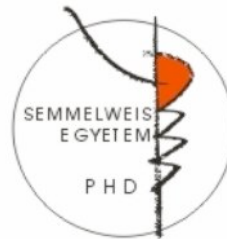


Az EGF-receptor és a claudinok expressziós mintázatának vizsgálata a fej-nyak régió laphámrákjaiban

Doktori tézisek

Dr. Szabó Balázs

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



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

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

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina egyetemi tanár, Ph.D.

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

Budapest
2014

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	2
1. BEVEZETÉS	3
• A FEJ-NYAKI LAPHÁMRÁKOK	3
• AZ EGFR ÉS HIBÁI	5
• CLAUDINOK	7
2. CÉLKITŰZÉSEK	8
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	9
4. EREDMÉNYEK	10
• EGFR	10
• CLAUDINOK	12
5. KÖVETKEZTETÉSEK	13
6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	15
• AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK	15
• AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ABSZTRAKTOK, KONGRESSZUSI ÖSSZEFOGLALÓK	15
• AZ ÉRTEKEZÉSTŐL FÜGGETLEN KÖZLEMÉNYEK	16
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	17

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Akt: protein kináz B (PKB)

CLDN: Claudin

EGF: epidermális növekedési faktor (Epidermal Growth Factor)

EGFR: epidermális növekedési faktor receptor (Epidermal Growth Factor Receptor)

EGFRvIII: epidermális növekedési faktor receptor III-as variáns (Epidermal Growth Factor Receptor variant III)

FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció

HNSCC: a fej-nyak régió laphámrákja (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma)

HPV: Humán papillomavírus

kDa: kilodalton

KSH: Központi Statisztikai Hivatal

MAPK: mitogén aktivált protein kináz

PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz

TK: tirozin-kináz

PCR: polimeráz láncreakció

RAF: rat fibrosarcoma

RAS: rat sarcoma

RFLP: restrikciós fragmenshossz polimorfizmus (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RR: relatív kockázat (Relative Risk)

TGF- α : transzformáló növekedési faktor alfa (Transforming Growth Factor- α)

TJ: Tight Junction

TMA: szöveti microarray technológia (Tissue Micro Array)

1. BEVEZETÉS

- *A fej-nyaki laphámrákok*

A rosszindulatú fej-nyaki daganatok legnagyobb részét (mintegy 90%-át) a laphámrákok (HNSCC) teszik ki. A tápcsatorna felső szakaszából és a felső légutak hámjából kiinduló laphámrákok döntő többsége szájüregi, garat és gége eredetű, egységes a szövettani szerkezetük és hasonló etiológiával rendelkeznek. A fej-nyaki laphámsejtes tumor világszerte 600 000 új eset megjelenésével 2012-ben a hatodik leggyakoribb daganatfélése, mortalitása 320 000. A KSH adatai szerint Magyarországon 2011-ben közel 4400 új beteget regisztráltak, ami incidencia és mortalitás tekintetében a tüdő- és a colorectalis daganatok után a férfiak körében a 3. helyet jelenti. Prognózisuk igen rossz, a legtöbb esetben a betegek késői stádiumban fordulnak orvoshoz a malignus elváltozással. A két közismert rizikófaktor, a leggyakoribb kémiai karcinogének, az alkoholfogyasztás és dohányzás mellett egyre több adat utal a vírusos etiológia lehetséges szerepére a fej-nyaki laphámrákok kialakulásában. A megjelent tanulmányok szerint integrált HPV-t a HNSCC-k 19-35 százalékában lehet kimutatni. Szövettanilag a HPV-pozitív csoport általában

magasabban differenciált, gyakran verrukózus jellegű, és számos tanulmány szerint szignifikánsan jobb túléléssel társul, ami a daganatok fokozottabb sugár- és kemoterápiás érzékenységében nyilvánul meg.

Hazai beteganyagunkon az anamnesztikus adatok alapján a HPV-pozitív esetekre jellemzőbb a kémiai és virális karcinogenezis együttes jelenléte; az igazoltan virális etiológiai eredet ritka.

Az elmúlt évtizedekben a sebészi terápia, valamint a kombinált kemo- és radioterápia sokat fejlődött, azonban a lokoregionálisan előrehaladott és/vagy távoli áttéket is adó fej-nyaki tumorokban szenvedők túlélése ezzel párhuzamosan nem növekedett szignifikánsan. A kezelés hatékonyságának növelésére reményteli lehetőség az eddigi kezelések kiegészítése targetspecifikus terápiával, ezen kívül igen fontos az új molekuláris biológiai prognosztikai és prediktív faktorok feltérképezése és alkalmazása is. Miután a HNSCC-k egyik fő jellemzője az EGFR-overexpresszió, ezért az EGF-receptort célzó gyógyszerek a fej-nyaki tumorok esetében is kipróbálásra, illetve bevezetésre kerültek.

- *Az EGFR és hibái*

Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) egy 170 kDa tömegű glikoprotein, mely egy extracelluláris ligandkötő régióból, egy hidrofób transzmembrán régióból és egy tirozin-kináz aktivitással rendelkező intracelluláris doménből áll. Számos ligand aktiválhatja a receptort, melyek közül a legjelentősebbek az epidermális növekedési faktor (EGF) és a transzformáló növekedési faktor- α (TGF- α). Az aktivált receptorok számos intracelluláris jelátviteli kaszkádot indítanak be, melyek közül az EGF-receptor esetében a legfontosabb útvonal a RAS-Raf-MAP-kináz és a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K)-Akt-kináz útvonal. Normál sejtekben ezen útvonalak a proliferáció és a differenciáció serkentésével a szöveti homeosztázis fenntartásáért felelősek, tumorsejtekben azonban aktivációjuk fokozza az angiogenezist, gátolja az apoptózist, valamint sejtadhéziót, inváziót és metasztázisképzést eredményez.

Több tanulmány szerint fej-nyaki daganatok esetében az EGFR fehérje overexpressziója 70-90 százalék közé tehető. Az EGFR overexpresszió és amplifikáció fej-nyaki tumoros betegeknél is kedvezőtlenebb túléléssel társul.

Az EGF-receptor gátlására jelenleg két hatóanyagcsoport áll rendelkezésre: a gátlás megvalósulhat egyrészt extracellulárisan ható monoklonális antitestekkel, valamint kismolekulasúlyú tirozin-kináz inhibitorokkal, melyek intracellulárisan a receptor tirozin-kináz enzimaktivitását blokkolják. A preklinikai vizsgálatok alapján az EGF-receptor ideális célpontnak tűnt a daganatterápiában, a klinikai eredmények mégsem feleltek meg teljes mértékben az elvárásoknak. Megjelentek olyan publikációk is, melyek szerint a tumoros betegeknek mindössze 10-20 százaléka reagál megfelelően az anti-EGFR kezelésre.

Az EGF receptornak és a jelpályájának több hibája ismert epiteliális eredetű tumorokban, melyek az anti-EGFR terápia hatásosságát befolyásolják. A protein overexpresszió és a génamplifikáció túl a TK domén mutációját és az extracelluláris ligandkötő domén delécióját (mely az ún. VIII variánst hozza létre) is leírták számos tumortípusban. A KRAS, mely az EGFR-szignalizáció egyik legjelentősebb fehérjéje és az egyik leggyakoribb onkogén humán tumorokban, szintén hordozhat az anti-EGFR terápia kimenetelét befolyásoló mutációkat.

- ***Claudinok***

A claudinok 20-27 kDa molekulású fehérjék, melyek a tight junction (TJ) típusú sejtkapcsoló struktúrák felépítésében vesznek részt, fontos szerepük van a paracelluláris permeabilitás szabályozásában és a sejt polaritásának fenntartásában epitel és endotel sejtekben. Négy transzmembrán doménból és két extracelluláris hurokból épülnek fel, emellett citoplazmatikus N-terminális és C-terminális végekkel rendelkeznek. A rosszindulatú daganatok kialakulása és progressziója során a sejt-sejt kapcsolatok megváltozása tapasztalható, mely folyamat során a sejtkapcsoló struktúrák, köztük a claudinmolekulák alterálódása is tetten érhető. Ezek a változások megnyilvánulhatnak a claudinoknak a normál szövethez képest fokozott vagy csökkent expressziójában, amely a későbbiekben felhasználható lehet a szövettani differenciál-diagnosztikában, valamint prognosztikai jelentőséget hordoz, és targetspecifikus terápia alapját is képezheti.

2. CÉLKITŰZÉSEK

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

Felmerülő kérdéseink:

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

illetve az esetleges expressziós különbségeknek van-e kapcsolatuk az általunk vizsgált klinikopatológiai paraméterekkel?

4. Az esetleges eltérő claudinmintázat összefüggést mutat-e a prognózissal?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Mintáink a SE Fül- Orr- Gégészeti és Fej- Nyaksebészeti Klinikáján fej-nyaki laphámrákkal kezelt 71 beteg műtéti anyagaiból származnak.

Immunhisztokémiai módszerrel történt az EGFR, a vIII mutáció és a claudinok expressziójának feltérképezése (TMA). FISH technikát alkalmaztunk az EGFR génamplifikáció vizsgálatára, PCR-t a TK domén mutáció (HRM), a KRAS mutáció (RFLP) és a HPV 16, 18, 33 pozitívitás meghatározására. Az eredményeinket megfelelő statisztikai módszerekkel elemeztük.

4. EREDMÉNYEK

- *EGFR*

Az EGF-receptor génszámára vonatkozóan az esetek 11,6%-ában találtunk génamplifikációt, mely leggyakrabban a hypopharyngeális régióban fordult elő; poliszómiát 8,7%, míg triszómiát 24,6%-ban állapítottunk meg. Összesen tehát a minták 45%-ában volt emelkedett EGFR génkópiaszám, mely szignifikánsan rosszabb túlélési aránnyal társult.

Az EGFR fehérje expressziója és aktivitása a különböző lokalizációjú tumorokban különbségeket mutatott, illetve a receptor különböző epitópjainak festődése is eltérő intenzitású volt. Ezen kívül egy tumoron belül is nagyfokú heterogenitást tapasztaltunk. Az intracelluláris domént felismerő antitestet használva a 3+ erősségű proteinexpresszió szignifikánsan rosszabb túlélési aránnyal társult. Azoknak a betegeknek, akiknek a tumorában az EGF-receptor emelkedett aktivitást mutatott (foszfo-EGFR specifikus antitesttel vizsgálva az aktivitást), jobb volt a túlélése. Ez az eredmény azonban a statisztikai szignifikancia szintjét nem érte el.

A VIII mutáció gyakorisága mintáinkban 21% volt, melyek többsége a laryngealis régióban fordult elő.

TK domén mutáció tumormintáinkban nem fordult elő, KRAS mutáció 2,8%-ban.

Integrált, magas rizikójú HPV (HPV 16, 18, 33) jelenléte a minták 19,7%-ában volt jelen, többségében nyelvgyöki és tonsillaris lokalizációban. A korábbi irodalmi adatokkal ellentétben az általunk vizsgált populációban a HPV pozitivitas nem társult jobb túlélési aránnyal.

Elvégeztük az EGFR hibái, a hisztológiai jellemzők és a HPV infekció együttes statisztikai kiértékelését. Megállapítottuk, hogy az összes vIII variáns esetében emelkedett génkópiaszám volt jelen, míg vad EGFR-t kifejező tumoroknál az emelkedett kópiaszám csak 30%-ban fordult elő. Az EGFR aktiváció mértéke és a HPV infekció nem állt összefüggésben a vIII mutáns receptor jelenlétével. Statisztikailag semmilyen összefüggést sem sikerült kimutatni a HPV infekció és a vIII mutáció, illetve az EGFR aktivitás között. A HPV-pozitív daganatos mintákban egy esetben sem fordult elő génamplifikáció. Kimutattuk, hogy a vizsgált fej-nyaki tumorok esetén a klasszikus klinikopatológia faktorok közül a gyulladásos infiltráció és az érbetörés rendelkezik prognosztikai jelentőséggel.

- ***Claudinok***

A normál és a daganatos hámból származó mintáink egyaránt negatívnak bizonyultak CLDN3, -8, és -10-re.

A CLDN1, -2 és -7 expresszió szignifikáns különbséget mutatott a normál és malignus szövetek között, mely expressziós különbségek többnyire függetlenek voltak a lokalizációtól, kivéve a CLDN1 kifejeződését, mely oropharyngealis daganatokban szignifikánsan magasabb volt, mint a másik két lokalizációban. A normál hámból viszonyítva a tumoros mintáinkban emelkedett CLDN1 és -7, illetve csökkent CLDN2 expressziót találtunk. A tumoros minták CLDN1 expresszió mértéke emelkedettebb volt a CLDN7 kifejeződéséhez viszonyítva. A CLDN1, -2 és -7 expressziója függetlennek bizonyult a legtöbb ismert klinikai és patológiai paramétertől, például kortól, nemtől, HPV-státusztól, alkoholfogyasztástól, stádiumbeosztástól és szöveti differenciálódástól.

A CLDN1 és CLDN7 expressziója nem befolyásolja a teljes túlélést, azonban a CLDN2 alacsonyabb expressziójához rosszabb túlélés társult.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Eredményeink alapján a hazai HNSCC betegpopuláció az EGFR biológiai jellemzőit tekintve nem tér el az európai átlagtól. A hagyományos patológiai paraméterek (tumorok differenciáltsági foka, érbetörés, gyulladással beszűrődés) szoros korrelációt mutattak a túléléssel. Az EGFR túlzott expressziója daganatos mintáink nagy részében kimutatható volt. Az EGFR fehérje expressziója és aktivitása, a különböző epitópok festődése azonban a különböző lokalizációjú tumorokban, illetve egy tumoron belül is nagyfokú heterogenitást mutatott. Ebből következően ennek diagnosztikai és prognosztikai jelentőséget nem tulajdonítunk.
2. Az EGFR emelkedett kópiaszáma és túlzott expressziója szignifikánsan kedvezőtlenebb túléléssel társult. Szemben az eddigi szakirodalmi adatokkal, saját tumoros mintáink HPV pozitivitása (19,7%) nem társult kedvezőbb túléléssel, ami azzal magyarázható, hogy betegeinknél az anamnesztikus adatok alapján a kémiai és a virális karcinogenezis együtt fordult elő. Daganatos mintáinkban egyáltalán nem volt jelen a TK domén mutációja, és a KRAS mutáció is ritkán fordult elő (2,8%). Ezzel szemben a vIII mutáció 21%-os

gyakorisága azt sugallja, hogy az anti-EGFR terápiák hatástalanságának hátterében az egyik jelentős tényező az EGFR vIII variánsa lehet. Célszerű lenne ezért a terápiás antitestek alkalmazása előtt az EGFR expresszió mértékének vizsgálatán felül a vIII variáns jelenlétének kimutatása is.

3. A normál és a daganatos hámból származó mintáink egyaránt negatívnak bizonyultak CLDN3, -8, és -10-re. A CLDN1, -2 és -7 expresszió szignifikáns különbséget mutatott a normál és malignus szövetek között, mely többnyire független volt a lokalizációtól, és az általunk vizsgált legtöbb ismert klinikai és patológiai paramétertől. A normál hámból viszonyítva a tumoros mintáinkban emelkedett CLDN1 és -7 expressziót mutattunk ki; ennek összefüggése a túléléssel nem volt szignifikáns. A vizsgált daganatokban a CLDN1 expressziója volt a legkifejezettebb, ezért HNSCC-ben ezt jósoljuk potenciálisan leghatásosabb terápiás targetnek.
4. Daganatos mintáinkban a CLDN2 csökkent expressziója szignifikánsan kedvezőtlenebb prognózissal társult, ebből következően jelenlétét vagy hiányát ígéretes prognosztikai faktornak tekintjük.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

- *Az értekezéshez kapcsolódó közlemények*

Szabó B, Nelhübel GA, Kárpáti A, Kenessey I, Jóri B, Székely Cs, Peták I, Lotz G, Hegedűs Z, Hegedűs B, Füle T, Döme B, Tímár J, Tóvári J

Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas

ORAL ONCOLOGY-EUROPEAN JOURNAL OF CANCER PART B 47:(6) pp. 487-496. (2011)

IF: 2.857

Nelhübel GA, Károly B, Szabó B, Lotz G, Kiss A, Tóvári J, Kenessey I

The Prognostic Role of Claudins in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas.

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 20: pp. 99-106. (2014)

IF: 1.555

- *Az értekezéshez kapcsolódó absztraktok, kongresszusi összefoglalók*

Nelhübel Györgyi, Kárpáti Adél, Kenessey István, Dobos Judit, Lőrincz Zsolt, Szabó Balázs, Tóvári József

Az EGF-receptor epitóp-mintázatának szerepe különböző lokalizációjú fej-nyaki tumorok progressziójában.

39. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg. 2009.05.19-22.

Szabó Balázs, Nelhübel Györgyi, Kárpáti Adél, Kenessey István, Füle Tibor, Jóri Balázs, Hegedűs Zita, Tóvári József
Az EGF-receptor hibáinak vizsgálata különböző lokalizációjú fej-nyaki tumorokban.

40. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg. 2010.05.18-21.

Nelhübel Györgyi, Szabó Balázs, Kárpáti Adél, Kenessey István, Füle Tibor, Székely Csilla, Jóri Balázs, Hegedűs Zita, Hegedűs Balázs, Tóvári József

Az EGF-receptor szerepének vizsgálata különböző lokalizációjú fej-nyaki tumorokban.

69. Patológus Kongresszus, Siófok, 2010.09.30-10.02.

Nelhübel Gy, Szabó B, Kenessey I, Váliczkó É, Dobos J, Tímár J, Tóvári J

A cMET jelpálya gátlása anti-EGFR terápiára rezisztens kísérletes fej-nyaki laphámrákokban.

41. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, Magyarország, 2011. május 17-20.

- *Az értekezéstől független közlemények*

Répássy G, Szabó B, Kraxner H, Tamás L, Tímár J
Új funkciómegtartó sebészi terápia előrehaladott gégerák szelektív eseteiben

MAGYAR ONKOLÓGIA 45:(3) p. 296. (2001)

Szabó B, Szilágyi N, Tímár J, Répássy G

A Semmelweis Egyetem Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika

Gége és hypopharynxtumoros betegadatainak retrospektív vizsgálata és statisztikai elemzése az 1990 és 1999 közötti időszakra vonatkozóan
MAGYAR ONKOLÓGIA 45:(3) p. 303. (2001)

Répássy G, Szabó B
Az előrehaladott gégerák sebészi terápiájának onkopatológiai alapjai
MAGYAR ONKOLÓGIA 49:(1) p. 74. (2005)

Fent Z, Szabó B, Fedorcsák I, Nagy R, Noszek László, Répássy Gábor
Reziduális epiharynx tumor endoszkópos eltávolítása és gamma terápiája
FÜL-ORR-GÉGEGYÓGYÁSZAT 56:(3) p. 148. (2010)

Andó R, Bencsik B, Szabó B
Halmozódó primer laphámkarzinomák egy beteg esetében
FÜL-ORR-GÉGEGYÓGYÁSZAT 58:(3) p. 138. (2012)

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. Tóvári Józsefnek a közel hét éve tartó folyamatos támogatásáért, biztatásáért, a sok segítségért és tanácsért, valamint a munkacsoportunkban dolgozó korábbi TDK hallgatóinknak, dr. Nelhübel Györgyinek, dr. Kárpáti Adélnak és dr. Károly Borókanak. Köszönöm az Országos Onkológiai Intézet Tumorprogressziós Osztályának, Kísérletes Farmakológiai Osztályának illetve a II. sz. Patológiai Intézetnek a lehetőséget és a kísérleteink elvégzéséhez

szükséges feltételek megteremtését, dolgozóinak, különösen Parragné Derecskei Katalinnak és Kalocsáné Piurkó Violettnak a labormunkában nyújtott segítséget. Külön köszönet illeti dr. Kenessey Istvánt, aki a statisztikai elemzések kiértékelésében és szakmai kérdésekben volt segítségemre.

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

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

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

A dolgozatomat édesapám, Dr. Szabó Iván emlékének ajánlom.