562 MET overexpresszáló és magas alapaktivitású sejtvonal érzékeny volt a dasatinib kezelésre, míg a FaDu sejtvonal domináns HER-fehérjecsalád aktivitással, azonban jelentéktelen MET aktivitással rezisztenciát mutatott a kezelőszerrel szemben. Erre a jelenségre magyarázatot adhat az a kutatási eredmény, mely szerint a MET fehérje az Src szubsztrátja és gyakran HGF-independens módon képes a receptor ativitásának fenntartására [190]. A MET-domináns sejtvonal esetében ez a mechanizmus vezethetett alacsony dasatinib dózisban is jelentős életképesség csökkenéshez. A FaDu sejtvonal esetében dasatinib kezelés hatására tapasztalt EGFR aktiváció (melyet a Detroit 562-nél nem sikerült igazolnunk) pedig a jelátviteli útvonalak átrendeződésének eredménye lehet a MET inaktiváció hatására. Ez az eltolódás („pathway shift”) gyakran megfigyelhető a két útvonal gátlószerei esetében. EGFR-gátlásnál a MET, míg MET-gátlás esetén az EGFR aktivitásának növekedése vezet a daganat „megmeneküléséhez” [114, 170, 191-193]. A FaDu sejtvonalnál a dasatinib és afatinib (pan-HER gátlószer) együttes alkalmazása jelentős dózisredukciót eredményezett.

A pontos mechanizmus és a MET szerepének tényleges igazolása további kutatást igényel.

6.2.2 Terápiás válasz előrejelzése eltérő molekuláris altípusba sorolt hasnyálmirigy daganatok esetében

Kutatásunk során 138 hasnyálmirigy daganatos beteg új-generációs és Sanger szekvenálási adatát elemeztük. A daganatokban található mutációk előfordulási gyakorisága a COSMIC (cancer.sanger.ac.uk) adatbázisban fellelhetővel közel azonos volt [53]. A KRAS és TP53 mutációk gyakran fordultak elő együttesen a daganatokban, míg a CDKN2A és SMAD4 elváltozásai ritkábban társultak hozzájuk. Mindössze egy olyan esetet figyeltünk meg, ahol a négy gén mutációja együtt volt jelen. Érdekes módon a daganatok közel 40%-ában jelen volt a KDR Q472H mutációja, melyet melanómákban, nem-kissejtes tüdőrákban és Ewing szarkómában csíravonali mutációként azonosítottak, és összefüggésbe hozták a receptor fokozott foszforilációjával és az érhálózat sűrűségével [194-196]. Ez a mutáció megfigyelhető volt a BxPC3 sejtvonalban is, de behatóbb vizsgálatától ezen kutatásom során eltekintettem.

A vizsgált sejtvonalak a KRAS mutációval rendelkező hasnyálmirigy daganatok genetikai sokféleségének a felét reprezentálták. Az NGS vizsgálataink alapján a leggyakoribb KRAS mutáció ezen daganattípus esetén a G12D. A G12C (1-2%) csere sokkal ritkább a kaukázusi népesség körében. Ez utóbbi mutáció vélhetőleg eltérő fenotípusban nyilvánul meg, mivel jelenlétében a NSCLC betegek szignifikánsan kedvezőtlenebb prognózissal rendelkeztek [197]. Érdekes módon a japán populációban a G12C mutáció sokkal gyakoribb: a hasnyálmirigy daganatok 63%-ában igazolták jelenlétét [198].

Bár úgy tűnik, hogy a kaukázusi populációban a G12C mutáció szerepe kevésbé fontos, azonban kiemelkedően rossz prognózisa és gyakori előfordulása más népcsoportok esetében fontos célponttá teszi hasnyálmirigy daganatok esetében is.

Emellett a COSMIC adatbázis alapján a G12C mutáció a KRAS leggyakoribb 12-es kodonbeli elváltozása tüdőrákokban (39%), és vastagbél daganatokban szintén gyakran megtalálható (10,3%) [53].

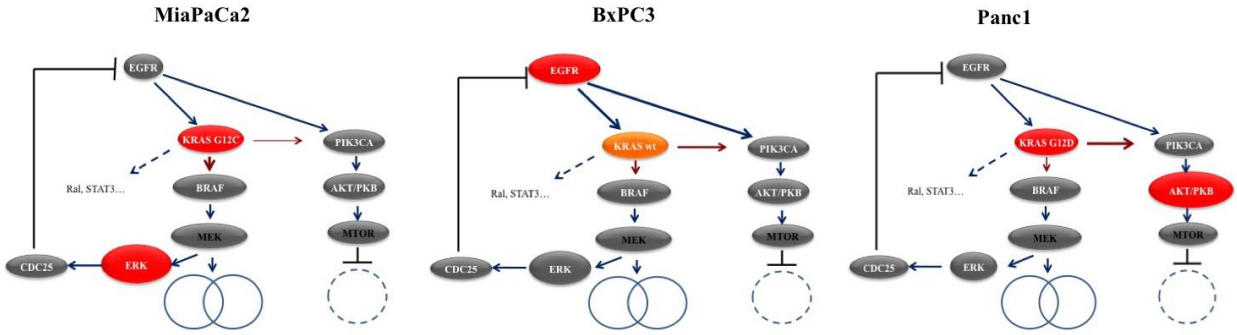
In vitro farmakológiai modellünkben négy MEK-gátlószer, két EGFR-inhibítor és egy Akt-gátló vegyület hatását vizsgáltuk. A kezelőszerek közül a MEK-gátlószerek, azokon belül is a trametinib hatása volt a legjelentősebb a MiaPaCa2 sejtvonalon.

Ebben az esetben szignifikáns növekedésgátlás tudtunk elérni pusztán MEK-inhibítor monoterápia alkalmazásával is. Ez az eredmény egybecseng a Pentazzoni és munkatársai által közölt adatokkal, miszerint a MiaPaCa2 setjvonal esetében az erlotinibbel való kombináció nem javított számottevően a monoterápia hatásán [149], azonban kutatásuk nem tért ki ezen jelenség molekuláris hátterére. Az erlotinib jelenleg az egyetlen FDA által hasnyálmirigy daganatokban engedélyezett célzott terápiás hatóanyag, azonban Walters és munkatársai kimutatták, hogy többek között a HER-2 receptor is fontos, gyakran túltermelődő protein ezen daganattípusban [199]. Nem meglepő tehát, hogy kísérleteinkben az afatinib pan-HER inhibítor in vitro minden esetben nagyobb hatást mutatott az EGFR-szelektív erlotinibnél, így a kombinációs kezelésekben ezt alkalmaztuk. Erős szinergista hatást mutattunk ki az afatinib + trametinib kombináció alkalmazásakor a KRAS vad típusú BxPC3 sejtvonalon, míg a trametinib Akt-inhibítorral (triciribine) történő együttes alkalmazása a BxPC3 és Panc1 sejtvonalakon egyaránt kedvezőbb gátló hatást eredményezett, szintén szinergista módon.

Egy vastagbél daganatos sejtmodellben Modest és munkatársai eltérő ERK aktivitást mutattak ki különböző KRAS mutációk jelenlétében [165]. Ihle és munkatársai a különféle KRAS mutációs altípusok esetében más-más jelátviteli útvonal aktiválódását figyelte meg [164]. Azt találták, hogy a G12C mutáns tüdődaganatos sejtvonalak inkább MEK, míg a G12D mutánsak inkább PI3K-inhibítorokra érzékenyek. Prahallad és munkatársai bizonyították vastagbél daganatokban, hogy BRAF-inhibítorok alkalmazásakor az EGFR visszacsatolással (a negatív visszacsatolás gátlásával) aktiválódik [148], melyhez hasonló mechanizmust igazoltak MEK-gátlók vizsgálata során hasnyálmirigy daganatokban [150]. Azt is feltárták, hogy az említett visszacsatolásnak igazán jelentős szerepe azokban a daganatokban van, ahol az EGFR túltermelődik [148]. Kutatásunk során a MiaPaCa2 sejtvonal bizonyult a legérzékenyebbnek MEK-gátlószerekkel szemben (kiemelkedően alacsony IC_{50} értéket mértünk a trametinib esetében), mely sejtvonalnak az igen alacsony EGFR termelés mellett KRAS G12C mutációja van. Bloomston és munkatársai a hasnyálmirigy adenokarcinómák 69%-a esetén figyeltek meg EGFR túltermelést, ami azt is jelenti, hogy a daganatok 31%-a a MiaPaCa2 sejtvonalhoz hasonlóan alacsonyabb EGFR expresszióval rendelkezik [141]. A BxPC3 és Panc1 sejtvonal MEK-inhibítorokkal

szemben tanúsított alacsonyabb érzékenysége szintén megmagyarázható eltérő KRAS mutációjukkal és EGFR expressziójukkal. A G12D mutáns Panc1 sejtvonal nagyobb Akt alapaktivitást mutatott, ami a G12D mutáns KRAS fehérje állandó indukciójának tudható be. Ebben az esetben tehát az EGFR-gátlószerrel való kombináció nem vezetett eredményre. A BxPC3 sejtvonal esetében a vad típusú KRAS egyenlően aktív, valószínűleg a magas EGFR aktivitástól függő MEK/ERK és PI3K/Akt útvonalakat eredményez. Ebben az esetben a visszacsatolási huroknak is nagyobb jelentősége van. A BxPC3 sejtvonalnál tehát mindkét kombináció (MEK+EGFR-gátlás, illetve MEK+Akt gátlás) szinergista gátló hatást ért el. Feltevésünk igazolására az Akt fehérje aktivitásának trametinib hatására bekövetkező változását vizsgáltuk meg. Az, hogy kizárólag a BxPC3 sejtvonal esetében találtunk aktivitás emelkedést MEK-gátlószer hatására, alátámasztja elméletünket.

A MEK és PI3K/Akt vagy EGFR gátlószerek (erlotinib, labatinib) kombinációjának szinergista hatását korábban több esetben leírták [149, 200, 201], illetve több klinikai vizsgálat folyik az említett kezelőszerek együttes alkalmazásával. Habár kutatásunk csupán három sejtvonalat vizsgált, a KRAS G12D és G12C mutáció, illetve EGFR protein expresszió meghatározó szerepét a MEK-gátlószerekkel szemben mutatott érzékenységben eddig még sosem írták le hasnyálmirigy daganatok esetében. In vitro farmakológiai modellünk és a sejtvonalak gátlószer érzékenységének összesítő eredményei a 22. ábrán láthatóak.



	KRAS	EGFR	Akt	Inhibítorok: MEK	MEK+EGFR	MEK+Akt
MiaPaCa2	G12C	↑	↑	+		
BxPC3	wt	↑↑↑	↑	-	+	+
Panc1	G12D	↑↑	↑↑↑	-	-	+

22. ábra: In vitro hasnyálmirigy daganat sejtmodell: Ez a modell az általunk mért protein expressziós és életképesség vizsgálaton alapul. A MiaPaCa2 sejtvonal KRAS G12C mutációval és alacsony EGFR expresszióval kiemelkedően nagy érzékenységet mutat trametinib monoterápiára. Gyógyszerkombináció alkalmazása nem szükséges, csupán a kezelés toxicitását növelné meg. A BxPC3 vad típusú KRAS fehérjéje és magas EGFR expressziója/foszforilációja miatt a trametinib hatására bekövetkező EGFR/PI3K/Akt aktiváció jelentős. Ebből kifolyólag a MEK-inhibítor EGFR- vagy Akt-gátlószerrel való kombinációja egyaránt jó választás, mivel mindkét esetben gyógyszer-szinergizmus mutatható ki. A Panc1 sejtvonal rezisztens a MEK-gátló kezelésre és az EGFR gátlókkal való kombináció sem csökkenti az IC_{50} értéket megfelelő szintre. Modellünk alapján a G12D mutáció (ami a PI3K/Akt útvonalat aktiválja) és az Akt-protein emelkedett expressziója egyaránt a MEK+Akt-gátlószer kombináció alkalmazása felé mutat.

Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a nem-kissejtes tüdőrákhoz hasonlóan a KRAS-mutáns hasnyálmirigy adenokarcinóma sem kezelhető egységes, homogén csoportként. A KRAS G12C mutációval rendelkező sejtvonalak feltehetően más daganattípusok esetén is nagyobb érzékenységet mutatnak MEK-gátlószerekkel szemben. A

kombinációs terápiák esetén jelentősen megnövekednek a toxikus mellékhatások [202], ami korlátozhatja tényleges klinikai alkalmazásukat. Ezért is fontos egy olyan csoport felismerése, ahol a monoterápia megvalósítható. Egy friss vizsgálat máris feltárta, hogy a selumetinib (MEK-gátlószer) hatása kifejezettebb volt G12C és G12V mutáns tüdődaganatokban [203]. Ezen felül a KRAS G12C specifikus gátlószerek bíztató terápiás lehetőséget jelentenek majd, de használatuk még kutatási fázisban van [204].

Emellett természetesen fontos, hogy amennyiben gyógyszerkombináció használatára kerül sor más molekuláris altípusú daganatok esetében, akkor az a leghatásosabb legyen. Eredményeink alapján KRAS vad típusú hasnyálmirigy adenokarcinómában, mely a daganatok 20-25%-át teszi ki, az igen alacsony koncentrációjú, kombinált EGFR- és MEK-gátlószeres kezelés lehet célravezető. A G12D mutáns daganatokban az Akt-gátlószerek talán szenzitizálják a sejteket MEK-inhibítor kezeléssel szemben, azonban az IC_{50} koncentráció még így is a klinikai alkalmazhatóság felett van, így ebben az esetben valószínűleg más hatóanyag fejlesztése válik szükségessé.

7 Következtetések

A munkám eredményeiből levont következtetéseket az alábbi pontokban foglalom össze:

1. Fej-nyaki daganatokban a *PIK3CA* és *MET* génkópiaszám emelkedés (CNG) gyakori jelenség és szerepe van a daganatok primer és szekunder inhibítorral szembeni rezisztenciájának megjelenésében is. Eredményeink alapján a két vizsgált gén használata biomarkerként vagy fehérjéik terápiás célpontként megfontolandó.
2. A *PIK3CA* és *MET* kópiaszám emelkedés prognosztikus jelentőséggel bír fej-nyaki daganatokban. Mind a *PIK3CA*, mind a *MET* CNG jelenléte szignifikánsan kedvezőtlenebb betegségspecifikus túléléssel társul ezen daganattípus esetében.
3. A *PIK3CA* CNG és a $p16^{INK4}$-expresszió között szignifikáns összefüggés áll fenn. Az alacsony $p16^{INK4}$-expresszióval rendelkező daganatok esetében gyakoribb volt a *PIK3CA* génkópiaszám emelkedése. A $p16^{INK4}$-expressziót indirekt a HPV-markerként alkalmazva ez az eredmény azt jelentheti, hogy a *PIK3CA* CNG HVP-negatív tumorokban nagyobb jelentőséggel bír. Mivel több azirányú törekvés is van a klinikumban és a kutatásban, hogy a HPV-státusszal összefüggő molekuláris markereket keressünk és ennek megfelelően molekuláris altípusokat határozzunk meg, eredményünk hozzájárulhat az alcsoportok pontosabb karakterizálásához.
4. A daganat *MET* kópiaszáma és EGFR-expressziója között fordított összefüggés áll fenn. Ez az eredményünk utalhat a daganatok meghatározott jelátviteli útvonal dominanciájára, növekedési faktor függésére.
5. A *MET* és *PIK3CA* gének kópiaszám emelkedése eltér a gége régió alcsoportjaiban. A glottikus daganatok esetében ritkább volt ezen gének felsokszorozódása, mint a szupraglottikus régióban. Többek között ezzel is magyarázható a glottikus daganatok jobb túlélése.
6. A $p16^{INK4-}$expresszió HPV pozitivitástól függetlenül önálló prognosztikus marker szájgarati daganatokban.

7. A magyarországi fej-nyaki daganatos betegeket vizsgálva a $p16^{INK4}$-immunpozitivitás HPV-pozitivitást prediktáló specificitása 56%-os a szájgarati régióban. A $p16^{INK4}$-immunpozitív betegek között azon esetekben, ahol HPV-fertőzés nem igazolható, a dohányzás etiológiai szerepe szignifikáns.
8. A fej-nyaki daganatok in vitro modelljében mutációik és fehérje expressziójuk ismeretében a dasatinib és afatinib érzékenység prediktálható, kombinációjuk pedig szinergista hatással bír.
9. A connexin 43 fehérje expressziójáról munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy prognosztikus jelentősége van fej-nyaki daganatokban. A connexin 43 expresszió csökkenése kedvezőtlenebb kimenetelű betegséggel társult. Munkánk során kimutattuk, hogy a fehérje foszforilációjában tirozin-kináz inhibítorok hatására bekövetkező változás befolyásolhatja a connexin 43 fehérje membránba helyeződését. Ezt az eredmény fontos lehet a connexin 43 szabályozása szempontjából.
10. A hasnyálmirigy daganatok in vitro modelljében a KRAS mutációs altípusok és a daganat fehérje expressziója meghatározza a RAS/Raf/MEK/ERK és PI3K/Akt jelpályák aktivitását és így befolyásolja a MEK-gátló kezeléssel szembeni érzékenységüket.
11. A hasnyálmirigy daganatok in vitro modelljében molekuláris és expressziós mintázat alapján altípus-specifikusan megtervezhető a leghatásosabb, szinergista gyógyszerkombináció.

8 Összefoglalás

A személyre szabott, célzott terápia egyre elterjedtebbé válik a daganatok kezelésében. A szövettanon és anatómián túlmutató, genotípus alapú csoportosítás egyre gyakrabban figyelhető meg a klinikai vizsgálatok tervezésekor. A leghatásosabb terápia kiválasztásához szükségünk van pozitív és negatív molekuláris markerekre, melyekkel előrejelezhetjük az adott kezelőszer hatását vagy a már kiinduláskor fennálló rezisztencia jelenlétét is. Emellett intenzív kutatás folyik a betegség kimenetelét, prognózisát meghatározó biomarkerek irányába is.

Kutatásunk során célunk prediktív és prognosztikus molekuláris markerek vizsgálata volt a hazánkban kiemelkedően rossz incidencia és mortalitási adatokkal rendelkező hasnyálmirigy és fej-nyaki daganatok esetében.

Igazoltuk a *PIK3CA* és *MET* gének kópiaszám növekedésének prognosztikus jelentőségét fej-nyaki daganatokban. Emellett összefüggést mutattunk ki a vizsgált gének kópiaszám változása és az EGFR expresszió, illetve $p16^{INK4}$-státusz között. Ez az összefüggés pontosíthatja a fej-nyaki daganatok genotípus alapú kategorizálását, így segítheti a megfelelő terápia kiválasztását. Kimutattuk a $p16^{INK4}$-státusz önálló, HPV-státusztól független prognosztikai jelentőségét fej-nyaki laphámrákokban –különösen a szájgarati régióban–, mely módosíthatja a diagnosztikai algoritmust. Emellett feltártuk a dohányzás szerepét a nagy arányban előforduló $p16^{INK4}$-pozitív, de HPV-negatív daganatok patogenezisében. Célzott daganatterápia alkalmazásakor változást figyeltünk meg a connexin 43 foszforilációjában és membránba helyeződésében, melynek szerepe lehet a daganat terápia hatására bekövetkező megváltozott viselkedésében.

Mind a hasnyálmirigy, mind a fej-nyaki daganatok esetében sikerült in vitro, daganat sejtvonalakon fehérjeexpressziós és mutációs hátterük alapján molekuláris alcsoportokat elkülönítenünk, mely segítheti a legmegfelelőbb hatóanyag vagy kezelőszer kombináció kiválasztását.

Eredményeink hozzájárulhatnak a vizsgált daganattípusok molekuláris alcsoportokra osztásához, mely elősegítheti a legmegfelelőbb genotípus alapú terápia kiválasztását az adott betegpopuláció számára. Emellett előrevetítik a vizsgált daganatokhoz hasonló molekuláris genetikával rendelkező tumortípusok (például a tüdő vagy vastagbél egyes daganatainak) kezelési lehetőségeit is.

9 Summary

Precision medicine, targeted therapies are becoming more and more common in oncology. Genotype based grouping, beyond histopathology and anatomy based, is more often observed when planning clinical trials. To select the most effective therapy we need positive and negative molecular markers that can predict the effect of the particular agent or the presence of existing drug resistance at the beginning. In addition, intensive research is in progress on biomarkers, defining the outcome of the disease and the prognosis.

The aim of our research was to investigate the possible predictive and prognostic markers in case of head and neck (HNSCC) and pancreatic cancers, which has extremely high incidence and mortality rates in Hungary.

We have verified the prognostic value of *PIK3CA* and *MET* gene copy number gain in HNSCCs. A correlation was found between the examined genes and EGFR-expression, $p16^{INK4}$-status. This relationship may refine the genotype based categorization of head and neck tumors, thus helping to select the right therapy.

We revealed, that the $p16^{INK4}$-expression is of prognostic and predictive value in HNSCCs, especially in oropharyngeal cancers independent of human papillomavirus status, which can modify the diagnostic algorithm. We also propounded the possible role of smoking in the pathogenesis of the numerous $p16^{INK4}$-positive and HPV-negative cases. In the use of targeted tumor therapy, a change in the phosphorylation and membrane position of connexin 43 has been observed, which may play a role in the therapy-induced alteration of tumor behaviour.

In both pancreas tumors and HNSCCs molecular subgroups were defined according to the in vitro profiling of protein expression and mutational background of cancer cell lines. This finding can facilitate the subgroup specific selection of the most effective targeted treatment or drug combination.

Our results may contribute to the subdivision of the examined tumor types into molecular subgroups, which can help select the most suitable genotype based therapy for the particular patient population. They also anticipate treatment options for tumor types, such as certain tumors of the lung or colon, with molecular genetics similar to the tumors investigated.

10 Irodalomjegyzék

[1] Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. (2009) The cancer genome. Nature, 458: 719-724.

[2] Hodson R. (2016) Precision medicine. Nature, 537: S49.

[3] Petak I, Schwab R, Orfi L, Kopper L, Keri G. (2010) Integrating molecular diagnostics into anticancer drug discovery. Nat Rev Drug Discov, 9: 523-535.

[4] Bose P, Brockton NT, Dort JC. (2013) Head and neck cancer: from anatomy to biology. Int J Cancer, 133: 2013-2023.

[5] Stockley TL, Oza AM, Berman HK, Leighl NB, Knox JJ, Shepherd FA, Chen EX, Krzyzanowska MK, Dhani N, Joshua AM, Tsao MS, Serra S, Clarke B, Roehrl MH, Zhang T, Sukhai MA, Califaretti N, Trinkaus M, Shaw P, van der Kwast T, Wang L, Virtanen C, Kim RH, Razak AR, Hansen AR, Yu C, Pugh TJ, Kamel-Reid S, Siu LL, Bedard PL. (2016) Molecular profiling of advanced solid tumors and patient outcomes with genotype-matched clinical trials: the Princess Margaret IMPACT/COMPACT trial. Genome Med, 8: 109.

[6] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. (2015) Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin, 65: 87-108.

[7] WHO. International Agency for Research on Cancer, Cancer mortality database, Retrieved 2017.05.01. http://www-dep.iarc.fr/WHOdb/WHOdb.htm.

[8] Smith BD, Smith GL, Hurria A, Hortobagyi GN, Buchholz TA. (2009) Future of cancer incidence in the United States: burdens upon an aging, changing nation. J Clin Oncol, 27: 2758-2765.

[9] Bosetti C, Bertuccio P, Malvezzi M, Levi F, Chatenoud L, Negri E, La Vecchia C. (2013) Cancer mortality in Europe, 2005-2009, and an overview of trends since 1980. Ann Oncol, 24: 2657-2671.

[10] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer, 136: E359-386.

[11] Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. (2014) Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. Cancer Res, 74: 2913-2921.

[12] Ilic M, Ilic I. (2016) Epidemiology of pancreatic cancer. World J Gastroenterol, 22: 9694-9705.

[13] Doll R, Hill AB. (1950) Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. Br Med J, 2: 739-748.

[14] Thun M, Peto R, Boreham J, Lopez AD. (2012) Stages of the cigarette epidemic on entering its second century. Tob Control, 21: 96-101.

[15] Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst, 92: 709-720.

[16] Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. (2014) Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. Oral Oncol, 50: 380-386.

[17] OOI. (Retrieved 2017.04.01.) Országos Onkológiai Intézet (National Institut of Oncology) Rákregiszter Statisztika, http://www.onkol.hu/hu/rakregiszter-statisztika.

[18] Wolfgang CL, Herman JM, Laheru DA, Klein AP, Erdek MA, Fishman EK, Hruban RH. (2013) Recent progress in pancreatic cancer. CA Cancer J Clin, 63: 318-348.

[19] Tomasetti C, Li L, Vogelstein B. (2017) Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. Science, 355: 1330-1334.

[20] Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. (2001) The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. Chem Res Toxicol, 14: 767-790.

[21] Wen J, Fu JH, Zhang W, Guo M. (2011) Lung carcinoma signaling pathways activated by smoking. Chin J Cancer, 30: 551-558.

[22] Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF, Jr. (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res, 48: 3282-3287.

[23] Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P. (2007) 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, 99: 777-789.

[24] Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Kelsey K, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Lence JJ, Mates D, Matos E, Menezes A, McClean MD, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Purdue M, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Shangina O, Pilarska A, Zhang ZF, Ferro G, Berthiller J, Boffetta P. (2009) Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 18: 541-550.

[25] Boeing H, Dietrich T, Hoffmann K, Pischon T, Ferrari P, Lahmann PH, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Allen N, Key T, Skeie G, Lund E, Olsen A, Tjonneland A, Overvad K, Jensen MK, Rohrmann S, Linseisen J, Trichopoulou A, Bamia C, Psaltopoulou T, Weinehall L, Johansson I, Sanchez MJ, Jakszyn P, Ardanaz E, Amiano P, Chirlaque MD, Quiros JR, Wirfalt E, Berglund G, Peeters PH, van Gils CH, Bueno-de-Mesquita HB, Buchner FL, Berrino F, Palli D, Sacerdote C, Tumino R, Panico S, Bingham S, Khaw KT, Slimani N, Norat T, Jenab M, Riboli E. (2006) Intake of fruits and vegetables and risk of cancer of the upper aero-digestive tract: the prospective EPIC-study. Cancer Causes Control, 17: 957-969.

[26] Chuang SC, Jenab M, Heck JE, Bosetti C, Talamini R, Matsuo K, Castellsague X, Franceschi S, Herrero R, Winn DM, La Vecchia C, Morgenstern H, Zhang ZF, Levi F, Dal Maso L, Kelsey K, McClean MD, Vaughan T, Lazarus P, Muscat J, Ramroth H, Chen C, Schwartz SM, Eluf-Neto J, Hayes RB, Purdue M, Boccia S, Cadoni G, Zaridze

D, Koifman S, Curado MP, Ahrens W, Benhamou S, Matos E, Lagiou P, Szeszenia-Dabrowska N, Olshan AF, Fernandez L, Menezes A, Agudo A, Daudt AW, Merletti F, Macfarlane GJ, Kjaerheim K, Mates D, Holcatova I, Schantz S, Yu GP, Simonato L, Brenner H, Mueller H, Conway DI, Thomson P, Fabianova E, Znaor A, Rudnai P, Healy CM, Ferro G, Brennan P, Boffetta P, Hashibe M. (2012) Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the INHANCE consortium. Cancer Causes Control, 23: 69-88.

[27] Edefonti V, Hashibe M, Ambrogi F, Parpinel M, Bravi F, Talamini R, Levi F, Yu G, Morgenstern H, Kelsey K, McClean M, Schantz S, Zhang Z, Chuang S, Boffetta P, La Vecchia C, Decarli A. (2012) Nutrient-based dietary patterns and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology consortium. Ann Oncol, 23: 1869-1880.

[28] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study G. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med, 348: 518-527.

[29] Galloway DA, McDougall JK. (1996) The disruption of cell cycle checkpoints by papillomavirus oncoproteins contributes to anogenital neoplasia. Semin Cancer Biol, 7: 309-315.

[30] Somers KD, Merrick MA, Lopez ME, Incognito LS, Schechter GL, Casey G. (1992) Frequent p53 mutations in head and neck cancer. Cancer Res, 52: 5997-6000.

[31] Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohammadi N, Aghamohammadi M, Gornbein JA, Calcaterra TC, Slamon DJ, Wang MB, Srivatsan ES. (2002) Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. Laryngoscope, 112: 472-481.

[32] Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK. (2012) Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. JAMA, 307: 693-703.

[33] Gillison ML, Alemany L, Snijders PJ, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz S, Castellsague X. (2012) Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. Vaccine, 30 Suppl 5: F34-54.

[34] Moody CA, Laimins LA. (2010) Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nat Rev Cancer, 10: 550-560.

[35] Robinson M, Schache A, Sloan P, Thavaraj S. (2012) HPV specific testing: a requirement for oropharyngeal squamous cell carcinoma patients. Head Neck Pathol, 6 Suppl 1: S83-90.

[36] Wasylyk B, Abecassis J, Jung AC. (2013) Identification of clinically relevant HPV-related HNSCC: in p16 should we trust? Oral Oncol, 49: e33-37.

[37] Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. (2007) A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. Int J Cancer, 121: 2465-2472.

[38] Lewis JS, Jr., Chernock RD. (2014) Human papillomavirus and Epstein Barr virus in head and neck carcinomas: suggestions for the new WHO classification. Head Neck Pathol, 8: 50-58.

[39] Lewis JS, Jr., Chernock RD, Ma XJ, Flanagan JJ, Luo Y, Gao G, Wang X, El-Mofty SK. (2012) Partial p16 staining in oropharyngeal squamous cell carcinoma: extent and pattern correlate with human papillomavirus RNA status. Mod Pathol, 25: 1212-1220.

[40] Horiuchi K, Mishima K, Ichijima K, Sugimura M, Ishida T, Kirita T. (1995) Epstein-Barr virus in the proliferative diseases of squamous epithelium in the oral cavity. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 79: 57-63.

[41] Mao EJ, Smith CJ. (1993) Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in oral smears from healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med, 22: 12-17.

[42] Cruz I, Van Den Brule AJ, Brink AA, Snijders PJ, Walboomers JM, Van Der Waal I, Meijer CJ. (2000) No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. Int J Cancer, 86: 356-361.

[43] Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL. (1995) Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. Int J Cancer, 63: 769-773.

[44] Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, Snow GB. (1995) Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 121: 157-160.

[45] Lowenfels AB, Maisonneuve P. (2005) Risk factors for pancreatic cancer. J Cell Biochem, 95: 649-656.

[46] Silverman DT, Dunn JA, Hoover RN, Schiffman M, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Brown LM, Greenberg RS, Hayes RB, Swanson GM, et al. (1994) Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews. J Natl Cancer Inst, 86: 1510-1516.

[47] Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS. (2001) Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. JAMA, 286: 921-929.

[48] Nothlings U, Wilkens LR, Murphy SP, Hankin JH, Henderson BE, Kolonel LN. (2005) Meat and fat intake as risk factors for pancreatic cancer: the multiethnic cohort study. J Natl Cancer Inst, 97: 1458-1465.

[49] Lucenteforte E, La Vecchia C, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, Ji BT, Bosetti C, Li D, Gallinger S, Miller AB, Bueno-de-Mesquita HB, Talamini R, Polesel J, Ghadirian P, Baghurst PA, Zatonski W, Fontham E, Bamlet WR, Holly EA, Gao YT, Negri E, Hassan M, Cotterchio M, Su J, Maisonneuve P, Boffetta P, Duell EJ. (2012) Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). Ann Oncol, 23: 374-382.

[50] Lynch HT, Krush AJ, Larsen AL. (1967) Heredity and multiple primary malignant neoplasms: six cancer families. Am J Med Sci, 254: 322-329.

[51] Grover S, Syngal S. (2010) Hereditary pancreatic cancer. Gastroenterology, 139: 1076-1080, 1080 e1071-1072.

[52] Cancer Genome Atlas N. (2015) Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. Nature, 517: 576-582.

[53] Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, Ding M, Bamford S, Cole C, Ward S, Kok CY, Jia M, De T, Teague JW, Stratton MR, McDermott U, Campbell PJ. (2015) COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. Nucleic Acids Res, 43: D805-811.

[54] Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, Kryukov GV, Lawrence MS, Sougnez C, McKenna A, Shefler E, Ramos AH, Stojanov P, Carter SL, Voet D, Cortes ML, Auclair D, Berger MF, Saksena G, Guiducci C, Onofrio RC, Parkin M, Romkes M, Weissfeld JL, Seethala RR, Wang L, Rangel-Escareno C, Fernandez-Lopez JC, Hidalgo-Miranda A, Melendez-Zajgla J, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Golub TR, Garraway LA, Grandis JR. (2011) The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. Science, 333: 1157-1160.

[55] COSMIC. (Retrieved 2017.05.15.) Catalogue of somatic mutations in cancer, http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic.

[56] NCBI. (Retrieved 2017.05.10.) National Center for Biotechnology Information, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene.

[57] Makohon-Moore A, Iacobuzio-Donahue CA. (2016) Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. Nat Rev Cancer, 16: 553-565.

[58] Heestand GM, Kurzrock R. (2015) Molecular landscape of pancreatic cancer: implications for current clinical trials. Oncotarget, 6: 4553-4561.

[59] Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. (2000) Progression model for pancreatic cancer. Clin Cancer Res, 6: 2969-2972.

[60] Waddell N, Pajic M, Patch AM, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, Johns AL, Miller D, Nones K, Quek K, Quinn MC, Robertson AJ, Fadlullah MZ, Bruxner TJ, Christ AN, Harliwong I, Idrisoglu S, Manning S, Nourse C, Nourbakhsh E, Wani S, Wilson PJ, Markham E, Cloonan N, Anderson MJ, Fink JL, Holmes O, Kazakoff SH, Leonard C, Newell F, Poudel B, Song S, Taylor D, Waddell N, Wood S, Xu Q, Wu J, Pinese M, Cowley MJ, Lee HC, Jones MD, Nagrial AM, Humphris J, Chantrill LA, Chin V, Steinmann AM, Mawson A, Humphrey ES, Colvin EK, Chou A, Scarlett CJ, Pinho AV, Giry-Laterriere M, Rooman I, Samra JS, Kench JG, Pettitt JA, Merrett ND,

Toon C, Epari K, Nguyen NQ, Barbour A, Zeps N, Jamieson NB, Graham JS, Niclou SP, Bjerkvig R, Grutzmann R, Aust D, Hruban RH, Maitra A, Iacobuzio-Donahue CA, Wolfgang CL, Morgan RA, Lawlor RT, Corbo V, Bassi C, Falconi M, Zamboni G, Tortora G, Tempero MA, Gill AJ, Eshleman JR, Pilarsky C, Scarpa A, Musgrove EA, Pearson JV, Biankin AV, Grimmond SM. (2015) Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. Nature, 518: 495-501.

[61] Ringstrom E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. (2002) Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. Clin Cancer Res, 8: 3187-3192.

[62] Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D, Vokes EE, Weichselbaum RR. (1996) Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. Clin Cancer Res, 2: 755-762.

[63] Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. (2010) Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. N Engl J Med, 363: 24-35.

[64] Fakhry C, Zhang Q, Nguyen-Tan PF, Rosenthal D, El-Naggar A, Garden AS, Soulieres D, Trotti A, Avizonis V, Ridge JA, Harris J, Le QT, Gillison M. (2014) Human papillomavirus and overall survival after progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma. J Clin Oncol, 32: 3365-3373.

[65] Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. (2002) Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. Oncogene, 21: 7435-7451.

[66] Gibbons DL, Byers LA, Kurie JM. (2014) Smoking, p53 mutation, and lung cancer. Mol Cancer Res, 12: 3-13.

[67] Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih Ie M, Kurman RJ. (2011) 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, 24: 1248-1253.

[68] Soland TM, Brusevold IJ. (2013) Prognostic molecular markers in cancer - quo vadis? Histopathology, 63: 297-308.

[69] Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol, 133: 1710-1715.

[70] Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehulsing M, Eckel HE. (1999) Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. Oral Oncol, 35: 583-589.

[71] Szentkuti G, Danos K, Brauswetter D, Kiszner G, Krenacs T, Csako L, Repassy G, Tamas L. (2015) Correlations Between Prognosis and Regional Biomarker Profiles in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. Pathol Oncol Res, 3: 643-650.

[72] Schlessinger J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell, 103: 211-225.

[73] Blume-Jensen P, Hunter T. (2001) Oncogenic kinase signalling. Nature, 411: 355-365.

[74] Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N, Kitamura K, Ohshima M, Asano K, Yamamoto T. (1989) Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck. Br J Cancer, 59: 559-562.

[75] Szabo B, Nelhubel GA, Karpati A, Kenessey I, Jori B, Szekely C, Petak I, Lotz G, Hegedus Z, Hegedus B, Fule T, Dome B, Timar J, Tovari J. (2011) Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. Oral Oncol, 47: 487-496.

[76] Alterio D, Marvaso G, Maffini F, Gandini S, Chiocca S, Ferrari A, Preda L, Rocca MC, Lepanto D, Fodor C, Volpe S, Dicuonzo S, Laudati A, Giugliano G, Ansarin M, Jereczek-Fossa BA. (2017) Role of EGFR as prognostic factor in head and neck cancer patients treated with surgery and postoperative radiotherapy: proposal of a new approach behind the EGFR overexpression. Med Oncol, 34: 107.

[77] Shah NG, Trivedi TI, Tankshali RA, Goswami JV, Jetly DH, Shukla SN, Shah PM, Verma RJ. (2009) Prognostic significance of molecular markers in oral squamous cell carcinoma: a multivariate analysis. Head Neck, 31: 1544-1556.

[78] Won HS, Jung CK, Chun SH, Kang JH, Kim YS, Sun DI, Kim MS. (2012) Difference in expression of EGFR, pAkt, and PTEN between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma. Oral Oncol, 48: 985-990.

[79] Janssen-Timmen U, Traub O, Dermietzel R, Rabes HM, Willecke K. (1986) Reduced number of gap junctions in rat hepatocarcinomas detected by monoclonal antibody. Carcinogenesis, 7: 1475-1482.

[80] Czyz J. (2008) The stage-specific function of gap junctions during tumourigenesis. Cell Mol Biol Lett, 13: 92-102.

[81] Teleki I, Krenacs T, Szasz MA, Kulka J, Wichmann B, Leo C, Papassotiropoulos B, Riemenschnitter C, Moch H, Varga Z. (2013) The potential prognostic value of connexin 26 and 46 expression in neoadjuvant-treated breast cancer. BMC Cancer, 13: 50.

[82] Danos K, Brauswetter D, Birtalan E, Pato A, Bencsik G, Krenacs T, Petak I, Tamas L. (2016) The Potential Prognostic Value of Connexin 43 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 24: 476-481.

[83] Musil LS, Beyer EC, Goodenough DA. (1990) Expression of the gap junction protein connexin43 in embryonic chick lens: molecular cloning, ultrastructural localization, and post-translational phosphorylation. J Membr Biol, 116: 163-175.

[84] Solan JL, Hingorani SR, Lampe PD. (2012) Changes in connexin43 expression and localization during pancreatic cancer progression. J Membr Biol, 245: 255-262.

[85] Balla P, Maros ME, Barna G, Antal I, Papp G, Sapi Z, Athanasou NA, Benassi MS, Picci P, Krenacs T. (2015) Prognostic impact of reduced connexin43 expression and gap junction coupling of neoplastic stromal cells in giant cell tumor of bone. PLoS One, 10: e0125316.

[86] Yogo K, Ogawa T, Akiyama M, Ishida N, Takeya T. (2002) Identification and functional analysis of novel phosphorylation sites in Cx43 in rat primary granulosa cells. FEBS Lett, 531: 132-136.

[87] Yokoyama M, Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Korc M. (1994) p53 expression in human pancreatic cancer correlates with enhanced biological aggressiveness. Anticancer Res, 14: 2477-2483.

[88] Nakamori S, Yashima K, Murakami Y, Ishikawa O, Ohigashi H, Imaoka S, Yaegashi S, Konishi Y, Sekiya T. (1995) Association of p53 gene mutations with short survival in pancreatic adenocarcinoma. Jpn J Cancer Res, 86: 174-181.

[89] Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP. (2005) Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. Eur J Cancer, 41: 2213-2236.

[90] Ohtsubo K, Watanabe H, Yamaguchi Y, Hu YX, Motoo Y, Okai T, Sawabu N. (2003) Abnormalities of tumor suppressor gene p16 in pancreatic carcinoma: immunohistochemical and genetic findings compared with clinicopathological parameters. J Gastroenterol, 38: 663-671.

[91] Sasaki S, Yamamoto H, Kaneto H, Ozeki I, Adachi Y, Takagi H, Matsumoto T, Itoh H, Nagakawa T, Miyakawa H, Muraoka S, Fujinaga A, Suga T, Satoh M, Itoh F, Endo T, Imai K. (2003) Differential roles of alterations of p53, p16, and SMAD4 expression in the progression of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. Oncol Rep, 10: 21-25.

[92] Twombly R. (2005) Failing survival advantage in crucial trial, future of Iressa is in jeopardy. J Natl Cancer Inst, 97: 249-250.

[93] Schwab R, Pinter F, Moldavy J, Papay J, Strausz J, Kopper L, Keri G, Pap A, Petak I, Oreskovich K, Mangel L. (2005) Modern treatment of lung cancer: case 1. Amplification and mutation of the epidermal growth factor receptor in metastatic lung cancer with remission from gefitinib. J Clin Oncol, 23: 7736-7738.

[94] Gridelli C, De Marinis F, Di Maio M, Cortinovis D, Cappuzzo F, Mok T. (2011) Gefitinib as first-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer with activating Epidermal Growth Factor Receptor mutation: implications for clinical practice and open issues. Lung Cancer, 72: 3-8.

[95] FDA. (Retrieved 2017.04.01.) U.S. Food and Drug Administration, FDA Approved Drugs, https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm.

[96] Gregoire V, Lefebvre JL, Licitra L, Felip E, Group E-E-EGW. (2010) Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol, 21 Suppl 5: v184-186.

[97] Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. (2006) Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med, 354: 567-578.

[98] Robert F, Ezekiel MP, Spencer SA, Meredith RF, Bonner JA, Khazaeli MB, Saleh MN, Carey D, LoBuglio AF, Wheeler RH, Cooper MR, Waksal HW. (2001) Phase I study of anti--epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. J Clin Oncol, 19: 3234-3243.

[99] Rivera F, Garcia-Castano A, Vega N, Vega-Villegas ME, Gutierrez-Sanz L. (2009) Cetuximab in metastatic or recurrent head and neck cancer: the EXTREME trial. Expert Rev Anticancer Ther, 9: 1421-1428.

[100] Ang KK, Zhang Q, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Sherman EJ, Weber RS, Galvin JM, Bonner JA, Harris J, El-Naggar AK, Gillison ML, Jordan RC, Konski AA, Thorstad WL, Trotti A, Beitler JJ, Garden AS, Spanos WJ, Yom SS, Axelrod RS. (2014) Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522. J Clin Oncol, 32: 2940-2950.

[101] Rosenthal DI, Harari PM, Giralt J, Bell D, Raben D, Liu J, Schulten J, Ang KK, Bonner JA. (2016) Association of Human Papillomavirus and p16 Status With Outcomes in the IMCL-9815 Phase III Registration Trial for Patients With Locoregionally Advanced Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Treated With Radiotherapy With or Without Cetuximab. J Clin Oncol, 34: 1300-1308.

[102] Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcberg JR. (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med, 359: 1757-1765.

[103] Weidhaas JB, Harris J, Schaue D, Chen AM, Chin R, Axelrod R, El-Naggar AK, Singh AK, Galloway TJ, Raben D, Wang D, Matthiesen C, Avizonis VN, Manon RR, Yumen O, Nguyen-Tan PF, Trotti A, Skinner H, Zhang Q, Ferris RL, Sidransky D, Chung CH. (2017) The KRAS-Variant and Cetuximab Response in Head and Neck Squamous Cell Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. JAMA Oncol, 3: 483-491.

[104] Bruce JP, Xu W, Liu FF. (2017) The KRAS Variant as a Predictive Biomarker of Cetuximab Response in Head and Neck Cancer. JAMA Oncol, 3: 491-492.

[105] Ferris RL, Blumenschein G, Jr., Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, Worden F, Saba NF, Iglesias Docampo LC, Haddad R, Rordorf T, Kiyota N, Tahara M, Monga M, Lynch M, Geese WJ, Kopit J, Shaw JW, Gillison ML. (2016) Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. N Engl J Med, 375: 1856-1867.

[106] Chow LQ, Haddad R, Gupta S, Mahipal A, Mehra R, Tahara M, Berger R, Eder JP, Burtness B, Lee SH, Keam B, Kang H, Muro K, Weiss J, Geva R, Lin CC, Chung HC, Meister A, Dolled-Filhart M, Pathiraja K, Cheng JD, Seiwert TY. (2016) 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.

[107] Stewart JS, Cohen EE, Licitra L, Van Herpen CM, Khorprasert C, Soulieres D, Vodvarka P, Rischin D, Garin AM, Hirsch FR, Varella-Garcia M, Ghiorghiu S, Hargreaves L, Armour A, Speake G, Swaisland A, Vokes EE. (2009) Phase III study of gefitinib compared with intravenous methotrexate for recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck [corrected]. J Clin Oncol, 27: 1864-1871.

[108] de Souza JA, Davis DW, Zhang Y, Khattri A, Seiwert TY, Aktolga S, Wong SJ, Kozloff MF, Nattam S, Lingen MW, Kunnavakkam R, Stenson KM, Blair EA, Bozeman J, Dancey JE, Vokes EE, Cohen EE. (2012) A phase II study of lapatinib in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. Clin Cancer Res, 18: 2336-2343.

[109] Siu LL, Soulieres D, Chen EX, Pond GR, Chin SF, Francis P, Harvey L, Klein M, Zhang W, Dancey J, Eisenhauer EA, Winquist E, Princess Margaret Hospital Phase

IIC, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group S. (2007) Phase I/II trial of erlotinib and cisplatin in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: a Princess Margaret Hospital phase II consortium and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study. J Clin Oncol, 25: 2178-2183.

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

[111] Machiels JP, Haddad RI, Fayette J, Licitra LF, Tahara M, Vermorken JB, Clement PM, Gauler T, Cupissol D, Grau JJ, Guigay J, Caponigro F, de Castro G, Jr., de Souza Viana L, Keilholz U, Del Campo JM, Cong XJ, Ehrnrooth E, Cohen EE, Lux H, investigators N. (2015) Afatinib versus methotrexate as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck progressing on or after platinum-based therapy (LUX-Head & Neck 1): an open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol, 16: 583-594.

[112] Szturz P, Raymond E, Abitbol C, Albert S, de Gramont A, Faivre S. (2017) Understanding c-MET signalling in squamous cell carcinoma of the head & neck. Crit Rev Oncol Hematol, 111: 39-51.

[113] Krumbach R, Schuler J, Hofmann M, Giesemann T, Fiebig HH, Beckers T. (2011) Primary resistance to cetuximab in a panel of patient-derived tumour xenograft models: activation of MET as one mechanism for drug resistance. Eur J Cancer, 47: 1231-1243.

[114] Cappuzzo F, Janne PA, Skokan M, Finocchiaro G, Rossi E, Ligorio C, Zucali PA, Terracciano L, Toschi L, Roncalli M, Destro A, Incarbone M, Alloisio M, Santoro A, Varella-Garcia M. (2009) MET increased gene copy number and primary resistance to gefitinib therapy in non-small-cell lung cancer patients. Ann Oncol, 20: 298-304.

[115] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Janne PA. (2007) MET

amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. Science, 316: 1039-1043.

[116] Kawakami H, Okamoto I, Okamoto W, Tanizaki J, Nakagawa K, Nishio K. (2014) Targeting MET Amplification as a New Oncogenic Driver. Cancers (Basel), 6: 1540-1552.

[117] Schwab R, Petak I, Kollar M, Pinter F, Varkondi E, Kohanka A, Barti-Juhasz H, Schonleber J, Brauswetter D, Kopper L, Urban L. (2014) Major partial response to crizotinib, a dual MET/ALK inhibitor, in a squamous cell lung (SCC) carcinoma patient with de novo c-MET amplification in the absence of ALK rearrangement. Lung Cancer, 83: 109-111.

[118] Seiwert T, Sarantopoulos J, Kallender H, McCallum S, Keer HN, Blumenschein G, Jr. (2013) Phase II trial of single-agent foretinib (GSK1363089) in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. Invest New Drugs, 31: 417-424.

[119] Koole K, Brunen D, van Kempen PM, Noorlag R, de Bree R, Lieftink C, van Es RJ, Bernards R, Willems SM. (2016) FGFR1 Is a Potential Prognostic Biomarker and Therapeutic Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Clin Cancer Res, 22: 3884-3893.

[120] Goke F, Franzen A, Hinz TK, Marek LA, Yoon P, Sharma R, Bode M, von Maessenhausen A, Lankat-Buttgereit B, Goke A, Golletz C, Kirsten R, Boehm D, Vogel W, Kleczko EK, Eagles JR, Hirsch FR, Van Bremen T, Bootz F, Schroeck A, Kim J, Tan AC, Jimeno A, Heasley LE, Perner S. (2015) FGFR1 Expression Levels Predict BGJ398 Sensitivity of FGFR1-Dependent Head and Neck Squamous Cell Cancers. Clin Cancer Res, 21: 4356-4364.

[121] Seiwert TY, Zuo Z, Keck MK, Khattri A, Pedamallu CS, Stricker T, Brown C, Pugh TJ, Stojanov P, Cho J, Lawrence MS, Getz G, Bragelmann J, DeBoer R, Weichselbaum RR, Langerman A, Portugal L, Blair E, Stenson K, Lingen MW, Cohen EE, Vokes EE, White KP, Hammerman PS. (2015) Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. Clin Cancer Res, 21: 632-641.

[122] Lui VW, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y, Lu Y, Zhang Q, Du Y, Gilbert BR, Freilino M, Sauerwein S, Peyser ND, Xiao D, Diergaarde B, Wang L, Chiosea S, Seethala R, Johnson JT, Kim S, Duvvuri U, Ferris RL, Romkes M, Nukui T, Kwok-Shing Ng P, Garraway LA, Hammerman PS, Mills GB, Grandis JR. (2013) Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. Cancer Discov, 3: 761-769.

[123] Whyte DB, Holbeck SL. (2006) Correlation of PIK3Ca mutations with gene expression and drug sensitivity in NCI-60 cell lines. Biochem Biophys Res Commun, 340: 469-475.

[124] Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, Frattini M, Riva C, Andreola S, Bajetta E, Bertario L, Leo E, Pierotti MA, Pilotti S. (2009) PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. Ann Oncol, 20: 84-90.

[125] de la Rochefordiere A, Kamal M, Floquet A, Thomas L, Petrow P, Petit T, Pop M, Fabbro M, Kerr C, Joly F, Sevin E, Maillard S, Cure H, Weber B, Brunaud C, Minsat M, Gonzague L, Berton-Rigaud D, Aumont M, Gladieff L, Peigneux K, Bernard V, Leroy Q, Bieche I, Margogne A, Nadan AT, Fourchotte V, Diallo A, Asselain B, Plancher C, Armanet S, Beuzeboc P, Scholl S. (2015) PIK3CA pathway mutations predictive of poor response following Standard radio chemotherapy +/- Cetuximab in cervical cancer patients. Clin Cancer Res, 21: 2530-2537.

[126] Soulieres D, Faivre S, Mesia R, Remenar E, Li SH, Karpenko A, Dechaphunkul A, Ochsenreither S, Kiss LA, Lin JC, Nagarkar R, Tamas L, Kim SB, Erfan J, Alyasova A, Kasper S, Barone C, Turri S, Chakravartty A, Chol M, Aimone P, Hirawat S, Licitra L. (2017) Buparlisib and paclitaxel in patients with platinum-pretreated recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (BERIL-1): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. Lancet Oncol, 18: 323-335.

[127] Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, Ohshiro K, Rosenthal DI, Weber RS, Gallick GE, El-Naggar AK. (2008) Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. Cancer, 112: 2088-2100.

[128] Brooks HD, Glisson BS, Bekele BN, Johnson FM, Ginsberg LE, El-Naggar A, Culotta KS, Takebe N, Wright J, Tran HT, Papadimitrakopoulou VA. (2011) Phase 2 study of dasatinib in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. Cancer, 117: 2112-2119.

[129] Stabile LP, He G, Lui VW, Thomas S, Henry C, Gubish CT, Joyce S, Quesnelle KM, Siegfried JM, Grandis JR. (2013) c-Src activation mediates erlotinib resistance in head and neck cancer by stimulating c-Met. Clin Cancer Res, 19: 380-392.

[130] Bauman JE, Duvvuri U, Gooding WE, Rath TJ, Gross ND, Song J, Jimeno A, Yarbrough WG, Johnson FM, Wang L, Chiosea S, Sen M, Kass J, Johnson JT, Ferris RL, Kim S, Hirsch FR, Ellison K, Flaherty JT, Mills GB, Grandis JR. (2017) Randomized, placebo-controlled window trial of EGFR, Src, or combined blockade in head and neck cancer. JCI Insight, 2: e90449.

[131] Chiorean EG, Coveler AL. (2015) Pancreatic cancer: optimizing treatment options, new, and emerging targeted therapies. Drug Des Devel Ther, 9: 3529-3545.

[132] Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goere D, Seufferlein T, Haustermans K, Van Laethem JL, Conroy T, Arnold D, Committee EG. (2015) Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol, 26 Suppl 5: v56-68.

[133] Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. (1997) Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. J Clin Oncol, 15: 2403-2413.

[134] Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W. (2007) Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J Clin Oncol, 25: 1960-1966.

[135] Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, Van Cutsem E, Wei X, Iglesias J, Renschler MF. (2013) Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. N Engl J Med, 369: 1691-1703.

[136] Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardiere C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Pere-Verge D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M, Groupe Tumeurs Digestives of U, Intergroup P. (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. N Engl J Med, 364: 1817-1825.

[137] Wang-Gillam A, Li CP, Bodoky G, Dean A, Shan YS, Jameson G, Macarulla T, Lee KH, Cunningham D, Blanc JF, Hubner RA, Chiu CF, Schwartsmann G, Siveke JT, Braiteh F, Moyo V, Belanger B, Dhindsa N, Bayever E, Von Hoff DD, Chen LT, Group N-S. (2016) Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet, 387: 545-557.

[138] Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G. (2007) Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J Clin Oncol, 25: 1960-1966.

[139] Welch SA, Moore MJ. (2007) Erlotinib: success of a molecularly targeted agent for the treatment of advanced pancreatic cancer. Future Oncol, 3: 247-254.

[140] Tobita K, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, Ohtani Y, Oida Y, Yamazaki H, Nakamura M, Ueyama Y, Tanaka M, Inokuchi S, Makuuchi H. (2003) Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: Significance for liver metastasis. Int J Mol Med, 11: 305-309.

[141] Bloomston M, Bhardwaj A, Ellison EC, Frankel WL. (2006) Epidermal growth factor receptor expression in pancreatic carcinoma using tissue microarray technique. Dig Surg, 23: 74-79.

[142] Ioannou N, Dalgleish AG, Seddon AM, Mackintosh D, Guertler U, Solca F, Modjtahedi H. (2011) Anti-tumour activity of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, in human pancreatic tumour cells. Br J Cancer, 105: 1554-1562.

[143] Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG, Varmus HE. (2005) KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. PLoS Med, 2: e17.

[144] Nedaeinia R, Avan A, Manian M, Salehi R, Ghayour-Mobarhan M. (2014) EGFR as a potential target for the treatment of pancreatic cancer: dilemma and controversies. Curr Drug Targets, 15: 1293-1301.

[145] Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, Oettle H, Vervenne WL, Szawlowski A, Schoffski P, Post S, Verslype C, Neumann H, Safran H, Humblet Y, Perez Ruixo J, Ma Y, Von Hoff D. (2004) Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. J Clin Oncol, 22: 1430-1438.

[146] Bodoky G, Timcheva C, Spigel DR, La Stella PJ, Ciuleanu TE, Pover G, Tebbutt NC. (2012) A phase II open-label randomized study to assess the efficacy and safety of selumetinib (AZD6244 [ARRY-142886]) versus capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer who have failed first-line gemcitabine therapy. Invest New Drugs, 30: 1216-1223.

[147] Infante JR, Somer BG, Park JO, Li CP, Scheulen ME, Kasubhai SM, Oh DY, Liu Y, Redhu S, Steplewski K, Le N. (2014) A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of trametinib, an oral MEK inhibitor, in combination with gemcitabine for patients with untreated metastatic adenocarcinoma of the pancreas. Eur J Cancer, 50: 2072-2081.

[148] Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, Beijersbergen RL, Bardelli A, Bernards R. (2012) Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. Nature, 483: 100-103.

[149] Pettazzoni P, Viale A, Shah P, Carugo A, Ying H, Wang H, Genovese G, Seth S, Minelli R, Green T, Huang-Hobbs E, Corti D, Sanchez N, Nezi L, Marchesini M, Kapoor A, Yao W, Francesco ME, Petrocchi A, Deem AK, Scott K, Colla S, Mills GB, Fleming JB, Heffernan TP, Jones P, Toniatti C, DePinho RA, Draetta GF. (2015) Genetic events that limit the efficacy of MEK and RTK inhibitor therapies in a mouse model of KRAS-driven pancreatic cancer. Cancer Res, 75: 1091-1101.

[150] Mirzoeva OK, Collisson EA, Schaefer PM, Hann B, Hom YK, Ko AH, Korn WM. (2013) Subtype-specific MEK-PI3 kinase feedback as a therapeutic target in pancreatic adenocarcinoma. Mol Cancer Ther, 12: 2213-2225.

[151] Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, Beckett L, Bold RJ. (2003) Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. Br J Cancer, 89: 2110-2115.

[152] Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SA. (2004) The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. Oncogene, 23: 8571-8580.

[153] Matsuoka T, Yashiro M. (2016) Molecular targets for the treatment of pancreatic cancer: Clinical and experimental studies. World J Gastroenterol, 22: 776-789.

[154] Kordes S, Klumpen HJ, Weterman MJ, Schellens JH, Richel DJ, Wilmink JW. (2015) Phase II study of capecitabine and the oral mTOR inhibitor everolimus in patients with advanced pancreatic cancer. Cancer Chemother Pharmacol, 75: 1135-1141.

[155] Neuzillet C, Couvelard A, Tijeras-Raballand A, de Mestier L, de Gramont A, Bedossa P, Paradis V, Sauvanet A, Bachet JB, Ruszniewski P, Raymond E, Hammel P, Cros J. (2015) High c-Met expression in stage I-II pancreatic adenocarcinoma: proposal for an immunostaining scoring method and correlation with poor prognosis. Histopathology, 67: 664-676.

[156] Avan A, Quint K, Nicolini F, Funel N, Frampton AE, Maftouh M, Pelliccioni S, Schuurhuis GJ, Peters GJ, Giovannetti E. (2013) Enhancement of the antiproliferative

activity of gemcitabine by modulation of c-Met pathway in pancreatic cancer. Curr Pharm Des, 19: 940-950.

[157] Prasad V. (2016) Perspective: The precision-oncology illusion. Nature, 537: S63.

[158] Biankin AV. (2017) The road to precision oncology. Nat Genet, 49: 320-321.

[159] Walko C, Kiel PJ, Kolesar J. (2016) Precision medicine in oncology: New practice models and roles for oncology pharmacists. Am J Health Syst Pharm, 73: 1935-1942.

[160] Simon R. (2010) Translational research in oncology: key bottlenecks and new paradigms. Expert Rev Mol Med, 12: e32.

[161] Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA, Jr., Varella-Garcia M. (2005) Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. J Natl Cancer Inst, 97: 643-655.

[162] Varella-Garcia M, Diebold J, Eberhard DA, Geenen K, Hirschmann A, Kockx M, Nagelmeier I, Ruschoff J, Schmitt M, Arbogast S, Cappuzzo F. (2009) EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. J Clin Pathol, 62: 970-977.

[163] Chou TC. (2010) Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res, 70: 440-446.

[164] Ihle NT, Byers LA, Kim ES, Saintigny P, Lee JJ, Blumenschein GR, Tsao A, Liu S, Larsen JE, Wang J, Diao L, Coombes KR, Chen L, Zhang S, Abdelmelek MF, Tang X, Papadimitrakopoulou V, Minna JD, Lippman SM, Hong WK, Herbst RS, Wistuba, II, Heymach JV, Powis G. (2012) Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. J Natl Cancer Inst, 104: 228-239.

[165] Modest DP, Camaj P, Heinemann V, Schwarz B, Jung A, Laubender RP, Gamba S, Haertl C, Stintzing S, Primo S, Bruns CJ. (2013) KRAS allel-specific activity of

sunitinib in an isogenic disease model of colorectal cancer. J Cancer Res Clin Oncol, 139: 953-961.

[166] Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. (2003) Met, metastasis, motility and more. Nat Rev Mol Cell Biol, 4: 915-925.

[167] Seiwert TY, Jagadeeswaran R, Faoro L, Janamanchi V, Nallasura V, El Dinali M, Yala S, Kanteti R, Cohen EE, Lingen MW, Martin L, Krishnaswamy S, Klein-Szanto A, Christensen JG, Vokes EE, Salgia R. (2009) The MET receptor tyrosine kinase is a potential novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res, 69: 3021-3031.

[168] Lim YC, Kang HJ, Moon JH. (2014) C-Met pathway promotes self-renewal and tumorigenecity of head and neck squamous cell carcinoma stem-like cell. Oral Oncol, 50: 633-639.

[169] Tanizaki J, Okamoto I, Sakai K, Nakagawa K. (2011) Differential roles of trans-phosphorylated EGFR, HER2, HER3, and RET as heterodimerisation partners of MET in lung cancer with MET amplification. Br J Cancer, 105: 807-813.

[170] Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Finocchiaro G, Skokan M, Gajapathy S, Carnaghi C, Rimassa L, Rossi E, Ligorio C, Di Tommaso L, Holmes AJ, Toschi L, Tallini G, Destro A, Roncalli M, Santoro A, Janne PA. (2008) Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients. Br J Cancer, 99: 83-89.

[171] Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, Toschi L, Rogers A, Mok T, Sequist L, Lindeman NI, Murphy C, Akhavanfard S, Yeap BY, Xiao Y, Capelletti M, Iafrate AJ, Lee C, Christensen JG, Engelman JA, Janne PA. (2010) Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. Cancer Cell, 17: 77-88.

[172] Lacroix L, Post SF, Valent A, Melkane AE, Vielh P, Egile C, Castell C, Larois C, Micallef S, Saulnier P, Goulaouic H, Lefebvre AM, Temam S. (2014) MET genetic abnormalities unreliable for patient selection for therapeutic intervention in oropharyngeal squamous cell carcinoma. PLoS One, 9: e84319.

[173] Ach T, Zeitler K, Schwarz-Furlan S, Baader K, Agaimy A, Rohrmeier C, Zenk J, Gosau M, Reichert TE, Brockhoff G, Ettl T. (2013) Aberrations of MET are associated with copy number gain of EGFR and loss of PTEN and predict poor outcome in patients with salivary gland cancer. Virchows Arch, 462: 65-72.

[174] Du L, Shen J, Weems A, Lu SL. (2012) Role of phosphatidylinositol-3-kinase pathway in head and neck squamous cell carcinoma. J Oncol, 2012: 450179.

[175] Chiosea SI, Grandis JR, Lui VW, Diergaarde B, Maxwell JH, Ferris RL, Kim SW, Luvison A, Miller M, Nikiforova MN. (2013) PIK3CA, HRAS and PTEN in human papillomavirus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. BMC Cancer, 13: 602.

[176] Fenic I, Steger K, Gruber C, Arens C, Woenckhaus J. (2007) Analysis of PIK3CA and Akt/protein kinase B in head and neck squamous cell carcinoma. Oncol Rep, 18: 253-259.

[177] Suda T, Hama T, Kondo S, Yuza Y, Yoshikawa M, Urashima M, Kato T, Moriyama H. (2012) 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, 12: 416.

[178] Smeets SJ, Braakhuis BJ, Abbas S, Snijders PJ, Ylstra B, van de Wiel MA, Meijer GA, Leemans CR, Brakenhoff RH. (2006) Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. Oncogene, 25: 2558-2564.

[179] Bernardes VF, Gleber-Netto FO, Sousa SF, Rocha RM, Aguiar MC. (2013) EGFR status in oral squamous cell carcinoma: comparing immunohistochemistry, FISH and CISH detection in a case series study. BMJ Open, 3: e002077.

[180] Ang KK, Sturgis EM. (2012) Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. Semin Radiat Oncol, 22: 128-142.

[181] Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, Rosenberg PS, Bray F, Gillison ML. (2013) Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. J Clin Oncol, 31: 4550-4559.

[182] Castellsague X, Alemany L, Quer M, Halec G, Quiros B, Tous S, Clavero O, Alos L, Biegner T, Szafarowski T, Alejo M, Holzinger D, Cadena E, Claros E, Hall G, Laco J, Poljak M, Benevolo M, Kasamatsu E, Mehanna H, Ndiaye C, Guimera N, Lloveras B, Leon X, Ruiz-Cabezas JC, Alvarado-Cabrero I, Kang CS, Oh JK, Garcia-Rojo M, Iljazovic E, Ajayi OF, Duarte F, Nessa A, Tinoco L, Duran-Padilla MA, Pirog EC, Viarheichyk H, Morales H, Costes V, Felix A, Germar MJ, Mena M, Ruacan A, Jain A, Mehrotra R, Goodman MT, Lombardi LE, Ferrera A, Malami S, Albanesi EI, Dabed P, Molina C, Lopez-Revilla R, Mandys V, Gonzalez ME, Velasco J, Bravo IG, Quint W, Pawlita M, Munoz N, Sanjose S, Xavier Bosch F, Head ICOIHi, Neck Cancer Study G. (2016) HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. J Natl Cancer Inst, 108: djv403.

[183] Dreyer JH, Hauck F, Oliveira-Silva M, Barros MH, Niedobitek G. (2013) Detection of HPV infection in head and neck squamous cell carcinoma: a practical proposal. Virchows Arch, 462: 381-389.

[184] Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordonez B, He X, Pickard R, Koluder M, Jiang B, Wakely P, Xiao W, Gillison ML. (2012) Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. Am J Surg Pathol, 36: 945-954.

[185] Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Filia A, Jones TM, Sheard J, Woolgar JA, Helliwell TR, Triantafyllou A, Robinson M, Sloan P, Harvey-Woodworth C, Sisson D, Shaw RJ. (2011) Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. Clin Cancer Res, 17: 6262-6271.

[186] Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. (2008) Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. J Natl Cancer Inst, 100: 261-269.

[187] O'Sullivan B, Huang SH, Siu LL, Waldron J, Zhao H, Perez-Ordonez B, Weinreb I, Kim J, Ringash J, Bayley A, Dawson LA, Hope A, Cho J, Irish J, Gilbert R, Gullane P, Hui A, Liu FF, Chen E, Xu W. (2013) Deintensification candidate subgroups

in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. J Clin Oncol, 31: 543-550.

[188] Ng M, Freeman MK, Fleming TD, Robinson M, Dwyer-Lindgren L, Thomson B, Wollum A, Sanman E, Wulf S, Lopez AD, Murray CJ, Gakidou E. (2014) Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. JAMA, 311: 183-192.

[189] Szentkúti G, Brauswetter D, Dános K, Birtalan E, Tamás L. (2014) A fej-nyaki daganatok magas incidenciájának és mortalitásának okai hazánkban. OTORHINOLARYNGOLOGIA HUNGARICA, 60: 77-80.

[190] Sen B, Peng S, Saigal B, Williams MD, Johnson FM. (2011) Distinct interactions between c-Src and c-Met in mediating resistance to c-Src inhibition in head and neck cancer. Clin Cancer Res, 17: 514-524.

[191] Qi J, McTigue MA, Rogers A, Lifshits E, Christensen JG, Janne PA, Engelman JA. (2011) Multiple mutations and bypass mechanisms can contribute to development of acquired resistance to MET inhibitors. Cancer Res, 71: 1081-1091.

[192] Mendoza MC, Er EE, Blenis J. (2011) The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. Trends Biochem Sci, 36: 320-328.

[193] McDermott U, Pusapati RV, Christensen JG, Gray NS, Settleman J. (2010) Acquired resistance of non-small cell lung cancer cells to MET kinase inhibition is mediated by a switch to epidermal growth factor receptor dependency. Cancer Res, 70: 1625-1634.

[194] Glubb DM, Cerri E, Giese A, Zhang W, Mirza O, Thompson EE, Chen P, Das S, Jassem J, Rzyman W, Lingen MW, Salgia R, Hirsch FR, Dziadziuszko R, Ballmer-Hofer K, Innocenti F. (2011) Novel functional germline variants in the VEGF receptor 2 gene and their effect on gene expression and microvessel density in lung cancer. Clin Cancer Res, 17: 5257-5267.

[195] Zhang N, Liu H, Yue G, Zhang Y, You J, Wang H. (2016) Molecular Heterogeneity of Ewing Sarcoma as Detected by Ion Torrent Sequencing. PLoS One, 11: e0153546.

[196] Silva IP, Salhi A, Giles KM, Vogelsang M, Han SW, Ismaili N, Lui KP, Robinson EM, Wilson MA, Shapiro RL, Pavlick A, Zhong J, Kirchhoff T, Osman I. (2016) Identification of a Novel Pathogenic Germline KDR Variant in Melanoma. Clin Cancer Res, 22: 2377-2385.

[197] Nadal E, Beer DG, Ramnath N. (2015) KRAS-G12C mutation is associated with poor outcome in surgically resected lung adenocarcinoma. J Thorac Oncol, 10: e9-10.

[198] Zhou L, Baba Y, Kitano Y, Miyake K, Zhang X, Yamamura K, Kosumi K, Kaida T, Arima K, Taki K, Higashi T, Imai K, Hashimoto D, Yamashita Y, Chikamoto A, Beppu T, Tan X, Baba H. (2016) KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations, and patient prognosis in 126 pancreatic cancers: pyrosequencing technology and literature review. Med Oncol, 33: 32.

[199] Walters DM, Lindberg JM, Adair SJ, Newhook TE, Cowan CR, Stokes JB, Borgman CA, Stelow EB, Lowrey BT, Chopivsky ME, Gilmer TM, Parsons JT, Bauer TW. (2013) Inhibition of the growth of patient-derived pancreatic cancer xenografts with the MEK inhibitor trametinib is augmented by combined treatment with the epidermal growth factor receptor/HER2 inhibitor lapatinib. Neoplasia, 15: 143-155.

[200] Collisson EA, Trejo CL, Silva JM, Gu S, Korkola JE, Heiser LM, Charles RP, Rabinovich BA, Hann B, Dankort D, Spellman PT, Phillips WA, Gray JW, McMahon M. (2012) A central role for RAF-->MEK-->ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Discov, 2: 685-693.

[201] Dumble M, Crouthamel MC, Zhang SY, Schaber M, Levy D, Robell K, Liu Q, Figueroa DJ, Minthorn EA, Seefeld MA, Rouse MB, Rabindran SK, Heerding DA, Kumar R. (2014) Discovery of novel AKT inhibitors with enhanced anti-tumor effects in combination with the MEK inhibitor. PLoS One, 9: e100880.

[202] Bedard PL, Tabernero J, Janku F, Wainberg ZA, Paz-Ares L, Vansteenkiste J, Van Cutsem E, Perez-Garcia J, Stathis A, Britten CD, Le N, Carter K, Demanse D, Csonka D, Peters M, Zubel A, Nauwelaerts H, Sessa C. (2015) A phase Ib dose-escalation study of the oral pan-PI3K inhibitor buparlisib (BKM120) in combination with the oral MEK1/2 inhibitor trametinib (GSK1120212) in patients with selected advanced solid tumors. Clin Cancer Res, 21: 730-738.

[203] Janne PA, Smith I, McWalter G, Mann H, Dougherty B, Walker J, Orr MC, Hodgson DR, Shaw AT, Pereira JR, Jeannin G, Vansteenkiste J, Barrios CH, Franke FA, Crino L, Smith P. (2015) Impact of KRAS codon subtypes from a randomised phase II trial of selumetinib plus docetaxel in KRAS mutant advanced non-small-cell lung cancer. Br J Cancer, 113: 199-203.

[204] Lito P, Solomon M, Li LS, Hansen R, Rosen N. (2016) Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. Science, 351: 604-608.

12 Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. **Brauswetter D**, Birtalan E, Danos K, Kocsis A, Krenacs T, Timar J, Mihalyi R, Horcsik D, Polony G, Tamas L, Petak I. (2017) p16INK4 expression is of prognostic and predictive value in oropharyngeal cancers independent of human papillomavirus status: a Hungarian study. Eur Arch Otorhinolaryngol, 274: 1959-1965. **(IF: 1,660)**
2. **Brauswetter D**, Danos K, Gurbi B, Felegyhazi EF, Birtalan E, Meggyeshazi N, Krenacs T, Tamas L, Petak I. (2016) Copy number gain of PIK3CA and MET is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. Virchows Arch, 468: 579-587. **(IF: 2,848)**
3. Danos K, **Brauswetter D**, Birtalan E, Pato A, Bencsik G, Krenacs T, Petak I, Tamas L. (2016) The Potential Prognostic Value of Connexin 43 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 24: 476-481. **(IF: 1,634)**
4. Szentkuti G, Danos K, **Brauswetter D**, Kiszner G, Krenacs T, Csako L, Repassy G, Tamas L. (2015) Correlations Between Prognosis and Regional Biomarker Profiles in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. Pathol Oncol Res, 3: 643-650. **(IF: 1,94)**

A disszertációtól független közlemények

1. Varga A, Gyulavari P, Greff Z, Futosi K, Nemeth T, Simon-Szabo L, Kerekes K, Szantai-Kis C, **Brauswetter D**, Kokas M, Borbely G, Erdei A, Mocsai A, Keri G, Vantus T. (2015) Targeting vascular endothelial growth factor receptor 2 and protein kinase D1 related pathways by a multiple kinase inhibitor in angiogenesis and inflammation related processes in vitro. PLoS One, 10: e0124234. **(IF: 3,057)**
2. Dános K, Birtalan E, **Brauswetter D**, Tamás L. (2015) A humán (emberi) papillomavírus (HPV) szerepe a szájgarat daganatainak kialakulásában, kórisméjében és kezelésében – áttekintő közlemény. Nőgyógyászati Onkológia, 20: 8-11. **(IF: 0)**

3. Szentkúti G, **Brauswetter D**, Dános K, Birtalan E, Tamás L. (2014) A fej-nyaki daganatok magas incidenciájának és mortalitásának okai hazánkban. OTORHINOLARYNGOLOGIA HUNGARICA, 60: 77-80. **(IF: 0)**
4. Schwab R, Petak I, Kollar M, Pinter F, Varkondi E, Kohanka A, Barti-Juhasz H, Schonleber J, **Brauswetter D**, Kopper L, Urban L. (2014) Major partial response to crizotinib, a dual MET/ALK inhibitor, in a squamous cell lung (SCC) carcinoma patient with de novo c-MET amplification in the absence of ALK rearrangement. Lung Cancer, 83: 109-111. **(IF: 3,958)**
5. Tamas L, Szentkuti G, Eros M, Danos K, **Brauswetter D**, Szende B, Zsakovics I, Krenacs T. (2011) Differential biomarker expression in head and neck cancer correlates with anatomical localization. Pathol Oncol Res, 17: 721-727. **(IF: 1,366)**

13 Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Peták Istvánnak, hogy PhD munkásságom alatt támogatott, tanácsokkal látott el, lehetőséget nyújtott a legmodernebb módszerek megismerésére.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kéri Györgynek a kutatásaim során nyújtott rengeteg segítségért, bátorításért, barátságáért és a lehetőségért, hogy munkacsoportjában dolgozhattam.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet jelenlegi, és volt igazgatójának Prof. Dr. Bánhegyi Gábornak és Prof. Dr. Mandl Józsefnek, hogy helyet biztosítottak az intézetben a munkám elvégzésére. Kiemelten köszönöm Prof. Dr. Sasvári-Székely Máriának, hogy TDK hallgatóként elindította kutatói munkámat.

Hálával tartozom az MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport tagjainak, Tanai Henriettnek, Bökönyi Gyöngyinek, Gurbi Biankának, Dr. Varga Attilának, Gyulavári Pálnak, Dr. Pénzes Kingának, Dr. Vántus Tibornak és Murányi Józsefnek mind a szakmai, mind pedig a baráti téren nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinikája igazgatójának Dr. Tamás Lászlónak, aki egyetemista korom óta kíséri és segíti TDK, majd PhD munkásságomat. Kiemelten köszönöm Dr. Dános Kornél, Dr. Birtalan Ede és Dr. Szentkúti Gabriella segítségét, akikkel együtt dolgozhattam és kutathattam az évek során.

Köszönet illeti az MTA-SE Tumorprogressziós Kutatócsoport vezetőjét, Dr. Krenács Tibort, hogy laborjában végezhettem a szövettani festéseket. Köszönöm, hogy mindig szívesen látott és rengeteg ötlettel látott el.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem II.számú Patológiai Intézetéből Prof. Dr. Tímár József igazgatónak, Dr. Lotz Gábornak és Piurkó Violettának a szövettani vizsgálatok terén nyújtott segítségüket.

Végezetül hálával és köszönettel tartozom a családomnak, hogy végig bíztattak, támogattak PhD tanulmányaim folyamán.

14 Függelék

1. táblázat: FDA és EMA engedélyezett célzott terápiás hatóanyagok: Pirossal bekeretezve láthatók a hasnyálmirigy adenokarcinómák és fej-nyaki laphámrákok terápiájában jelenleg engedélyezett gyógyszerek (NSCLC: nem-kissejtes tüdőrák, ALL: akut limfoid leukémia, AML: akut mieloid leukémia, CML: krónikus mieloid leukémia, GIST: gasztrointesztinális stróma tumor, LAM: lymphangioleiomyomatosis)

	Név	Célpont	Engedély időpontja	Daganattípus, amiben engedélyezték
1	AFATINIB	EGFR, HER2, HER4	2013	NSCLC, EGFR T790M esetén első vonalban
2	AXITINIB	VEGF, PDGF	2012	Vesesejtes karcinóma
3	BELINOSTAT	HDAC	2014	Refrakter vagy visszatérő perifériás T-sejtes limfóma
4	BEVACIZUMAB	VEGF	2004	Áttétes vastagbélrák, előrehaladott NSCLC, veserák, petefészekrák, méhnyakrák, glioblastoma
5	BORTEZOMIB	26S proteoszóma, NF-KAPPAB	2003	Mieloma multiplex, köpenysejtes limfóma
6	BOSUTINIB	ABL, SRC	2012	CML Philadelphia-kromószóma pozitív
7	CABOZANTINIB	MET, RET, VEGFR-1,-2, -3, KIT, FLT-3, TIE-2, TRKB, AXL	2012	Medulláris pajzsmirigytumok, Vesesejtes karcinóma
8	CERITINIB	ALK	2014	NSCLC (crizotinib rezisztencia és ALK transzlokáció esetében)
9	CETUXIMAB	EGFR	2004	Metasztatikus vastagbélrák, rekurrens, lokálisan kiterjedt vagy metasztatikus fej-nyaki daganatok
10	COBIMETINIB	MAP2K1 (MEK)	2015	Nem rezekábilis vagy metasztatikus melanóma (BRAF mutáció jelenlétében vemurafenibbel kombinációban)

11	CRIZOTINIB	ALK, c-MET	2011	Lokálisan kiterjedt vagy metasztatikus NSCLC (ALK vagy ROS1 transzlokáció jelenlétében)
12	DABRAFENIB	BRAF	2013	Nem rezekábilis vagy metasztatikus melanóma (V600E mutáció jelenlétében önállóab vagy kombinációban trametinibbel)
13	DASATINIB	ABL, SRC	2006	ALL, CML (Philadelphia-kromoszóma pozitív)
14	ERLOTINIB	EGFR	2004 (TARCEVA); 2014 (ERLOTINIB HYDROCHLORIDE)	NSCLC (EGFR mutáció esetén első vonalban, lokálisan előrehaladott vagy metasztatikus esetben másodvonalban), nem rezekábilis vagy metasztatikus hasnyálmirigy adenokarcinóma (gemcitabinnal)
15	EVEROLIMUS	mTOR	2009 (AFINITOR); 2012 (AFINITOR DISPERZ); 2010 (ZORTRESS)	Emlőrák, nem rezekálható vagy metasztatikus neuroendokrin daganatok (hasnyálmirigy, gasztrointesztinális, tüdő), Vesesejtes karcinóma, Szubepidermális óriássejtes asztrocitóma
16	GEFITINIB	EGFR	2003	Lokálisan előrehaladott vagy metasztatikus NSCLC (EGFR mutáció esetén, amennyiben más terápia nem lehetséges)
17	IMATINIB	ABL, c-KIT, PDGFR	2003 (GLEEVEC), TENTATIVE APPROVAL (IMATINIB MESYLATE)	ALL, CML (Philadelphia-kromoszóma pozitív) Dermatofibrosarcoma, Mielodiszpláziás és mieloproliferatív daganatok
18	LAPATINIB	EGFR, HER2, ERK1-2, AKT	2007	Emlőrák (HER2+)
19	LENVATINIB	VEGFR, FGFR, PDGFRα, KIT, RET	2015	Előrehaladott vesesejtes karcinóma, progresszív, kiújult vagy metasztatikus pajzsmirigy daganat
20	NECITUMUMAB	EGFR	2015	Áttétes NSCLC (első vonalban gemcitabinnal és cisplatinnal

				kombinációban)
21	NILOTINIB	ABL, c-KIT, PDGFR	2007	CML (Philadelphia-kromoszóma pozitív)
22	NINTEDANIB	VEGFR, FGFR, PDGFR, SRC, FLT-3	2014	NSCLC (EMA által engedélyezett)
23	OLAPARIB	PARP	2014	Előrehaladott petefészekrák (BRCA1 és BRCA2 mutáció jelenlétében)
24	OSIMERTINIB	EGFR	2015	NSCLC (EGFR-inhibítor terápiát követő progresszió esetén, T790M jelenlétében)
25	PALBOCICLIB	CDK4, CDK6	2015	Emlőrák (ER+, HER2+)
26	PANITUMUMAB	EGFR	2006	Metasztatikus vagy terápiarezisztens vastagbélrák (KRAS vad típus)
27	PANOBINOSTAT	HDAC	2015	Mielóma multiplex
28	PAZOPANIB	VEGFR-1,2,3, PDGFR, FGFR	2009	Előrehaladott vesesejtes karcinóma, lágyszövet daganatok
29	PERTUZUMAB	HER2	2012	Emlőrák (HER2+)
30	PONATINIB	ABL, VEGFR, FGFR, TIE2, FLT-3, RET	2012	ALL, CML (Philadelphia-kromoszóma és egyéb mutáció jelenlétében)
31	RAMUCIRUMAB	VEGFR-2	2014	Gyomor vagy a gyomor-nyelőcső átmenet előrehaladott vagy metasztatikus adenokarcinómája, metasztatikus NSCLC
32	REGORAFENIB	VEGFR-2, 3, RET, KIT, PDGFR, RAF, FGFR	2013	Áttétes vastagbél, áttétes/lokálisan kiterjedt/nem rezekálható GIST
33	ROMIDEPSIN	HDAC	2009	Kután T-sejtes limfóma
34	RUXOLITINIB	JAK-1,2	2011	Mielofibrózis, policitémia vera
35	SORAFENIB	RAF, RET, VEGFR, PDGFR, FGFR, FLT-3	2005	Inoperábilis májtumor, Előrehaladott vesesejtes karcinóma, áttétes vagy előrehaladott pajzsmirigy tumor

36	SUNITINIB	VEGFR-2, PDGF, Rb, C-KIT, FLT-3, RET, FGFR	2006 (SUTENT), 2014 (SUNITINIB MALATE)	GIST, áttétes, előrehaladott neuroendokrin daganat (hasnyálmirigy), áttétes vesesejtes karcinóma
37	T-DM1	HER2 (tubulin)	2013	Metasztatikus emlőrák (HER2+)
38	TEMSIROLIMUS	mTOR	2007	Előrehaladott vesesejtes karcinóma
39	TRAMETINIB	MEK-1, 2	2013	Inoperábilis vagy áttétes melanóma (BRAF mutáció jelenlétében)
40	TRASTUZUMAB	HER2	1998	Gyomor vagy gyomor-nyelőcső átmenet adenokarcinómája (HER2+), áttétes emlőrák (HER2+)
41	VANDETANIB	VEGFR-2, EGFR, RET	2011	Lokálisan előrehaladott vagy áttétes medulláris pajzsmirigy tumor
42	VEMURAFENIB	BRAF-V600E	2011	Inoperábilis vagy áttétes melanóma (BRAF V600E mutáció jelenlétében)
43	VISMODEGIB	PTCH és/vagy SMO	2012	Inoperábilis, áttétes vagy terápiarezisztens bazálsejtes karcinóma
44	VORINOSTAT	HDAC	2006	Terápiarezisztens kután T-sejtes limfóma
45	ZIV-AFLIBERCEPT	VEGF	2012	Áttétes vastagbéldaganat (kemoterápiával kombinációban)
46	PEMBROLIZUMAB	PD-1	2014	Inoperábilis vagy áttétes melanóma, PD-L1 expresszáló NSCLC (amennyiben más célpont nem található, így nem alkalmasak ALK- vagy EGFR-gátlószeres kezelésre), Áttétes vagy kiújult fej-nyaki laphámrák, amely standard terápiára progrediált
47	NIVOLUMAB	PD-1	2016	Hodgkin-limfóma, inoperábilis vagy áttétes melanóma (BRAF mutáció hiányában), áttétes NSCLC
48	IPILIMUMAB	CTLA-4	2011	Adjuváns terápiaként már operált, áttétes vagy inoperábilis melanóma

49	IDELALISIB	PI3K delta	2014	CLL, follikuláris B-sejtes limfóma
50	SIROLIMUS	mTOR	2015	LAM
51	RUCAPARIB	PARP	2016	petefészekrák (BRCA deléció esetén)